



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE LA  
ACTIVIDAD OSTEOGÉNICA DE LA MATRIZ SOLUBLE DEL  
NÁCAR DE LA OSTRERA PERLERA *Pteria sterna*.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

**Dalia Itzkopilli Luis Hernández**

La Paz, Baja California Sur, abril de 2026.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **12:00** horas del día **12** del mes de **marzo** del año **2026**, se procedió por las personas abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Aprovechamiento biotecnológico de la actividad osteogénica de la matriz soluble del nácar de la ostra perlera *Pteria sterna*"**




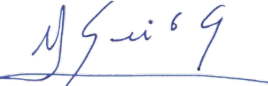
Presentada por la alumna:

**DALIA ITZKOPILLI LUIS HERNÁNDEZ**

Aspirante al Grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones las personas integrantes de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Grado y nombre	Estatus	Firma
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez	Co-Directora de Tesis	
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra	Co-Directora de Tesis	
Dr. Paul Mondragón Terán	Co-Tutor de Tesis	
	 Dra. Alejandra Nieto Garibay, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos	



La Paz, Baja California Sur, a 12 de marzo de 2026.

Los miembros del comité de tesis de la estudiante Dalia Itzkopilli Luis Hernández del Programa de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales con orientación en Biotecnología, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
iThenticate
- Filtros utilizados:  
Bibliografía, Texto citado y Texto mencionado
- Porcentajes de similitud:  
Máximo 20% para tesis Posgrado  
Se muestra captura de pantalla

**Dalia Itzkopilli Luis Hernández**  
**TESIS MAESTRÍA DALIA ITZKOPILLI LUIS HERNÁNDEZ\_CRP\_NYHS\_PMT\_DILH.docx**

Centro de Investigaciones en Matemáticas Avanzadas

**Detalles del documento**

Identificador de la entrega  
 tencid=3117566827956

Fecha de entrega  
 12 mar 2026, 9:47 a.m. GMT-7

Fecha de descarga  
 12 mar 2026, 9:55 a.m. GMT-7

Nombre del archivo  
 TESIS MAESTRÍA DALIA ITZKOPILLI LUIS HERNÁNDEZ\_CRP\_NYHS\_PMT\_DILH.docx

Tamaño del archivo  
 11.1 MB

iThenticate Página 2 de 33 - Descripción general de integridad

**12% Similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ej...

**Filtrado desde el informe**

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado

**Fuentes principales**

- 11% Fuentes de Internet
- 5% Publicaciones
- 0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

**Marcas de integridad**

N.º de alertas de integridad para revisión  
 No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.



**Co-Directoras**

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

**Estudiante**

Dalia Itzkopilli Luis Hernández

**Personal técnico de asesoría en el análisis**

Susana Luna García

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dr. Paul Mondragón Terán  
Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Morelos  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez  
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra  
Dr. Paul Mondragón Terán

### **Jurado de Examen**

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez  
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra  
Dr. Paul Mondragón Terán

### **Suplente**

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

## Resumen

El nácar constituye la capa interna de la concha de algunos moluscos y está conformada por una fase mineral de carbonato de calcio y una matriz orgánica compuesta de proteínas, glicoproteínas, lípidos y pigmentos. Dentro de este sistema biocompuesto, las proteínas de la matriz orgánica desempeñan un papel clave en la biomineralización, regulando la nucleación y el crecimiento de los cristales. Diversos estudios han demostrado que extractos proteicos del nácar, así como proteínas purificadas de esta matriz, ejercen efectos osteoinductores y osteogénicos tanto en modelos *in vivo* como en ensayos de diferenciación celular hacia el linaje osteogénico. Análisis bioquímicos y moleculares han evidenciado que dichos efectos se deben a la capacidad de las proteínas para incrementar la expresión de genes asociados a la osteogénesis y promover la mineralización extracelular.

En particular, de la concha de la ostra perlera *Pteria sterna* se ha aislado la matriz orgánica soluble e insoluble mediante extracción con ácido acético glacial (AAG) al 10%. En un estudio previo se purificó y caracterizó la proteína Ps19 a partir de la fracción insoluble, la cual presenta capacidad de unión a calcio y  $\alpha$ -quitina, además de inducir la formación de cristales de aragonita *in vitro*. Dando continuidad a este estudio, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad osteogénica tanto de la matriz soluble como de la proteína Ps19 sobre la diferenciación de células troncales mesenquimales de médula ósea humana (MSC) hacia el linaje osteogénico. Se demostró que la proteína Ps19 y la matriz orgánica soluble en ácido acético (ASM, del inglés Acid Soluble Matrix) de la concha de *P. sterna* producen cambios en el fenotipo mesenquimal de las MSC de médula ósea tras 21 días de estimulación. Se observaron cambios morfológicos, una tendencia a la disminución en la expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90, así como la expresión del marcador osteoblástico OCN. Estos cambios fueron dependientes del estímulo aplicado, la concentración utilizada y del pase celular. Las MSC estimuladas con 500 ng/mL y 1000 ng/mL de Ps19 mostraron expresión de OCN; sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar plenamente su potencial osteogénico. En cuanto a las MSC estimuladas con diferentes concentraciones de ASM, se observó una tendencia a la disminución de CD90, expresión de OCN y presencia de matriz extracelular mineralizada. En conjunto, estos resultados evidencian su potencial osteogénico.

**Palabras clave:** *Pteria sterna*, Ps19, matriz orgánica soluble, células troncales mesenquimales, diferenciación osteogénica

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2523-4573>

Vo. Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

## Summary

Nacre constitutes the inner layer of the shells of certain mollusks and is composed of a mineral phase of calcium carbonate and an organic matrix consisting of proteins, glycoproteins, lipids, and pigments. Within this biocomposite system, the proteins of the organic matrix play a key role in biomineralization by regulating crystal nucleation and growth. Several studies have demonstrated that protein extracts from nacre, as well as purified proteins from this matrix, exert osteoinductive and osteogenic effects both in *in vivo* models and in cell differentiation assays toward the osteogenic lineage. Biochemical and molecular analyses have shown that these effects are attributable to the ability of these proteins to increase the expression of genes associated with osteogenesis and to promote extracellular mineralization.

In particular, both the soluble and insoluble matrices have been isolated from the shell of the pearl oyster *Pteria sterna* through extraction with 10% acetic acid. In a previous study, the protein Ps19 was purified and characterized from the insoluble fraction. This protein exhibits calcium and  $\alpha$ -chitin-binding capacity and induces aragonite crystal formation *in vitro*.

As a continuation of this work, the aim of the present study was to evaluate the osteogenic activity of both the soluble matrix and the Ps19 protein on the differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) toward the osteogenic lineage.

It was demonstrated that the Ps19 protein and the acid-soluble organic matrix (ASM) from the shell of *P. sterna* induce changes in the mesenchymal phenotype of bone marrow-derived MSC after 21 days of stimulation. These changes included morphological alterations, a trend toward decreased expression of the mesenchymal markers CD73 and CD90, and the detection of the osteoblastic marker OCN expression. The observed effects were dependent on the type of stimulus, the concentration used, and the cell passage number.

MSC stimulated with 500 ng/mL and 1000 ng/mL of Ps19 exhibited OCN expression; however, further studies are required to confirm its osteogenic potential. Regarding MSCs stimulated with different concentrations of ASM, a trend toward decreased CD90 expression was observed, along with OCN expression and the presence of a mineralized extracellular matrix. Collectively, these findings demonstrate their osteogenic potential.

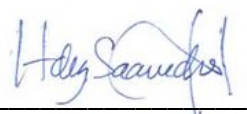
**Keywords:** *Pteria sterna*, Ps19, organic soluble matrix, mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2523-4573>

Vo. Bo. Co-Director de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

## Dedicatoria

*Que la ciencia sea para el mundo*

*A mi madre Irma por ser la valiente mujer que me mostró el camino de la ciencia y la emoción por la vida*

*A mi padre Mario por su impulso y apoyo para elegir con libertad mi propio camino*

*A mi hermano Mario Luis por su apoyo incondicional en las aventuras, las dificultades y los aprendizajes, eres mi inspiración*

*A mis abuelos Esther y Juan, con especial cariño y admiración*

*A mi familia, a mis amigas, a mis profesoras por siempre estar presentes en los cuidados de la vida, por ser motivo de inspiración y fuente de infinitas fortalezas*

*A Mike por compartir el camino, la bicicleta, las comidas, por tu apoyo para lograr terminar de escribir esta tesis, gracias por cuidar mis desvelos*

*A mis amigas y cómplices de corazón de mar y cuerpo saldo: Montse, Su, Fi, Fer, Irma, Mel, gracias por compartir el mar, la palabra, la escritura, la música, los paisajes, los atardeceres, las lunas, las carreteras y los pensamientos afilados*

*A Vladi por las pláticas alegres y nostálgicas, los bailes, las comidas y las reflexiones, gracias por tu amistad que fue una luz entre los cactus*

## **Agradecimientos**

A la SECHITI por la beca (CVU 1143246) otorgada para realizar mis estudios.

A CIBNOR por brindarme la infraestructura y los recursos necesarios para el desarrollo de mi proyecto.

A la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del CIBNOR por su atenta y amable atención durante el seguimiento de mis estudios.

Al CICATA Unidad Morelos por recibirme y proporcionarme los recursos necesarios para realizar mi estancia de investigación.

Al laboratorio de Bioquímica del CIBNOR por recibirme con entusiasmo y compartir conmigo sus valiosos conocimientos, gracias por el ambiente fraterno y científico.

Al comité tutorial de tesis: Dra. Crisalejandra Rivera Pérez, Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra y Dr. Paul Mondragón Terán por sus aportaciones y apoyo otorgado durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez, gracias por la oportunidad de haber desarrollado esta investigación y de ampliar mi conocimiento en este tema, por compartir el gusto por los moluscos y las conchas, por su escucha atenta a mis inquietudes y dudas, por su calidez y paciencia desde el primer día.

A la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra por sus aportaciones al seguimiento de esta investigación y por su dirección durante mis presentaciones.

Al Dr. Paul Mondragón Terán por incitarme a conocer más sobre la ciencia aplicada y la medicina traslacional y por su apoyo para culminar el trabajo experimental.

A la Dra. Marcela Veléz Alavez, gracias por todo el apoyo durante las largas jornadas de trabajo en el laboratorio, por estar al tanto de mis desafíos experimentales, por tus consejos y los momentos de diversión.

Al M.C. David Alejandro Rivera Miranda por todo el entrenamiento técnico y por compartir conmigo la emoción, angustia y curiosidad en cada resultado obtenido, por resolver mis dudas, por tus consejos y tus risas.

A la Dra. Verónica Rojo León por su apoyo y guía durante los análisis de citometría de flujo, gracias por tu tiempo y por hacerme preguntas enriquecedoras.

Al Dr. Marco Antonio Dimas Rufino por su apoyo para tomar las imágenes mediante microscopía confocal y por transmitirme la pasión por las imágenes científicas y resolver conmigo dudas.

Al personal técnico y administrativo del CIBNOR y del CICATA unidad Morelos por su enorme labor.

A mis compañeros y compañeras de maestría porque aprendí de cada uno de ustedes.

A mis compañeros de laboratorio Paco, Luis, Lalo, Vianey, Sergio, Estefania por compartir hambre, angustias, dudas, anhelos, por hacer de nuestra labor diaria en el laboratorio un aprendizaje colectivo.

## Contenido

Resumen .....	i
Summary .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Contenido .....	vi
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas .....	x
Abreviaturas .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Biomineralización.....	1
1.2 La concha de los moluscos bivalvos.....	2
1.2.1 Matriz orgánica .....	6
1.2.2 El nácar de las ostras perleras .....	8
1.3 El tejido óseo .....	11
1.3.1 Osteogénesis.....	13
1.4 Relación entre el nácar y el hueso .....	16
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>17</b>
2.1 Análisis <i>in vivo</i> .....	17
2.2 Análisis <i>in vitro</i> .....	18
2.3 Proteína Ps19 de la concha de la ostra perlera <i>Pteria sterna</i> .....	20
<b>3.JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
5.1 Objetivo general .....	23
5.2 Objetivos particulares.....	23
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
6.1 Muestras biológicas .....	24
6.2 Extracción de las proteínas de la matriz orgánica soluble e insoluble de la concha de <i>P. sterna</i> .....	24
6.3 Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida de ASM y AIM .....	24
6.4 Cuantificación de proteína del extracto de ASM .....	25
6.5 Purificación de la proteína Ps19 .....	25
6.5.1 Electroforesis SDS-PAGE de eluciones colectadas .....	26
6.5.2 Tinción de Nitrato de plata .....	26
6.5.3 Concentración y desalado de eluciones .....	27
6.5.4 Densitometría.....	27
6.6 Cultivo celular de MSC de médula ósea humana en medio basal .....	27
6.7 Cultivo celular de MSC de médula ósea humana en medio de diferenciación osteogénica, con ASM y con Ps19.....	28
6.8 Cinética de crecimiento de MSC de acuerdo con el estímulo aplicado.....	28
6.9 Inmunofluorescencia .....	29
6.10 Citometría de flujo.....	30
6.11 Tinción de rojo de Alizarina .....	32

6.12 Análisis estadísticos .....	32
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
7.1 Extracción de las proteínas de la matriz orgánica de la concha de <i>P. sterna</i> .....	33
7.2 Purificación de la proteína Ps19 .....	34
7.3 Cuantificación de la proteína Ps19 del liofilizado mediante densitometría .....	35
7.4 Cinética de crecimiento de células troncales mesenquimales de médula ósea humana (MSC) .....	36
7.4.1 Cinética de crecimiento de MSC de acuerdo con el estímulo aplicado.....	36
7.5 Marcadores CD73 y CD90 en células troncales mesenquimales de médula ósea .....	38
7.6 Expresión de CD73 y CD90 en células estimuladas con Ps19 .....	39
7.7 Expresión de CD73, CD90 y Osteocalcina en células estimuladas con medio de diferenciación osteogénica y con Ps19.....	42
7.8 Expresión de OCN de acuerdo con el pase celular en MSC estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19.....	43
7.9 Efecto de la matriz orgánica soluble sobre células la expresión de CD73 y CD90.....	46
7.10 Las células estimuladas con ASM expresaron CD73, CD90 y Osteocalcina. ....	46
7.11 Las células estimuladas con medio de diferenciación osteogénica y con matriz soluble presentaron tinción de rojo de Alizarina positiva.....	49
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>59</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>67</b>
Anexo A. Cuantificación de proteína de la ASM por el método de Lowry .....	67
Anexo B. Cuantificación de proteína del liofilizado de Ps19 por densitometría de Vicent <i>et al.</i> (1997).....	68
Anexo C. Citometría de flujo.....	69

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Constitución de la concha y regiones morfogénicas del manto. Concha: perióstraco y óstraco (capa prismática y capa nacarada). Manto: surco periostracal y pliegues externo, medio e interno. Imagen modificada de Cheng <i>et al.</i> (2023).....	3
<b>Figura 2.</b> Esquema de la biomineralización de la concha. El epitelio del manto secreta biomoléculas al espacio extrapaleal, donde las proteínas (círculos azules) interactúan con los iones (triángulos rojos) para formar las capas de la concha: el surco del manto (café) secreta la capa periostracal; la zona externa (beige), la capa prismática media; y la zona interna (amarillo), la capa nacarada interna. Imagen modificada de Marin <i>et al.</i> (2007). .....	5
<b>Figura 3.</b> Microfotografías SEM del nácar de la concha de la ostra perlera <i>Pinctada margaritifera</i> . A) Microestructura de “ladrillo y mortero”. Imagen de Rousseau <i>et al.</i> (2008). B-C) Tabletas de nácar, las flechas señalan la matriz orgánica. Imagen de Zhang <i>et al.</i> (2016).. .....	8
<b>Figura 4.</b> Esquema de la microestructura de “ladrillo y mortero” del nácar de la concha. ....	9
<b>Figura 5.</b> Composición del hueso. Imagen modificada de Iduarte (2018) y Cañón <i>et al.</i> (2022)...	11
<b>Figura 6.</b> Esquema de los diferentes estados de diferenciación osteogénica de células troncales mesenquimales (MSC) <i>in vitro</i> mediante el estímulo con medio químico definido. ....	15
<b>Figura 7.</b> Esquema de las similitudes de la biomineralización de la concha del nácar de la concha de ostras perleras y de la osteogénesis de los vertebrados.....	16
<b>Figura 8.</b> Perfil electroforético de proteínas de la matriz orgánica de la concha de <i>P. sterna</i> de las fracciones soluble e insoluble. SDS-PAGE de poliacrilamida al 12%. Tinción con azul de Coomassie. MM: marcador molecular; ASM: proteínas solubles de la matriz; AIM: proteínas insolubles de la matriz.....	33
<b>Figura 9.</b> Perfil electroforético de muestras del extracto crudo de AIM de la concha de <i>P. sterna</i> en SDS-PAGE al 16%. Tinción con azul de Coomassie. MM: marcador molecular; A-F: AIM. La flecha indica la banda de la proteína Ps19.....	34
<b>Figura 10.</b> Bandas de Ps19 de las eluciones obtenidas mediante electroelución. SDS-PAGE al 16%. Tinción nitrato de plata. MM: marcador molecular; A-C: eluciones; P: extracto crudo AIM. La flecha indica las bandas de la proteína Ps19. ....	35
<b>Figura 11.</b> Cuantificación de proteína obtenida en el liofilizado de Ps19 (punto café) por densitometría. ....	35
<b>Figura 12.</b> Curva de proliferación celular de MSC. ....	36
<b>Figura 13.</b> Curva de proliferación celular de MSC de acuerdo al estímulo aplicado. A) sin estímulo, estimuladas B) con medio de diferenciación osteogénica (DO), C) con 200 µg/mL de ASM y D) con 500 ng/mL de Ps19. Las barras indican desviación estándar. ....	37
<b>Figura 14.</b> A) Proliferación celular de cada grupo de las 120 a las 192 horas. B) Efecto de los medios de cultivo sobre la proliferación ( $p^* \leq 0.05$ ). MSC no estimuladas (MSC), estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (DO) y estimuladas con 200 µg/mL de matriz orgánica soluble en ácido acético (ASM).....	38
<b>Figura 15.</b> Células troncales mesenquimales de médula ósea (MSC) con morfología fibroblastoide y expresión de CD90 en la membrana celular en verde y núcleos celulares en azul.....	39
<b>Figura 16.</b> Histogramas de fluorescencia de CD73-APC y CD90-FITC en las MSC obtenidos por citometría de flujo. A) CD73 1:200, 1:100, 1:20 y 1:10. B) CD90 1:200, 1:100 y 1:50 .....	39

- Figura 17.** Porcentaje de células positivas para marcadores mesenquimales. A) CD73 B) CD90. MSC sin estímulo  $n=3$  (rojo) , MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica  $n=2$  (azul) y MSC estimuladas con Ps19 a diferentes concentraciones ng/mL  $n=3$  (morado).....40
- Figura 18.** Citometría de flujo de MSC estimuladas con Ps19. A) Histograma de intensidad de fluorescencia de CD73 en las células estimuladas con diferentes concentraciones de Ps19 (histograma representativo). B) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) para CD73 ( $n=3$ ). C) Histograma de intensidad de fluorescencia de CD90 en las células estimuladas con diferentes concentraciones de Ps19 (histograma representativo). D) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) para CD90 ( $n=3$ ). Control sin tinción(azul), MSC sin estímulo (rojo), MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (verde) y MSC estimuladas con Ps19 a diferentes concentraciones ng/mL (morado). MFI-Fold change =1 sin cambio de expresión, >1 aumento de expresión y <1 disminución de expresión. ....41
- Figura 19.** Inmunofluorescencia de MSC del pase 3 post-estimuladas durante 21 días con medio de diferenciación osteogénica (DO), 500 y 1000 ng/mL de Ps19. Tinción: CD90 (verde), CD73 (rojo), OCN (amarillo) y DAPI (azul).....43
- Figura 20.** Localización de OCN en MSC estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19. A) MSC del pase 4; B) MSC del pase 5. Tinción: OCN-PE (amarillo) y DAPI (azul). En B) no se realizó la tinción con DAPI. ....44
- Figura 21.** Citometría de flujo de MSC estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19. A–C) Histogramas representativos de intensidad de fluorescencia de los marcadores de troncalidad CD63 y CD90, y del marcador osteoblástico OCN, en MSC del pase 4 (P4) y pase 5 (P5) ( $n = 1$ ). D–F) Intensidad media de fluorescencia (MFI; fold change) en MSC de P4 y P5, mostrando los niveles relativos de expresión de CD73, CD90 y OCN en comparación con MSC sin estímulo. Controles: sin tinción (azul), MSC sin estímulo (rojo) y MSC estimuladas con Ps19 (morado).....45
- Figura 22.** Citometría de flujo de MSC estimuladas con ASM. A) Histograma de intensidad de fluorescencia de CD73 en las células estimuladas con diferentes concentraciones de matriz orgánica soluble (ASM). B) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) para CD73 ( $n=1$ ). C) Histograma de intensidad de fluorescencia de CD90. D) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) para CD90 ( $n=1$ ). MFI-Fold change =1 sin cambio de expresión, >1 aumento de expresión y <1 disminución de expresión. MSC sin estímulo (rojo), MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (verde) y MSC estimuladas con ASM a diferentes concentraciones  $\mu\text{g/mL}$  (naranja-café). ....47
- Figura 23.** Inmunofluorescencia de MSC del pase 5 post-estimuladas durante 21 días con 1000 ng/mL de Ps19, con 200  $\mu\text{g/mL}$  de ASM y sin estímulo (MSC). Tinción: CD90 (verde), CD73 (rojo) y OCN (amarillo). ....48
- Figura 24.** Matriz extracelular observada de MSC a los 21 días de cultivo. MSC sin estímulo (MSC), tratadas con medio de diferenciación osteogénico (DO), con diferentes concentraciones de matriz orgánica soluble (ASM) y de Ps19. ....49
- Figura 25.** Tinción de Rojo de Alizarina de MSC estimuladas durante 21 días con 100, 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  de matriz orgánica soluble (ASM), sin estimular (MSC) y estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (DO). Imágenes tomadas por microscopio óptico a 40X. ..50
- Figura 26.** Tinción de Rojo de Alizarina de MSC estimuladas durante 21 días con 1, 10, 100, 500 y 1000 ng/mL de Ps19, sin estimular (MSC) y estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (DO). Imágenes tomadas por microscopio óptico a 20X.....50

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Extracción de ASM y AIM de la concha de <i>P. sterna</i> con AAG 10%.....	33
<b>Tabla 2.</b> Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación (Td).....	38

## Abreviaturas

°C	Grados centígrados
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
g	Gramos
kDa	Kilodalton
mA	Miliampers
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
rpm	Revoluciones por minuto
μL	Microlitros
μ	Velocidad específica de crecimiento
Td	Tiempo de duplicación
AAG	Ácido acético glacial
AIM	Acid insoluble matrix
Ala	Alanina
ALP	Fosfatasa alcalina
APC	Aloficocianina
Arg	Arginina
ASM	Acid soluble matrix
Asp	Aspartato
ACC	Amorphous calcium carbonate
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
BSA	Seroalbúmina bovina
BSP	Sialoproteína ósea
CA	Anhidrasa carbónica
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de calcio
Cis	Cisteína
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Col1	Colágeno tipo I
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DO	Medio de diferenciación osteogénica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESM	Ethanol soluble matrix
ESMc	Cationic ethanol soluble matrix
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fl	Flúor
Glu	Glutamato
GMEM	Glasgow Modified Minimum Essential Medium
Gly	Glicina

GN	Glicina-Alanina
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
H <sub>2</sub> O	Agua
Hh	Hedgehog
IDRs	Intrinsically disordered regions
K	Potasio
Ln	Logaritmo natural
Ln2	Logaritmo natural de 2
Lys	Lisina
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
MFI	Intensidad media de fluorescencia
Mn	Manganeso
MRC5	Fibroblastos derivados de tejido pulmonar
MSC	Mesenchymal stem cells o células troncales mesenquimales
Na	Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCPs	Noncollagenous proteins
OCN	Osteocalcina
ON	Osteonectina
OPN	Osteopontina
Osx	Osterix
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico
RLCDs	Repetitive low complexity domains
Runx2	Factor de transcripción Runx2
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SMAD	Proteína SMAD
SMPs	Shell matrix proteins
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Tir	Tirosina
VWA	Dominio factor de von Willebrand tipo A
WSM	Water soluble matrix

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Biomineralización

La biomineralización es el proceso molecular y fisiológico mediante el cual los organismos producen minerales inorgánicos para formar estructuras mineralizadas, como espículas, conchas, perlas, otolitos, estatolitos, dientes, huesos y cáscaras de huevos, las cuales cumplen funciones biológicas específicas de soporte estructural, protección, alimentación, orientación, reproducción o locomoción (Coronado *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2020).

Los organismos biomineralizadores se encuentran presentes en los tres dominios biológicos Archaea, Bacteria y Eukarya. Los minerales que producen se denominan biominerales o minerales biogénicos, los cuales se caracterizan por su composición dual: una fase inorgánica constituida de minerales amorfos o cristalinos que otorgan dureza, y una fase orgánica compuesta por biomoléculas que confieren flexibilidad y resistencia a la fractura (Gilbert *et al.*, 2022). Los principales grupos de biominerales son sílice, carbonatos, fosfatos y sulfatos. La mayoría de estos minerales presentan polimorfismo, ya que pueden tener la misma composición química, pero presentan diferentes estructuras cristalinas (Coronado *et al.*, 2022)

De acuerdo con el nivel de organización atómico, los biominerales se pueden clasificar en amorfos (desordenados) o cristalinos (ordenados). Los amorfos son agregados con características similares a los minerales inorgánicos y generalmente son utilizados como almacenamiento temporal de iones o como precursores que posteriormente se transforman en diferentes formas cristalinas. Por otro lado, los biominerales cristalinos presentan microarquitecturas complejas y ordenadas; se caracterizan por su dureza y se utilizan para el soporte y la protección corporal (Sharma *et al.*, 2020; Addadi y Weiner, 2014; Lowenstam, 1981).

Existen dos tipos de biomineralización, de acuerdo con el grado de control que los organismos ejercen sobre este proceso: inducida y controlada. La biomineralización inducida ocurre cuando los minerales se forman por la interacción entre los procesos metabólicos del organismo y las condiciones fisicoquímicas del medio exterior, razón por la cual sucede únicamente en ambientes abiertos sin compartimentos diferenciados. Se considerado el tipo de biomineralización más

temprano y primitivo en la evolución, y se presenta en bacterias, arqueas y protistas (Coronado et al., 2022; Lowenstam, 1981).

La biomineralización controlada está altamente regulada por el organismo mediante células especializadas que secretan una matriz orgánica compuesta de biomoléculas, principalmente proteínas, lípidos y carbohidratos. Estas biomoléculas controlan el proceso de nucleación y formación de los minerales al interactuar con agregados de iones inorgánicos en espacios aislados del medio externo (epicelular, intercelular, intracelular y extracelular). Este tipo es más común entre los eucariotas y genera estructuras complejas y ordenadas (Coronado *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2020). Las matrices orgánicas pueden clasificarse entre aquellas compuestas por colágeno, como en el hueso de los vertebrados, y aquellas compuestas por quitina, como en los exoesqueletos y conchas de invertebrados (Du *et al.*, 2017).

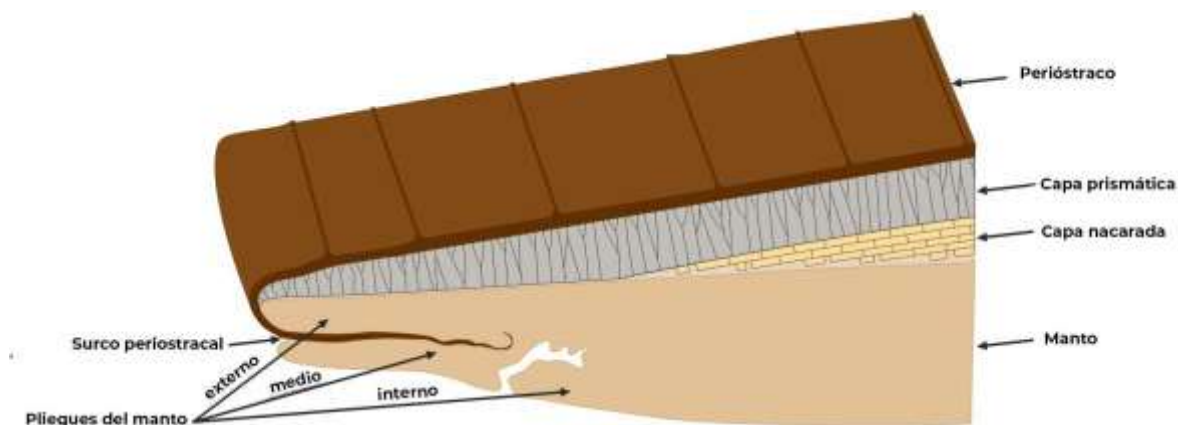
Los huesos de los vertebrados y la concha de los moluscos son estructuras formadas mediante biomineralización controlada. Aunque ambos sistemas son filogenéticamente distantes, presentan procesos celulares, vías de señalización y proteínas con funciones similares (Zhang *et al.*, 2006; Rousseau *et al.*, 2003). Diversas investigaciones han demostrado que el nácar de la concha de ostras perleras presenta propiedades osteogénicas y osteoinductoras en análisis *in vivo* e *in vitro* con tejidos y líneas celulares de vertebrados. Por lo tanto, en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos, se considera un biomaterial de interés para comprender los mecanismos de biomineralización, identificar moléculas funcionales y desarrollar materiales biomédicos que contribuyan al tratamiento de trastornos y patologías óseas (Green *et al.*, 2013).

## **1.2 La concha de los moluscos bivalvos**

El Phylum Mollusca es el segundo filo más diverso biológicamente. Un elemento característico de su plan corporal es la concha, la cual puede estar formada por una valva (gasterópodos y monoplacóforos), dos valvas (bivalvos), varias capas superpuestas (poliplacóforos) o estar ausente o reducida (cefalópodos, aplacóforos y algunos gasterópodos) (Haszprunar, 2020). El éxito evolutivo de este grupo se atribuye, en gran medida, a sus conchas mineralizadas, generalmente compuestas de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), que les brindan protección corporal ante entornos altamente cambiantes (Kocot *et al.*, 2016).

La clase Bivalvia incluye a mejillones, almejas, ostiones, escalopas y ostras, cuya característica principal es la presencia de un cuerpo blando comprimido lateralmente, cubierto por una concha de dos valvas articuladas, que actúan como exoesqueleto para la inserción muscular y la protección ante depredadores y factores ambientales (Gosling, 2003).

Anatómicamente, la concha presenta una capa externa de composición orgánica denominada perióstraco, la cual protege contra impactos mecánicos, incrustación y corrosión a las capas mineralizadas media e interna, conocidas en conjunto como óstraco (Fig. 1). Estructuralmente, la concha es un material compuesto por una fase orgánica (matriz orgánica) y una fase inorgánica. La matriz orgánica representa aproximadamente el 5% y está compuesta por proteínas, polisacáridos, lípidos y pigmentos, mientras que la fase inorgánica constituye alrededor del 95%  $\text{CaCO}_3$ , el cual puede presentarse en tres polimorfos: calcita, aragonita y, raramente, vaterita (Cheng *et al.*, 2023; Camacho *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Constitución de la concha y regiones morfogénicas del manto. Concha: periόstraco y óstraco (capa prismática y capa nacarada). Manto: surco periostracal y pliegues externo, medio e interno. Imagen modificada de Cheng *et al.* (2023).

Los moluscos bivalvos son considerados los “maestros de la biomineralización”, ya que la construcción de su concha constituye un ejemplo arquetípico de la biomineralización controlada: 1) es un proceso regulado por células especializadas mediante vías metabólicas específicas; 2) la síntesis mineral es activa y requiere gasto de energía metabólica; 3) los minerales producidos difieren de sus contrapartes inorgánicas; 4) el organismo crea un espacio aislado del medio externo donde se sintetizan los minerales; y 5) es un proceso mediado por la matriz orgánica extracelular (Coronado *et al.*, 2022; Checa, 2018; Marin *et al.*, 2008).

El órgano encargado de secretar la concha es el manto. Sus células epiteliales especializadas regulan genéticamente la secreción de los iones de calcio y bicarbonato, así como las macromoléculas orgánicas que constituyen la matriz orgánica, en una forma temporal y espacialmente controlada (Montagnani *et al.*, 2011). Así, ciertos genes estructurales y de desarrollo se expresan o reprimen en etapas específicas del ciclo de vida del organismo y en regiones morfogénicas concretas, cada una asociada con la secreción específica de ciertas capas de la concha: la capa periostracal se secreta en el surco localizado entre los pliegues medio y externo del manto; la capa prismática media es sintetizada por células epiteliales columnares de la zona externa del manto; y la capa interna nacarada es formada por células de la zona interna del manto (Fig. 2) (Kocot *et al.*, 2016).

Aunque el proceso de formación de la concha aún no se conoce completamente, los análisis del metabolismo y la expresión génica del manto, así como el estudio estructural y de localización de las proteínas de la concha, han permitido deducir los siguientes procesos (Huang y Zhang, 2022):

1) Formación de un espacio confinado para la biomineralización

Las células epiteliales del surco periostracal secretan un precursor soluble compuesto por proteínas ricas en glicina y tirosina. Esta fase soluble se esclerotiza y da lugar al periostraco, el cual delimita y sella un espacio aislado del medio exterior donde ocurre la biomineralización: el espacio extrapaleal (Kim *et al.*, 2024).

2) Secreción y pre-organización de la matriz orgánica

Las células epiteliales del manto secretan la matriz orgánica extracelular y la liberan al espacio extrapaleal, donde las proteínas estructurales y los polisacáridos, principalmente quitina, interactúan y se preorganizan molecularmente, formando una plantilla que define los centros de nucleación de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  (Mann, 1988).

3) Secreción de iones inorgánicos

Los iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) se originan en el metabolismo o se obtienen del medio ambiente a través de las branquias y son transportados por la hemolinfa hasta las células epiteliales del manto. Desde el citosol son bombeados hacia el espacio extrapaleal, donde se concentran y generan un fluido sobresaturado (Marin y Luquet, 2004).

4) Complementariedad molecular entre iones y moléculas orgánicas

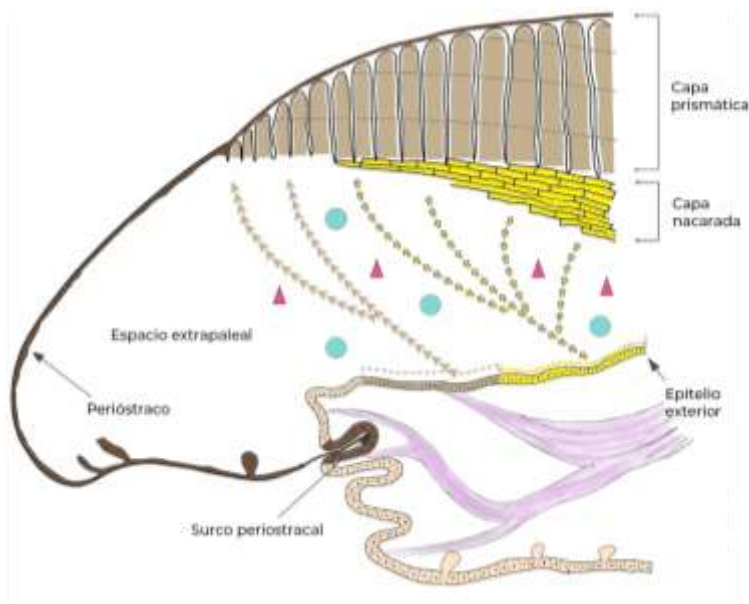
Las proteínas de la matriz orgánica interactúan con polisacáridos, iones inorgánicos ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) y minerales traza ( $\text{Mg}^{2+}$ ) del fluido extrapaleal en los sitios de nucleación, debido a una complementariedad molecular específica por polaridad, carga, forma, estructura y orientación de los grupos funcionales. Estas interacciones conducen a la formación de carbonato de calcio amorfo (ACC, del inglés *amorphous calcium carbonate*) (Mann, 1988).

#### 5) Cristalización y selección de polimorfo

A partir del ACC, las proteínas inducen la formación de los cristales (calcita, aragonita o vaterita), establecen su tamaño, orientación y morfología, y determinan el polimorfo final (Camacho *et al.*, 2008).

#### 6) Crecimiento y formación de microestructuras

Los cristales son organizados por la matriz orgánica en tabletas, y estas en placas que crecen primero verticalmente y luego lateralmente (Rivera-Pérez y Hernández-Saavedra, 2020; Marin y Luquet, 2004; Marin *et al.*, 2007). A medida que avanza la biomineralización, la matriz orgánica se incorpora al interior de los cristales o entre las tabletas y las placas, funcionando como un andamiaje que define la orientación cristalográfica y la microestructura final (Marin y Luquet, 2004).



**Figura 2.** Esquema de la biomineralización de la concha. El epitelio del manto secreta biomoléculas al espacio extrapaleal, donde las proteínas (círculos azules) interactúan con los iones (triángulos rojos) para formar las capas de la concha: el surco del manto (café) secreta la capa periostracal; la zona externa (beige), la capa prismática media; y la zona interna (amarillo), la capa nacarada interna. Imagen modificada de Marin *et al.* (2007).

### 1.2.1 Matriz orgánica

Debido al papel central que la matriz orgánica ejerce sobre el proceso de biomineralización de la concha, se han realizado numerosos estudios para conocer su composición bioquímica, caracterizar e identificar sus biomoléculas y establecer sus funciones. Como se mencionó anteriormente, la matriz orgánica está regulada genéticamente; por lo tanto, su composición y estructura difieren entre organismos mineralizadores. No obstante, se han identificado moléculas con características estructurales y funciones similares en la regulación de la biomineralización.

Las proteínas de la matriz orgánica de la concha, conocidas como *shell matrix proteins* (SMPs), son las moléculas más estudiadas. Se han extraído utilizando diferentes medios, como agua, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido acético glacial (AAG) y etanol. De acuerdo con su solubilidad, se clasifican en proteínas solubles e insolubles. Las proteínas solubles suelen ser ricas en residuos de aminoácidos ácidos, mientras que las insolubles presentan abundancia de residuos de aminoácidos como alanina y glicina, les confiere hidrofobicidad. También se clasifican según su peso molecular (mayores o menores a >1 kDa), su punto isoeléctrico (ácidas o básicas), la capa donde se localizan (aragoníticas o calcíticas), las modificaciones postraduccionales que presentan (glicosiladas, fosforiladas o sulfatadas) y su función (estructurales, nucleadoras, enzimáticas o inhibitoras) (Arroyo *et al.*, 2020; Pei *et al.*, 2021; Rivera-Pérez y Hernández-Saavedra, 2021).

Las proteínas estructurales se caracterizan por presentar dominios repetitivos de baja complejidad (RLCDs, *repetitive low complexity domains*) ricos en glicina o alanina, como los dominios tipo colágeno (*collagen-like* proteins) y tipo seda (*silk-like*). Estas repeticiones les permiten formar redes fibrilares o laminares tridimensionales semejantes a un hidrogel, que constituyen la estructura de andamiaje donde se disponen los sitios de nucleación y se organiza la deposición de los cristales. Además, pueden presentar afinidad por la quitina e interactuar con proteínas ácidas y polisacáridos (Kocot *et al.*, 2016; Evans, 2019).

Las proteínas nucleadoras son, en su mayoría, proteínas ácidas ricas en ácido aspártico y ácido glutámico. Presentan modificaciones postraduccionales como carboxilación, glucosilación, sulfatación o fosforilación, que aumentan su carga negativa. También contienen regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs, *intrinsically disorder regions*), que les confieren capacidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , proteínas y polisacáridos. Debido a estas propiedades, se considera que

concentran iones en los sitios de nucleación, inician la formación de cristales, seleccionan el polimorfo y controlan su orientación y crecimiento (Evans, 2019; Addadi y Weiner, 2014; Arias y Fernández, 2008).

Otro grupo de SMPs corresponde a las metaloenzimas. Entre ellas, la anhidrasa carbónica cataliza la conversión reversible del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) en iones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), esenciales para la biomineralización. También se encuentran proteasas que escinden proteínas específicas de la matriz para remodelarla y permitir el crecimiento y la deposición mineral, así como inhibidores de proteasas que regulan este proceso a medida que concluye la biomineralización (Evans, 2019; Addadi y Weiner, 2014).

Una característica común de muchas SMPs es la presencia de secuencias proteicas correspondientes a más de una clase funcional, lo que les permite participar en procesos de señalización célula-célula y célula-matriz, regulando la mineralización dimensional de manera temporal y espacial (Gilbert *et al.*, 2022; Arias y Fernández, 2008). También, se ha reportado la presencia de péptidos con posibles funciones en señalización celular o en respuestas bactericidas y antivirales (Marin *et al.*, 2012).

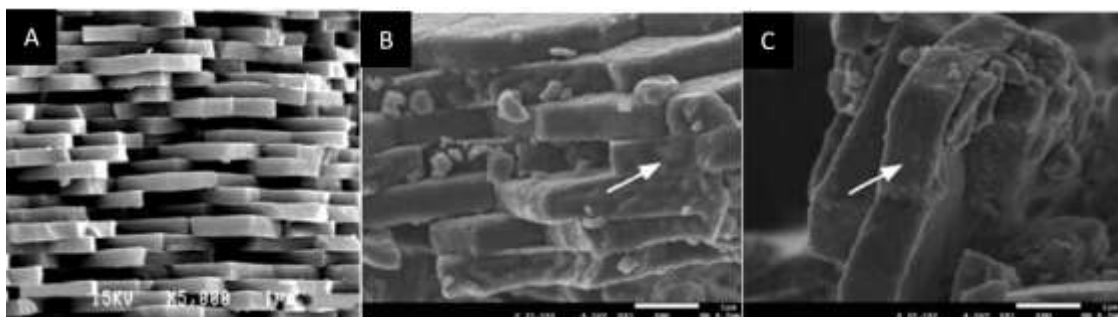
Los carbohidratos de la matriz orgánica incluyen polisacáridos hidroxilados y polisacáridos ácidos solubles. La quitina, es un polisacárido hidroxilado que junto con las SMPs forman la matriz extracelular mineralizada. Por otro lado, los polisacáridos ácidos solubles, frecuentemente sulfatados y con carga negativa, interactúan con proteínas ácidas para concentrar iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en los sitios de nucleación. También pueden formar glicoproteínas o proteoglucanos que participan en interacciones proteína-proteína y en señalización célula-matriz, organizando la matriz extracelular y funcionando como mediadores de adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular (Gilbert *et al.*, 2022; Rao *et al.*, 2014; Marin *et al.*, 2012; Arias y Fernández, 2008).

Los lípidos son el componente minoritario y menos estudiado de la matriz orgánica. Pueden asociarse con otras biomoléculas formando lipoproteínas o lipopolisacáridos que intervienen en la formación de regiones hidrofóbicas, el transporte de macromoléculas y la difusión de iones. Además, están presentes como carotenoides asociados a proteínas, responsables de patrones de coloración característicos de cada especie (Marin *et al.*, 2012).

Las diferentes composiciones y conformaciones de la matriz orgánica generan una gran variedad de microestructuras, entre ellas el nácar, exclusivo de los moluscos. En los bivalvos, la microestructura nacarada altamente organizada se conoce como “ladrillo y mortero” (*brick and mortar*) (Popov, 2015; Marin *et al.*, 2012). Esta arquitectura confiere al nácar propiedades únicas de rigidez, resistencia y tenacidad, lo que lo convierte en un biomineral de interés económico, social y biomédico (Kamen *et al.*, 2008).

### 1.2.2 El nácar de las ostras perleras

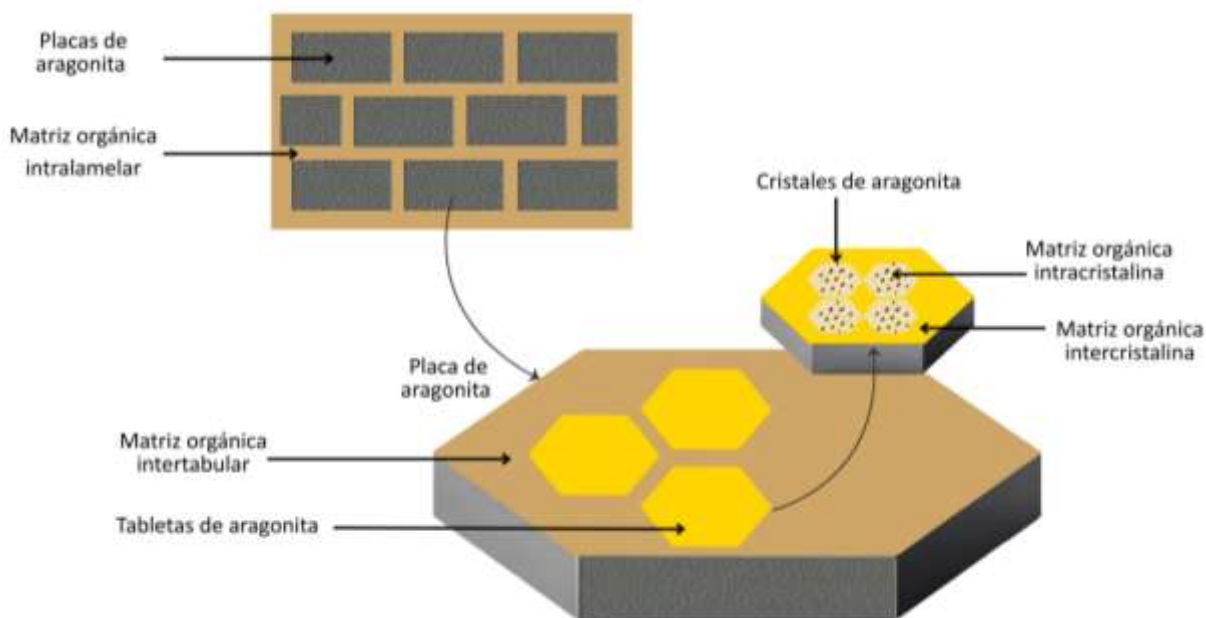
Las ostras perleras son bivalvos con capacidad de producir nácar en la capa interna de la concha como en la formación de perlas. El nácar está compuesto por una matriz orgánica y una fase inorgánica de  $\text{CaCO}_3$  en forma de cristales de aragonita de aproximadamente 50 nm, embebidos en la red orgánica. Estos cristales se organizan en tabletas pseudo-hexagonales de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor que a su vez se agrupan en placas poligonales dispuestas en láminas apiladas, formando la microestructura de “ladrillo y mortero” (Kamen *et al.*, 2008) (Figs. 3 y 4).



**Figura 3.** Microfotografías SEM del nácar de la concha de la ostra perlera *Pinctada margaritifera*. A) Microestructura de “ladrillo y mortero”. Imagen de Rousseau *et al.* (2009). B-C) Tabletillas de nácar, las flechas blancas señalan la matriz orgánica. Imagen de Zhang *et al.* (2016).

La matriz orgánica se compone principalmente por quitina y proteínas (Marin *et al.*, 2012) y se distribuye de forma intracristalina (dentro del cristal), intercristalina (entre cristales), intertabular (entre tabletas) e interlamelar (entre placas) (Fig. 4) (Rousseau *et al.*, 2009; Kamen *et al.*, 2008). Tras su extracción con EDTA o ácido acético, la fracción soluble contiene proteínas polianiónicas, ricas en Asp, localizadas dentro de los cristales y responsables de controlar su morfología, fase y orientación. La fracción insoluble, rica en Gly y Ala, forma complejos proteína-quitina, que

constituyen la estructura de andamiaje alrededor de los cristales (Rivera-Perez *et al.*, 2019; Fang *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Esquema de la microestructura de “ladrillo y mortero” del nácar de la concha.

Las proteínas del nácar pueden presentar dominios conservados (Song *et al.*; 2019) como: regiones cortas ricas en Asp y Glu asociadas a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ ; el dominio factor de von Willebran tipo A (VWA), implicado en interacciones proteína-ión o proteína-polisacáridos; dominio de anhidrasa carbónica (CA), relacionado con la provisión de iones bicarbonato; y (Du *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018) dominios repetitivos Gly-Asn (GN), asociados con la formación de estructuras secundarias que con superficies minerales para formar los cristales (Rivera-Pérez *et al.*, 2020; Montagnani *et al.*, 2011). Estas proteínas suelen presentar múltiples dominios y modificaciones postraduccionales, lo que les permite desempeñar funciones diversas en la matriz orgánica y la cristalización de la aragonita, así como en el ensamblaje de la matriz extracelular y la adhesión celular (Rivera-Pérez *et al.*, 2020; Montagnani *et al.*, 2011).

Dada su relevancia, se han realizado esfuerzos para extraerlas, purificarlas y caracterizarlas, ya que pueden considerarse recursos bioactivos con potencial en las industrias farmacéutica, perlera y cosmetológica. Entre las proteínas del nácar que han sido caracterizadas se describen las siguientes:

La proteína Pif97 presenta un dominio VWA y un dominio de unión a quitina, mientras que Pif 98 está compuesta por repeticiones del motivo Asp-Asp-Arg-Arg-Lys, con capacidad de unión a cristales de aragonita. Ambas proteínas se asocian formando un complejo capaz de unirse a la quitina presente en la estructura de andamiaje y participar en la precipitación ordenada de  $\text{CaCO}_3$  (Song *et al.*; 2019).

N66 es una metaloenzima que presenta dos dominios de CA, un dominio repetitivo Gly-X-Asn y dominios repetitivos GN. Produce iones carbonato y actúa tanto como regulador positivo, al concentrar iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , como un regulador negativo, al modular la velocidad de crecimiento cristalino (Rivera-Pérez *et al.*, 2019). Pfn23 es una proteína básica soluble en EDTA, localizada en la matriz intracristalina. Participa en la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  e induce la formación de aragonita (Fang *et al.*, 2012).

La familia de proteínas pearlín/N14/N16/ está constituida por proteínas de bajo peso molecular, ricas en Cys, Tyr y Gly. Presentan repeticiones Gly-Asn (GN), regiones cortas ácidas en Asp y Glu y sitios de fosforilación (Montagnani *et al.*, 2011). Pearlín se encuentra en la fracción insoluble en ácido acético y se localiza dentro de la matriz interlamelar; se asocia con otras proteínas (Pif, MSI60) y polisacáridos para formar la matriz de soporte estructural (Rivera-Pérez *et al.*, 2019; Montagnani *et al.*, 2011).

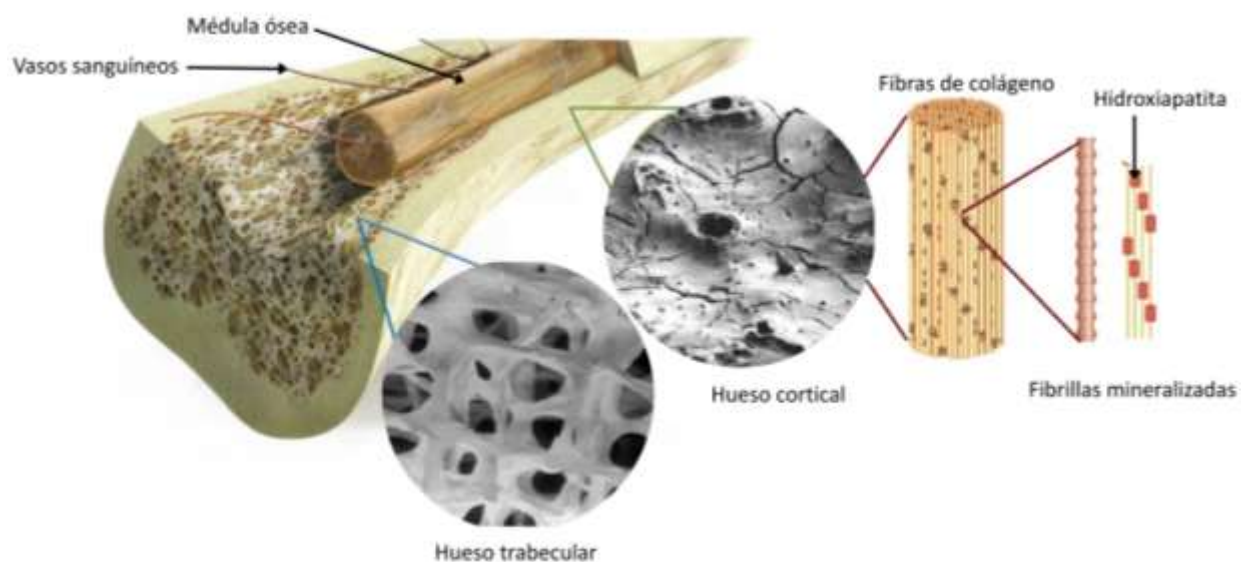
Pmarg es una proteína insoluble en ácido acético, homóloga a perlina y localizada en la matriz interlamelar, presenta dominios repetitivos de GN, sitios de unión a calcio y a polisacáridos, así como posibles de glicosilación. Se propone que interactúa con la quitina y los cristales uniéndolos a la fase mineral con la fase orgánica del nácar (Montagnani *et al.*, 2011).

Además, se ha descrito que varias SMPs desempeñan funciones tanto en la capa prismática de calcita como en la nacarada de aragonita. Por ejemplo, nacreína es una metaloenzima que puede actuar como regulador negativo al inhibir la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ ; Pfy2 participa en la nucleación cristalina y media la transición del ACC hacia calcita o aragonita; y las shematrinas intervienen en la formación de la estructura de andamiaje para la deposición de los cristales (Song *et al.*; 2019).

### 1.3 El tejido óseo

El esqueleto humano se compone de 206 huesos que cumplen funciones importantes, entre ellas: brindar soporte a los músculos, proteger a los órganos internos, participar en la producción de células sanguíneas y almacenar factores de crecimiento, citocinas, hormonas, minerales y lípidos (Prasanna *et al.*, 2024).

Los huesos se encuentran constituidos por tejido óseo, definido como un tejido conectivo mineralizado compuesto por células óseas, una matriz orgánica o sustancia osteoide y una fase mineral (An *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2006). La fase mineral del tejido óseo corresponde al 65% del peso seco y está compuesto principalmente por fosfato de calcio en forma de hidroxiapatita, además de carbonato y trazas de iones Mg, Na, K, Mn y F (Sharma *et al.*, 2021; Fernández *et al.*, 2006). Los cristales de hidroxiapatita son nanométricos (20-50 nm), de forma alargada y se disponen en laminillas organizadas paralelamente, formando una red en el tejido óseo trabecular ubicado en el interior del hueso. En el tejido óseo, que rodea al trabecular, se organizan en unidades laminares concéntricas denominadas osteonas (Fig. 5) (Osterhoff *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Composición del hueso. Imagen modificada de Iduarte (2018) y Cañón *et al.* (2022).

La matriz orgánica está constituida por proteínas colágenas, proteínas no colágenas (*NCPs*, *noncollagenous proteins*), lípidos, carbohidratos y agua. Estas proteínas participan en la

regulación de la diferenciación celular, la mineralización del tejido óseo y el mantenimiento de su integridad y función (Sharma *et al.*, 2021; Fernández *et al.*, 2006). El colágeno constituye el 90% de la matriz orgánica y puede ser de tipo I, III, V y XII. Debido a su secuencia repetida de glicina-X-Y forma una red fibrilar que funciona como plantilla de andamiaje para la deposición y organización de los cristales de hidroxiapatita. Las NCPs incluyen proteoglicanos, proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, glicoproteínas, proteínas derivadas del plasma y factores de crecimiento. Entre las principales NCPs se encuentran la fosfatasa alcalina, la osteocalcina, la osteonectina, la osteopontina y la sialoproteína ósea (An *et al.*, 2016).

La fosfatasa alcalina (ALP) es una metaloenzima membranal presente en células osteoblásticas y condrocíticas cuya función es hidrolizar el pirofosfato, liberando fosfato disponible para la mineralización ósea (Aranda y Di Carlo, 2022; Gorski, 2011).

La osteocalcina (OCN) es una proteína de bajo peso molecular que contiene tres residuos de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, los cuales le confieren afinidad por calcio e hidroxiapatita. Participa en la regulación del crecimiento cristalino y en el ensamblaje del hueso mineralizado (Rubert y De la Piedra, 2020; An *et al.*, 2016; Heinegård y Oldberg, 1989).

La osteonectina (ON), también conocida como SPARC, presenta dominios de unión a colágeno e hidroxiapatita y participa en la regulación del ensamblaje de la matriz de colágeno, la mineralización y el remodelado óseo (Rosset y Bradshaw, 2016; Delany *et al.*, 2003). La osteopontina (OPN) presenta un motivo de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) involucrado en la interacción con integrinas celulares, facilitando la adhesión células-matriz. Además, presenta sitios de fosforilación que regulan la mineralización (Gorski, 2011).

Por último, la sialoproteína ósea (BSP) es una de la NCP más abundante en el hueso humano, se caracteriza por presentar un dominio repetitivo de diez residuos de ácido glutámico, regiones cortas ricas en este mismo aminoácido y modificaciones postraduccionales como fosforilación, glicosilación y sulfatación. Estas propiedades le confieren capacidad de unión a calcio a y a polisacáridos, por lo que participa en la nucleación de los cristales de hidroxiapatita durante la mineralización del tejido óseo (An *et al.*, 2016).

Por otro lado, las células óseas se disponen dentro del tejido como en el estroma de la médula ósea. Estas incluyen osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos se originan a partir

de células troncales mesenquimales, presentan un núcleo central y una forma poliédrica, y su función es sintetizar la matriz orgánica y regular la mineralización para formar tejido óseo. Por el contrario, los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de células troncales hematopoyéticas, encargadas de degradar la matriz ósea mediante un proceso conocido como resorción ósea. Finalmente, los osteocitos, son osteoblastos maduros que durante el proceso de mineralización quedaron dentro de la matriz extracelular; presentan morfología estrellada y participan en el mantenimiento de la matriz orgánica y regular la resorción ósea (Sharma *et al.*, 2021; Fernández *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Osteogénesis

El proceso de formación del hueso se conoce como osteogénesis, es un proceso de biomineralización regulado por células especializadas del tejido óseo que ocurre durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y la reparación de fracturas. Este proceso comienza con la diferenciación de células troncales mesenquimales en osteoblastos, quienes posteriormente, sintetizan las proteínas de la matriz orgánica que regulan la formación y mineralización del tejido óseo (Shahi *et al.*, 2017; Gorski, 2011).

Las células troncales mesenquimales, o *mesenchymal stem cells* (MSC), son células indiferenciadas con morfología fibroblastoide o fusiforme y un núcleo central alargado. Presentan capacidad de autorrenovación y de diferenciación a diversos tipos celulares (Kassem, 2004; Barry y Murphy, 2004). La Sociedad Internacional de Terapia Celular ha establecido tres criterios para caracterizarlas: el primero, la adherencia al plástico en cultivo; el segundo, la expresión de marcadores de membrana CD105+, CD73+ y CD90+ así como la ausencia de marcadores de células hematopoyéticas CD45-, CD34-, CD14 o CD11b-, CD79a- o CD19- y HLA- BR-; y tercero, la capacidad de diferenciarse hacia el linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico (Castro y Montesinos, 2015; Dominici *et al.*, 2006).

La diferenciación de las MSC hacia osteoblastos ocurre como respuesta a señales bioquímicas y mecánicas del microambiente, donde están involucradas interacciones celulares, vías de señalización y factores de crecimiento que activan genes osteogénicos. En condiciones *in vitro*, la diferenciación osteogénica inducida mediante un medio específico ocurre en un periodo de 21 a 28 días y se confirma mediante tinciones que denotan depósitos de calcio y actividad de fosfatasa

alcalina, así como mediante el análisis de la expresión de genes y proteínas osteogénicas (Wang *et al.*, 2025, Granéli *et al.*, 2014; Bruder *et al.*, 1997).

Las principales vías canónicas de señalización osteogénica incluyen la vía Wnt/B-catenina, la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), la vía Hedgehog (Hh) y la vía de las proteínas morfogénicas óseas (BMP). Estas vías activan principalmente dos factores de transcripción: Runx2, que inhibe la diferenciación hacia adipocitos y condrocitos y compromete las células hacia osteoblastos; y Osterix, que regula la expresión de genes y proteínas osteogénicas como ALP, Col1a1, BSP, OPN, OCN y ON (Wang *et al.*, 2025; Zhu *et al.*, 2024; Shahi *et al.*, 2017).

La diferenciación osteogénica incluye tres etapas: la etapa de proliferación ocurre cuando los factores de crecimiento promueven la división celular de las MSC. Posteriormente, en la etapa de diferenciación, las MSC se transforman gradualmente en osteoblastos, su capacidad proliferativa y de autorrenovación disminuye progresivamente, modifican su morfología fibroblastoide a una forma prismática o cuboidal (Zhao *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2004; Bruder *et al.*, 1997) y la expresión de los marcadores mesenquimales CD105, CD73 y CD90 disminuye a medida que se activan y expresan los genes y proteínas osteogénicas (Tamaño-Machiavello *et al.*, 2025; Wiesmann *et al.*, 2006). Por último, en la etapa de mineralización, los osteoblastos secretan las proteínas de la matriz orgánica que forman el tejido óseo mineralizado (Fig. 6) (Wang *et al.*, 2025).

Al inicio de la diferenciación osteogénica, las MSC se transforman a células osteoprogenitoras mediante la activación de Runx2, comprometiendo su diferenciación hacia el linaje osteoblástico. Las células osteoprogenitoras se diferencian a pre-osteoblastos, los cuales mediante la expresión de Osx, promueven la expresión de genes osteogénicos y comienzan a expresar la proteína fosfatasa alcalina y el colágeno tipo I. La expresión de ALP y Col1 promueven la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos y son consideradas marcadores iniciales de la diferenciación osteogénica. Posteriormente, los osteoblastos sintetizan las proteínas de la matriz orgánica que regulan la mineralización: Col1, OPN, OCN y BSP (Wang *et al.*, 2025; Aubin, 2008). La expresión de OCN es considerada un marcador tardío de la diferenciación, al ser concomitante con la mineralización y únicamente expresada por los osteoblastos maduros (An *et al.*, 2016). A medida que ocurre la mineralización del tejido óseo, los osteoblastos quedan incrustados en la matriz

extracelular diferenciándose en osteocitos, estas células pierden la capacidad de proliferar y corresponden a la etapa final de la diferenciación (Zhu *et al.*, 2024).



**Figura 6.** Esquema de los diferentes estados de diferenciación osteogénica de células troncales mesenquimales (MSC) *in vitro* mediante el estímulo con medio químico definido.

El proceso de mineralización no se conoce completamente; sin embargo, se han propuesto dos teorías. La teoría de mineralización mediada por plantilla de colágeno establece que las moléculas de colágeno se autoensamblan formando fibras organizadas en red, cuya disposición de las fibras determina los sitios de nucleación de cristales. En estos sitios, los iones de calcio y fosfato interactúan con proteínas no colágenas formando complejos que se estabilizan y dan origen a cristales de hidroxiapatita. Por otro lado, la teoría de mineralización por vesículas matriciales propone que la nucleación inicial de los cristales ocurre dentro de vesículas extracelulares derivadas de membranas celulares. En su interior ciertas enzimas y proteínas con afinidad a calcio acumulan los iones de calcio y fosfato, favoreciendo la formación de cristales de hidroxiapatita. Posteriormente, la membrana de la vesícula se rompe, liberando su contenido sobre el andamiaje de colágeno. Finalmente, los cristales se depositan sobre la matriz de colágeno formando el tejido óseo mineralizado (Sharma *et al.*, 2021; An *et al.*, 2016).

Después de la formación inicial del hueso, este se mantiene en constante regeneración mediante un proceso denominado remodelado óseo, en el cual los osteoclastos reabsorben el tejido óseo viejo o dañado y los osteoblastos forman tejido óseo nuevo (Fernández *et al.*, 2006). Esto mantiene la resistencia ósea, repara microdaños o fracturas, adapta el hueso a cargas mecánicas y regula la homeostasis del calcio (Cao *et al.*, 2025; Fernández *et al.*, 2006). Sin embargo, factores como cambios hormonales y enfermedades pueden generar un desequilibrio entre la resorción y la formación de hueso, provocando alteraciones en la microestructura del hueso e incrementando su susceptibilidad a fracturas y deformaciones (Feng y McDonald, 2011). Por ello, se han buscado

sustitutos óseos que cumplan con las propiedades mecánicas y funcionales del hueso (Wang *et al.*, 2024; Ibrahim *et al.*, 2022).

### 1.4 Relación entre el nácar y el hueso

La concha de los moluscos bivalvos y el hueso de los vertebrados son estructuras biomineralizadas mediante procesos genéticos, moleculares y celulares. Aunque ambos sistemas de biomineralización son filogenéticamente distantes, presentan ciertas similitudes: 1) células especializadas secretan las moléculas de la matriz orgánica que regulan la biomineralización; 2) las proteínas estructurales presentan regiones repetitivas de aminoácidos que favorecen su autoensamblaje y forman una red de andamiaje donde se definen los sitios de nucleación y deposición de los cristales de minerales; 3) las enzimas promueven la acumulación de iones útiles para la formación de cristales de minerales; y 4) las proteínas nucleadoras presentan regiones con residuos de aminoácidos ácidos, modificaciones postraduccionales y regiones intrínsecamente desordenadas, los cuales les otorgan afinidad a minerales, polisacáridos y proteínas (Fig. 7) (Evans, 2019; Suwannasing *et al.*, 2021). Además, se considera que la vía de señalización BMP/ TGF- $\beta$  y su ruta SMAD es una vía de señalización conservada en los procesos de biomineralización tanto de la concha de los moluscos, como del hueso de los vertebrados ya que en *Haliotis diversicolor*, *Cassostrea gigas* y *Pinctada fucata* se han identificado genes ortólogos a BMP2, BMP4 y SMAD4, los cuales regulan el proceso de osteogénesis en vertebrados y participan en el mantenimiento de la homeostasis ósea (Suwannasing *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2016; Miyashita *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2015).



**Figura 7.** Esquema de las similitudes de la biomineralización de la concha del nácar de la concha de ostras perleras y de la osteogénesis de los vertebrados.

## 2. ANTECEDENTES

Desde la antigüedad, el uso del nácar para la regeneración del tejido óseo se ha documentado en la farmacopea tradicional China del siglo IV, en la cual, el pulverizado de nácar de las perlas de moluscos bivalvos marinos es catalogado como un medicamento para curar trastornos de la piel, huesos y dientes (Pei *et al.*, 2021; Loh *et al.*, 2021). En la actualidad, algunos grupos étnicos asiáticos utilizan el polvo de nácar de la concha o de las perlas como suplemento alimenticio o cosmético para tratar diversas afecciones óseas (Song *et al.*, 2022). Además, el estomatólogo Amedeo Bobbio descubrió implantes dentales de concha nácar en cráneos mayas del siglo VII, las cuales se encontraban adheridas a la mandíbula mediante la formación de hueso compacto alrededor (Yan *et al.*, 2023; Pasqualini y Pasqualini, 2009). A partir de estos registros y hallazgos se han realizado diversas investigaciones para evaluar el potencial del nácar como biomaterial para la regeneración ósea y aplicaciones biomédicas, incluyendo análisis sobre su proceso de biomineralización, composición bioquímica, microestructuras y sus propiedades físicas.

### 2.1 Análisis *in vivo*

El nácar de la concha de ostras perleras y mejillones se ha triturado y pulverizado para obtener partículas (50–150  $\mu\text{m}$ ), fragmentos (6 mm diámetro) y extractos de matriz orgánica para elaborar implantes, injertos o suplementos alimenticios.

Atlan *et al.* (1997) utilizaron el pulverizado del nácar de la concha de la ostra perlera *Pinctada maxima* para formar una mezcla con sangre autóloga de pacientes humanos e implantarla quirúrgicamente en sitios con pérdida de hueso mandibular. En otro estudio realizado por Lamghari *et al.* (2001), se mezcló el pulverizado con sangre autóloga de conejos para implantarlo en la columna vertebral y generar artrodesis espinal (una estrategia para fusionar dos vertebras). También se implantaron fragmentos cilíndricos de nácar en el hueso trabecular del fémur de ovejas (Atlan *et al.*, 1999). En los tres estudios, los resultados radiográficos e histológicos demostraron la presencia de hueso nuevo a lo largo del implante sin tejido fibroso y la formación de una interfaz directa entre el hueso y el implante con presencia de proteoglucanos. Los implantes no se degradaron y no se reportaron reacciones inmunológicas. Zielak *et al.* (2018), obtuvieron el extracto soluble en ácido acético de la matriz orgánica del nácar del mejillón *Perna perna* y lo mezclaron con la matriz ósea autóloga desmineralizada del hueso de ovejas para

elaborar un injerto y colocarlo en la región lumbar de la columna vertebral; los análisis radiográficos e histológicos demostraron que los implantes fueron reabsorbidos y reemplazados con una matriz de fibras de colágeno interconectada con vasos sanguíneos. De forma similar, Lee *et al.* (2012) demostraron que al colocar el extracto soluble en agua de la matriz orgánica de la ostra perlera *Pteria martensii* directamente sobre la quemadura de piel de cerdos, se produjo una cicatrización más temprana. Estos estudios sugieren que el nácar puede inducir la formación de tejido conectivo y tejido epitelial nuevo sin reacción inmunológica.

Se han utilizado modelos animales de osteoporosis inducida por glucocorticoides para evaluar el efecto del nácar o de sus proteínas purificadas sobre la densidad ósea. Nguyen *et al.* (2023), suministraron alimento suplementado con pulverizado del nácar de la ostra perlera *Pinctada máxima* a ratones hembra de edad avanzada durante 90 días. Xu *et al.* (2018) y Lin *et al.* (2019), utilizaron la proteína N16 recombinante del nácar de la ostra perlera *Pinctada martensii*. En el primer estudio, se aplicó una inyección hipodérmica de manera diaria durante 40 días a ratas con osteoporosis, mientras que, en el segundo estudio, la proteína se inyectó en el saco vitelino de larvas de peces cebrá con osteoporosis. Las tres investigaciones reportaron una reducción en la pérdida ósea y un aumento en los niveles de expresión de genes característicos de los osteoblastos.

## **2.2 Análisis *in vitro***

Los análisis *in vitro* consisten en ensayos de diferenciación de líneas celulares de vertebrados hacia el linaje osteogénico mediante estimulación con extractos, fracciones y algunas proteínas aisladas de la matriz orgánica del nácar de la concha, principalmente de las ostras perleras *Pinctada maxima*, *Pinctada margaritifera* y *Pinctada fucata*. Los efectos osteogénicos de estos tratamientos han sido evaluados cualitativamente mediante las tinciones de fosfatasa alcalina, rojo de alizarina y Von Kossa que demuestran la mineralización y la presencia de depósitos de calcio en la matriz extracelular (Fernández *et al.*, 2006). Para la evaluación cuantitativa se han analizado los niveles de expresión de proteínas y genes osteogénicos: fosfatasa alcalina (ALP), colágeno I (Col1), osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN). Otras técnicas, como la espectroscopía de Raman, la microscopía electrónica de barrido y la difracción de rayos X se han empleado para caracterizar la

composición química y estructural de los cultivos celulares, las matrices extracelulares y los minerales producidos.

López *et al.* (1992) cultivaron osteoblastos del hueso maxilar humano sobre fragmentos del nácar de *P. maxima*, observaron una disminución en la actividad de fosfatasa alcalina relacionada con un aumento en la proliferación celular y en la expresión de osteocalcina. También identificaron cambios morfológicos celulares, nódulos osteoblásticos mineralizados y la formación de una matriz de colágeno con osteocitos.

Mouriès *et al.* (2002) utilizaron la matriz orgánica soluble en agua (*WSM, water soluble matrix*) del nácar de *P. máxima* en cultivos de fibroblastos humanos MRC5 y células estromales de médula ósea de rata, para ambas líneas celulares reportaron un aumento de la actividad de ALP. De igual manera, Moutahir-Belqasmi *et al.* (2001) observaron un aumento en la expresión de ALP y de Bcl2 en osteoblastos de ratón y rata estimulados con WSM de *P. maxima*. Por su parte, Rousseau *et al.*, 2003 estimularon preosteoblastos MC3T3-E1 con WSM y observaron la formación de nódulos óseos mineralizados y una correlación entre la disminución de la proliferación y el aumento en la expresión de genes osteogénicos ALP, OCN y OPN.

Green *et al.* (2015) analizaron el efecto de fragmentos del nácar de *Pinctada máxima*, así como de la matriz soluble en etanol (*ESM, ethanol soluble matrix*) sobre cultivos de células troncales mesenquimales humanas y promioblastos de ratón C212, en ambas líneas obtuvieron una tinción positiva de fosfatasa alcalina y un aumento en su actividad.

En otros estudios, realizados por Zhang *et al.* (2016) y Brion *et al.* (2015), la ESM del nácar de *P. margaritifera* y su fracción catiónica (*ESMc, cationic ethanol soluble matrix*) produjeron la formación de una matriz de colágeno mineralizada con presencia de nanogranulos de octacalcio fosfato, hidroxapatita y B-fosfato tricálcico en cultivos de preosteoblastos MC3T3-E1. Mientras que, en el cultivo de osteoblastos de pacientes humanos con osteoartritis se obtuvo una tinción de rojo de alizarina positiva a los 7 días de cultivo, nódulos óseos mineralizados a los 14 días y microgranulos de calcio y fósforo, además de un matriz extracelular con fosfato de calcio amorfo y octacalcio fosfato (Zhang *et al.*, 2016). En ambos tipos celulares, los investigadores observaron un aumento en la expresión genética de OCN, OPN y Runx 2.

Zhang *et al.* (2006) identificaron, caracterizaron y purificaron la proteína p10 de la matriz soluble en amortiguador de fosfatos pH 7.0 del nácar de *P. fucata* y analizaron su efecto sobre preosteoblastos MC3TE-E1 y fibroblastos MCR5. Los resultados que obtuvieron demostraron que a altas concentraciones aumentó la actividad de fosfatasa alcalina en MC3TE-E1, mientras que, en MCR5 este mismo efecto se obtuvo a bajas concentraciones.

### **2.3 Proteína Ps19 de la concha de la ostra perlera *Pteria sterna***

*Pteria sterna* comúnmente conocida como concha nácar alada, es una ostra perlera de la familia Pteriidae que habita la zona submareal desde el alto Golfo de California hasta Perú. Se caracteriza por presentar una concha ovalada compuesta de dos valvas convexas irregulares con una extensión en forma de ala, cuyo periostraco es de color café oscuro y la capa nacarada de color rosáceo a plateado (Serna-Gallo *et al.*, 2014). Es considerada una especie de alto valor económico tanto en la industria perlera, por su capacidad de producir perlas de diferentes colores y tonalidades (Freites *et al.*, 2020), como en la industria cosmetológica ya que el polvo de nácar de su concha es utilizado para elaborar cremas faciales, jabones y protectores solares (Perlas del Mar de Cortez, 2021).

Ps19 es una glicoproteína aislada de la concha de la ostra perlera *P. sterna* de la fracción insoluble de la matriz orgánica en ácido acético. Tiene un peso molecular aproximado de 19 kDa y está constituida por 17% de residuos de aminoácidos Asp y Glu, presenta un dominio similar a Broad-Complex, Tramtrack and Bric-à-brac (BTB/POZ) implicado en las interacciones proteína-proteína y en la regulación de la actividad celular, y uno de sus péptidos es similar a la enzima tipo beta-lactamasa de serina. Tiene afinidad por calcio y  $\alpha$ -quitina. Además, induce la formación de cristales de aragonita *in vitro* a partir de soluciones saturadas con iones  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Debido a estas características y funciones demostradas, se considera que Ps19 participa en la biomineralización del nácar de la concha de *P. sterna* cuyas funciones pueden estar involucradas en la formación de la plantilla de nucleación de aragonita y en la unión de cristales y matriz orgánica (Arroyo *et al.*, 2020; 2023).

### 3.JUSTIFICACIÓN

El nácar es un material con alto potencial biotecnológico en los campos de la biomedicina, la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, debido a las similitudes estructurales y funcionales que presentan las proteínas de su matriz orgánica con las proteínas de la matriz orgánica del tejido óseo de los vertebrados. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que tanto el extracto proteico como algunas proteínas aisladas de la matriz orgánica de la concha de ostras que producen nácar tienen propiedades osteogénicas y osteoinductoras en células y tejidos de vertebrados sin inducir respuestas inmunológicas adversas. En este contexto, es necesario evaluar los extractos proteicos de la matriz soluble del nácar, así como las proteínas aisladas involucradas en la biomineralización ya que podrían ser empleados en el desarrollo de nuevos compuestos y biomateriales para el tratamiento de fracturas y enfermedades óseas que representan un problema de salud pública a nivel mundial.

En este sentido, *P. sterna* es una ostra perlera de alto valor económico en el Golfo de California, cuyo nácar es utilizado en la industria perlera y en la cosmetología; sin embargo, no ha sido explorado su potencial en aplicaciones biomédicas. Además, se ha demostrado que la proteína Ps19 obtenida de su concha induce la formación de cristales de aragonita y presenta características moleculares que definen su importancia en la biomineralización del nácar. Por lo tanto, analizar los efectos del extracto de la matriz orgánica soluble y la proteína Ps19 de la concha de *P. sterna* sobre la diferenciación osteogénica de células troncales mesenquimales de médula ósea humana permitirá conocer su potencial osteogénico y proporcionará información sobre los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales pueden influir en la osteogénesis.

#### 4. HIPÓTESIS

Si el extracto proteico de la matriz orgánica soluble y la proteína Ps19 de la concha de *P. sterna* tienen bioactividad osteogénica, entonces promoverán la diferenciación de las células troncales mesenquimales de médula ósea a osteoblastos, por lo que se observarán cambios morfológicos, expresión de marcadores osteoblásticos como osteocalcina (OCN), una disminución en la expresión de los marcadores mesenquimales CD90 y CD73, y una matriz extracelular mineralizada.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad osteogénica del extracto proteico de la matriz orgánica soluble y de la proteína Ps19 de la concha de *P. sterna* en la diferenciación de células troncales mesenquimales de médula ósea a osteoblastos.

### **5.2 Objetivos particulares**

1. Obtener el extracto proteico de la matriz orgánica soluble de la concha de *P. sterna*.
2. Aislar la proteína Ps19 de la matriz orgánica insoluble de la concha de *P. sterna*.
3. Inducir la diferenciación de células troncales mesenquimales de médula ósea humana a osteoblastos mediante el estímulo independiente de la matriz orgánica soluble y de la proteína Ps19.
4. Evaluar las características morfológicas y bioquímicas de las células estimuladas que permitan determinar su diferenciación a osteoblastos.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Muestras biológicas

Las conchas de la ostra perlera *Pteria sterna* fueron otorgadas por el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., se limpiaron removiendo el periostraco y los epibiontes cuidadosamente con un cuchillo. Las conchas se trituraron con un mortero y se pulverizaron con un molino eléctrico para obtener un polvo fino.

### 6.2 Extracción de las proteínas de la matriz orgánica soluble e insoluble de la concha de *P. sterna*

La obtención de la fracción soluble e insoluble de la matriz orgánica de la concha se realizó mediante el método de ácido acético (Montagnani *et al.*, 2011; Arroyo-Loranca *et al.*, 2020), se descalcificaron 20 g de concha pulverizada con 200 mL de una solución de ácido acético glacial (AAG) al 10% (v/v) en agitación constante a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, la solución se centrifugó a 4,500 x g a 4 °C por 30 min para separar el sobrenadante o matriz orgánica soluble ASM (del inglés, *Acid Soluble Matrix*) y el pellet o matriz orgánica insoluble AIM (del inglés, *Acid Insoluble Matrix*) por decantación. Para eliminar el AAG de la AIM, el pellet se lavó con 20 mL de agua destilada, se centrifugó a 4,500 g a 4 °C por 30 min y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Para retirar el AAG de la ASM, el sobrenadante se dializó en agua destilada con membranas D-9527 (Lot. 126F-0583 SIGMA) con corte de 12 kDa en agitación constante a 4 °C durante toda la noche. Se realizó un recambio de agua destilada a las 12 horas y se mantuvo en las mismas condiciones durante 8 horas. Finalmente, el dializado se congeló y se liofilizó para guardarse a -20 °C hasta su uso.

### 6.3 Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida de ASM y AIM

Los extractos proteicos de ASM y AIM se evaluaron por medio de electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida discontinuo 4% y 12%. Se pesó 1 mg de AIM (peso húmedo) y 1 mg de ASM (peso seco), se mezclaron respectivamente con 20 µL de amortiguador de carga 4X (0.125 M Tris pH 6.8, 8% SDS, 30% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol y 80 µL β-mercaptoetanol) y se desnaturizaron a 90 °C por 10 minutos a 600 rpm en Thermo Mixer C eppendorf. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 7,500 x g por 1 min, del sobrenadante se tomaron 15 µL para cargar en el gel. La electroforesis se corrió a 15 mA constantes en un dispositivo Hoefer

utilizando una fuente de poder PowerPac HV Bio-Rad. Finalmente, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R250 y se destiñó con una solución de 40% metanol y 10% ácido acético. Las bandas de proteínas se documentaron utilizando el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager de Bio-Rad. Para estimar la masa relativa de la proteína de interés se utilizó como referencia un marcador de bajo peso molecular (17-0446-01, Amersham Biosciences).

#### 6.4 Cuantificación de proteína del extracto de ASM

Se realizó una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) para cuantificar la proteína por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) en microplaca. El ASM (1 mg) liofilizado se disolvió con 500  $\mu$ L de agua destilada y se realizaron dos diluciones 1:5 y 1:10 para realizar la cuantificación. La cantidad de proteína en el extracto de ASM se estimó mediante la ecuación obtenida de la curva estándar de BSA:

$$y = 0.0008x + 0.005 \quad R^2 = 0.995 \quad (1)$$

#### 6.5 Purificación de la proteína Ps19

Se prepararon diferentes muestras de AIM para identificar la banda de la proteína Ps19, descrita por Arroyo-Loranca *et al.* (2023), mediante electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida discontinuo 4% y 16%. Para cada muestra se pesaron 25 mg de AIM (peso húmedo) y se mezclaron con 250  $\mu$ L de amortiguador de carga (0.125 M Tris pH 6.8, 8% SDS, 30% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol y 80  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol). Las muestras se desnaturalizaron a 90 °C por 10 minutos a 600 rpm en Thermo Mixer C eppendorf. Después, se centrifugaron a 7,500  $\times g$  por un minuto y se tomaron 15  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra para cargar en el gel. La electroforesis se corrió a 15 mA constantes y a su término, el gel se tiñó con azul de Coomassie R250, las bandas de proteína se resolvieron mediante la solución 40% metanol y 10% ácido acético. El resultado fue documentado utilizando un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager de Bio-Rad.

Después de identificar la banda de interés de 19 kDa en las muestras preparadas, se procedió a purificar la proteína Ps19 mediante electroelución conforme al protocolo del Electro-Eluter Model 422 (Cat. No. 165-2976) de Bio-Rad. Brevemente, en un gel de poliacrilamida discontinuo 4% y 12% se cargaron 5  $\mu$ L del marcador de bajo peso molecular (17-0446-01, Amersham Biosciences)

en el primer carril y 15  $\mu$ L del sobrenadante de las muestras de AIM en los carriles posteriores, la electroforesis se corrió a 15 mA constantes. Al finalizar la electroforesis, se cortaron verticalmente los dos primeros carriles y se teñieron con SymplyBlue SafeStain para ubicar la posición de la banda de 19 kDa. Posteriormente, con ayuda de una reglilla se colocó la tira del gel teñida al costado del resto del gel no teñido y se cortó horizontalmente la banda de interés del resto de los carriles. La tira del gel obtenida se cortó en trozos pequeños, los cuales se colocaron dentro de los tubos de electroelución con membranas de 15 kDa. La electroelución se realizó en un dispositivo Modelo 422 de Bio-Rad a 10 mA por tubo en agitación constante durante 5 horas. Finalmente, las diluciones se colectaron.

### **6.5.1 Electroforesis SDS-PAGE de eluciones colectadas**

Se verificó la presencia de la proteína Ps19 en las eluciones colectadas mediante electroforesis SDS-PAGE. Se tomaron 15  $\mu$ L de cada elución y se mezclaron con 5  $\mu$ L de amortiguador de carga 4X (0.125 M Tris, 8% SDS, 30% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8, 80  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol). Para la identificación de la banda de 19 kDa se utilizó un marcador de bajo peso molecular (17-0446-01, Amersham Biosciences) y 5  $\mu$ L de las muestras preparadas de AIM. La electroforesis se corrió a 15 mA constantes. A continuación, las bandas se resolvieron mediante la tinción de nitrato de plata (Rabilloud *et al.*, 1994).

### **6.5.2 Tinción de Nitrato de plata**

Al término de la electroforesis, el gel se lavó con agua destilada y se incubó durante 5 minutos en solución de fijación (10% etanol y 0.5% ácido acético). Después se realizaron tres lavados con agua destilada por 5 minutos cada uno. Al finalizar la serie de lavados, se incubó con solución de impregnación (800  $\mu$ L de nitrato de plata y 10  $\mu$ L de formaldehído aforados en 20 mL con agua destilada) durante 7 minutos en oscuridad. Posteriormente, se lavó con agua destilada por 10 segundos y se colocó la solución de desarrollo (0.675 g de NaOH y 90  $\mu$ L de formaldehído aforados en 45 mL de agua destilada) hasta observar bandas. Finalmente se colocó la solución de fijación para detener la reacción. Cada paso se realizó en agitación constante. Para visualizar y fotodocumentar se utilizó el equipo Gel Doc EZ Imager de Bio-Rad.

### 6.5.3 Concentración y desalado de eluciones

Las eluciones de proteína se mezclaron y se concentraron por centrifugación a  $4,000 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$  utilizando el Amicon Pro Purification System Ultra 0.5 de Merck con un filtro de corte de 10 kDa. Posteriormente, para desalar el concentrado de eluciones, se añadió 1.5 mL de agua Milli-Q y se centrifugó en las mismas condiciones por 30 min. Finalmente, el concentrado de eluciones se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  y se liofilizó.

### 6.5.4 Densitometría

La cuantificación de la proteína Ps19 del liofilizado utilizado para la estimulación de las MSC, se realizó mediante densitometría de pixeles de acuerdo con el protocolo de Vicent *et al.*, 1997. Primero se realizó una curva estándar con ovoalbúmina (400, 200, 100, 10 y 1 ng/mL), las muestras de ovoalbúmina y del liofilizado de Ps19 (1000 ng/mL) se separaron por medio de electroforesis SDS-PAGE 16%. Después de la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie y se fotodocumentó la imagen con un Gel Doc EZ Imager de Bio-Rad. La imagen se analizó mediante el software Image Lab 5.1 y se determinó el área de cada banda de proteína para obtener su volumen densitométrico y la ecuación lineal (2). Después, la cantidad de proteína presente en el liofilizado (1000 ng/mL) fue calculada mediante la ecuación obtenida de la curva estándar de ovoalbúmina.

$$y = 0.000652x + 38.4 \quad R^2 = 0.956376 \quad (2)$$

### 6.6 Cultivo celular de MSC de médula ósea humana en medio basal

Las células troncales mesenquimales de médula ósea humana (HMSC-bm) Cat. No. 7500 Lot. No. 27020 de ScienCell se descongelaron y cultivaron en medio de cultivo Glasgow Modified Minimum Essential Medium (GMEM) suplementado con suero fetal bovino 10%, aminoácidos no esenciales 1%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, 2-Mercaptoetanol 0.1 mM y solución antibiótico/antimicótico 40 mg/mL (penicilina, estreptomina). Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad relativa. Se realizó el cambio de medio cada tres días y el pasaje cada 5 días para mantener una confluencia del 80%. Para determinar la cinética de crecimiento se sembraron  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pozos con 2 mL de medio de cultivo por pozo, la proliferación y viabilidad celular se evaluó mediante el conteo de células por cm<sup>2</sup> de las 24 a las

192 horas por cuadruplicado. Para los ensayos de diferenciación celular se utilizaron las células entre los pases 2 y 5.

### **6.7 Cultivo celular de MSC de médula ósea humana en medio de diferenciación osteogénica, con ASM y con Ps19**

Se sembraron las MSC a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en cajas de 6 pozos con 2 mL de medio de cultivo. Se trabajó con cuatro grupos: (1) MSC sin estímulo, (2) MSC con medio de diferenciación osteogénica, (3) MSC estimuladas con matriz orgánica soluble (ASM) y (4) MSC estimuladas con Ps19.

Los diferentes medios de cultivo se elaboraron con GMEM suplementado y se adicionaron de acuerdo con el estímulo aplicado. En el grupo de MSC sin estímulo se añadieron 10 µL/mL de PBS. El medio de diferenciación osteogénica consistió en la adición de dexametasona 10 mM, β-glicerolfosfato 10 mM y ácido ascórbico 2.5 mM. En los medios experimentales se utilizó el peso seco de los liofilizados para establecer seis concentraciones de ASM (100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL de medio) y cinco concentraciones de Ps19 (1, 10, 100, 500 y 1000 ng/mL de medio). El liofilizado de Ps19 fue diluido en PBS de acuerdo con cada concentración y posteriormente añadido al medio de cultivo. El extracto de ASM fue previamente preparado para su uso, primero se pesaron las diferentes cantidades del liofilizado para cada concentración y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL estériles. Cada liofilizado se diluyó en PBS con 10 µL de antibiótico/antimicótico, posteriormente los tubos se incubaron bajo luz UV durante 30 min dentro de la cabina de cultivo celular, después de cada uso los tubos se guardaron en congelación. El medio de cultivo fue renovado cada tres días durante 21 días en todos los grupos.

### **6.8 Cinética de crecimiento de MSC de acuerdo con el estímulo aplicado**

Se utilizaron cuatro grupos para estimar la cinética de crecimiento de las MSC de acuerdo con el estímulo aplicado: (1) MSC sin estímulo, (2) MSC cultivadas en medio de diferenciación osteogénica; (3) MSC estimuladas con 200 µg/mL de matriz soluble y (4) MSC estimuladas con 500 ng/mL de Ps19. Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pozos con 2 mL de medio de cultivo por pozo. La proliferación y viabilidad celular se obtuvieron mediante el conteo de células por cm<sup>2</sup> de las 96 a las 192 horas por triplicado en los grupos 1, 2 y 3, mientras que se realizó una vez en el grupo 4.

Los datos obtenidos del conteo celular se utilizaron para calcular la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación celular ( $Td$ ) en la fase de crecimiento exponencial mediante la fórmula:

$$\mu = \frac{(\ln X_2) - (\ln X_1)}{t_2 - t_1} \quad (3)$$

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

Donde:

$x_1$  =células obtenidas en tiempo 1

$x_2$ = células obtenidas en tiempo 2

$t_1$ : tiempo inicial

$t_2$ : tiempo final

## 6. 9 Inmunofluorescencia

Se determinó por inmunofluorescencia la presencia de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90 en las células troncales mesenquimales de médula ósea humana (MSC) empleadas en los en MSC sin estímulo. y estimuladas con medio de diferenciación osteogénica, con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de matriz soluble y con 500 y 1000  $\text{ng}/\text{mL}$  de Ps19.

Las MSC sin estímulo se cultivaron  $1 \times 10^5$  células/pozo en un sistema de cultivo sobre portaobjetos de 8 pozos. Después de tres días, las células se fijaron con 200  $\mu\text{L}$  de PFA al 4% durante 15 minutos y posteriormente se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de solución de bloqueo (PBS al 10% suero de cabra) durante 30 minutos para bloquear interacciones no específicas proteína-proteína. A continuación, las células se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de los anticuerpos FITC-anti-CD90 humano (clona 5E10, Exbio) y APC-anti-CD73 humano (clona AD2, Exbio) durante 1 hora a 37 °C protegidas de la luz. Se removió el exceso de anticuerpo con PBS y posteriormente se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de DAPI (Lot. 2892743A, Invitrogen) durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se lavaron con PBS y se montaron con cubreobjetos con Pro Long Gold.

Las MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica, con 1000 µg/mL de ASM, con 500 y 1000 ng/mL de Ps19 se recuperaron a los 21 días post-estimulación. Por cada grupo se colocaron  $1 \times 10^5$  células/pozo en un sistema de cultivo sobre portaobjetos de 8 pozos. Se dejaron sedimentando durante una noche y posteriormente se incubaron con 200 µL de solución de bloqueo (PBS al 10% suero de cabra) durante 30 minutos. Enseguida, se incubaron con 100 µL de la solución de los anticuerpos 0.5% FITC-anti-CD90 humano (clona 5E10, Exbio) y 1% APC-anti-CD73 humano (clona AD2, Exbio) en PBS al 2% suero de cabra durante 1:30 horas a 37°C, protegidas de la luz. Después se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos para retirar el exceso de los anticuerpos. A continuación, se incubaron con 100 µL de solución de permeabilización (Tritón 0.1% y PBS al 2% suero de cabra) durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con solución de bloqueo (PBS al 10% suero de cabra) por 30 minutos. Al término de la incubación se lavaron con PBS y se incubaron con 100 µL de una solución al 2% PE-anti-Osteocalcina humana (clona 190125, R&D) en Tritón 0.1% y PBS al 2% suero de cabra durante 12 horas. Se lavaron con PBS y se incubaron con 100 µL de DAPI durante 5 minutos. Finalmente se lavaron con PBS y se montaron con cubreobjetos utilizando Pro Long Gold.

Las células se observaron y se tomaron imágenes mediante un microscopio confocal Olympus FV1000 invertido, con una señal de excitación de 488 nm para FITC-anti-CD90 humano, 647 nm para APC-anti-CD73 humano y 546 para PE-anti-Osteocalcina humana. Las imágenes fueron procesadas con el programa IMAGEJ.

### **6.10 Citometría de flujo**

Después de localizar la expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90 se evaluó el cambio de su expresión y la expresión del marcador osteoblástico Osteocalcina (OCN) en las MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica, con matriz orgánica soluble (ASM) y con la proteína Ps19 mediante citometría de flujo. Primero, se realizó una titulación de los anticuerpos FITC-anti-CD90 humano (clona 5E10, Exbio) y APC-anti-CD73 humano (clona AD2, Exbio) para determinar la concentración adecuada de cada anticuerpo de acuerdo a los histogramas de fluorescencia. Posteriormente se realizó la tinción como se menciona a continuación. Las células fueron cultivadas como se menciona en el apartado 6.3. A los 21 días post-estimulación se colectaron las células de cada grupo en tubos de 15 mL. En este paso, las células estimuladas con

medio de diferenciación osteogénica y con ASM se filtraron con un cell strainer de 40  $\mu\text{m}$ . Después se realizó el conteo celular de cada grupo y se tomaron los microlitros correspondientes para  $5 \times 10^5$  células, las cuales se resuspendieron en 1 mL de Facs juice (suero de cabra al 2% en PBS 1x). Las muestras se centrifugaron a 1,500 rpm por 7 min, se decantó el sobrenadante y se incubaron con 50  $\mu\text{L}$  de solución de bloqueo (suero de cabra al 10% en PBS 1x) en hielo a 4°C durante 30 minutos. Al término de la incubación, se centrifugó a 1,500 rpm por 7 min y se retiró el sobrenadante. Para la tinción, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la dilución de los anticuerpos membranales (1:50) FITC-anti-CD90 humano (clona 5E10, Exbio) y (1:20) APC-anti-CD73 humano (clona AD2, Exbio) diluidos en FACS Juice, se incubaron por 60 min a 4°C protegidos de la luz. Para el control sin tinción, sólo se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de FACS Juice. Después de la incubación, se lavaron con 1 mL de PBS 1x y se centrifugaron a 1,500 rpm por 7 min. Al finalizar la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se fijaron con 100  $\mu\text{L}$  de PFA al 2% en PBS 1x, durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 min y después de retirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de solución de permeabilización (Triton 0.1% en FACS juice) y se incubaron durante 30 min. Al término del tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 1,500 rpm por 7 min y después de retirar el sobrenadante, se incubaron con 50  $\mu\text{L}$  de solución de bloqueo (suero de cabra al 10% en PBS 1x) durante 30 min. Seguidamente, se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de la dilución de Osteocalcina (OCN 2% en solución de permeabilización) durante 12 horas a 4°C protegidos de la luz. Posteriormente, se centrifugaron a 1,500 rpm por 7 min, se retiró el sobrenadante y se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de Facs juice. Finalmente, se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

La citometría de flujo fue realizada en un citómetro BD FACSCanto II (BD, Biosciences) y analizadas con el programa FlowJo (Versión 10.8.1). Los niveles de expresión fueron representados como el cambio de la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) obtenidos mediante:

$$MFI = MFI \text{ positivo} - MFI \text{ negativo} \quad (5)$$

$$\text{Fold change} = \frac{MFI \text{ experimental}}{MFI \text{ control}} \quad (6)$$

$$\% \text{ de cambio de señal} = (1 - \text{Fold change experimental}) \times 100 \quad (7)$$

### **6.11 Tinción de rojo de Alizarina**

Se empleó la tinción de rojo de alizarina para evaluar la mineralización de la matriz extracelular de los cultivos a los 21 días post-estimulación. Las células se lavaron dos veces con 1 mL de PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS durante 15 minutos. Después se lavaron 3 veces con agua destilada y se incubaron con 1 mL de rojo de alizarina 2% (0223, Science Cell) por 30 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS e inmediatamente se añadió 1 mL de PBS para observar la coloración y la presencia de depósitos de calcio por medio de un microscopio óptico invertido. Esta prueba se realizó una vez por cada concentración y grupo experimental.

### **6.12 Análisis estadísticos**

En la evaluación de la proliferación celular, los datos obtenidos del conteo celular (células/cm<sup>2</sup>) se utilizaron para realizar un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc de Dunnet, con el objetivo de determinar cuáles tratamientos disminuían la proliferación respecto al grupo control (MSC no estimuladas). Se comprobó la normalidad de los datos por Shapiro-Wilk. También, los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc de Tukey para establecer las diferencias entre los distintos grupos experimentales. De igual manera, previamente se comprobó la normalidad por Shapiro-Wilk.

Respecto a la obtención de MFI-Fold change se calculó a partir del promedio de la intensidad de fluorescencia para cada marcador.

Los análisis estadísticos y la elaboración de gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad-Prism8. Se estableció un nivel de significancia  $\alpha= 0.05$ , considerando valores  $p^* \leq 0.05$ .

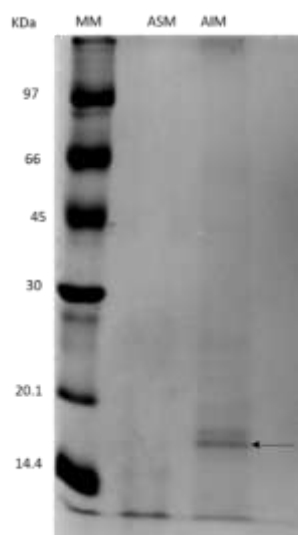
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Extracción de las proteínas de la matriz orgánica de la concha de *P. sterna*

Las proteínas de la matriz orgánica soluble en ácido acético (ASM, *acid soluble matrix*) y de la fracción insoluble (AIM, *acid insoluble matrix*) de la concha de *P. sterna* fueron extraídas con ácido acético glacial al 10%. De los 20 g de concha pulverizada se obtuvieron 179 mL de ASM. Después de su diálisis y liofilización se obtuvieron 7,230 mg con una masa de proteína de 273.208 mg de acuerdo con la cuantificación realizada por el método de Lowry (Anexo 11.1). De la AIM se obtuvieron 1,470 mg de extracto crudo, el cual fue utilizado para purificar la proteína Ps19 por electroelución. Las proteínas de la ASM (1 mg) y AIM (1 mg) fueron separadas mediante electroforesis, en la muestra de AIM se observó la banda de proteína de mayor concentración de 19 kDa (Fig. 8).

**Tabla 1.** Extracción de ASM y AIM de la concha de *P. sterna* con AAG 10%.

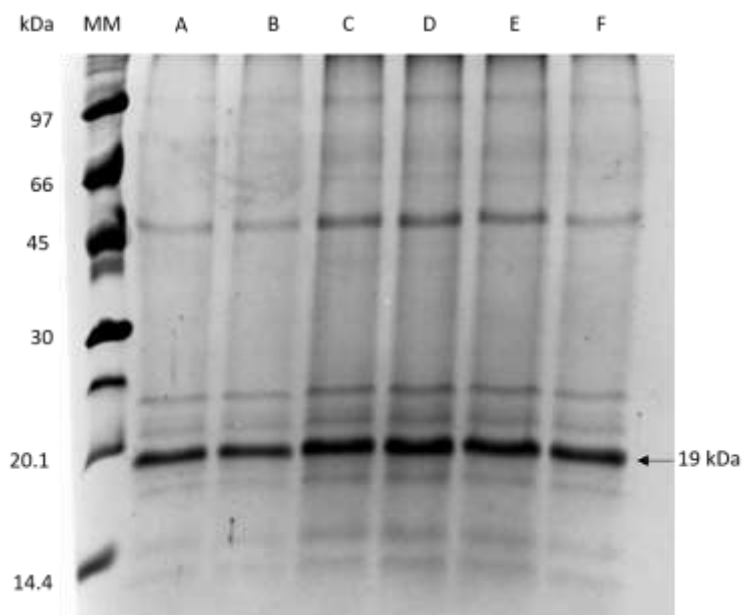
Concha molida	ASM (extracto crudo)	AIM (extracto crudo)
20 g	7230 mg	1470 mg



**Figura 8.** Perfil electroforético de proteínas de la matriz orgánica de la concha de *P. sterna* de las fracciones soluble e insoluble. SDS-PAGE de poliacrilamida al 12%. Tinción con azul de Coomassie. MM: marcador molecular; ASM: proteínas solubles de la matriz; AIM: proteínas insolubles de la matriz.

## 7.2 Purificación de la proteína Ps19

Para aislar la proteína Ps19, primero se prepararon diferentes muestras con 25 mg del extracto crudo de AIM para separar las proteínas mediante SDS-PAGE al 16% e identificar la proteína de interés previamente a su purificación. La banda de la proteína Ps19 presentó mayor abundancia de la fracción AIM y una masa relativa de 19 kDa (Fig. 9), como fue descrita previamente por Arroyo *et al.* (2020).

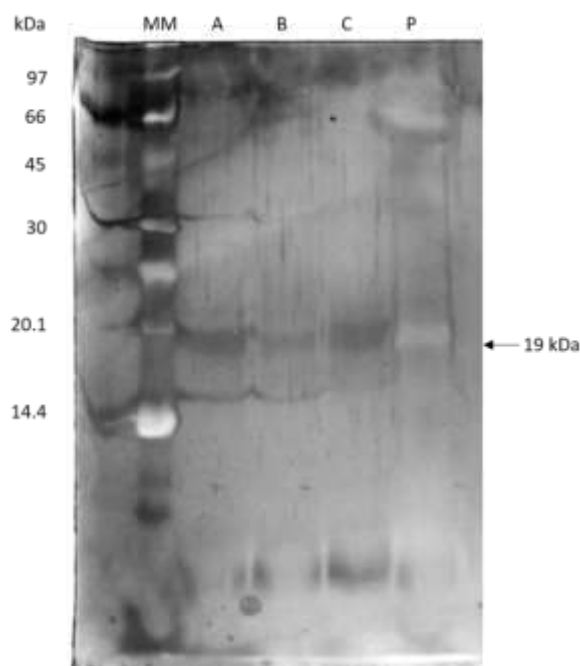


**Figura 9.** Perfil electroforético de muestras del extracto crudo de AIM de la concha de *P. sterna* en SDS-PAGE al 16%. Tinción con azul de Coomassie. MM: marcador molecular; A-F: AIM. La flecha indica la banda de la proteína Ps19.

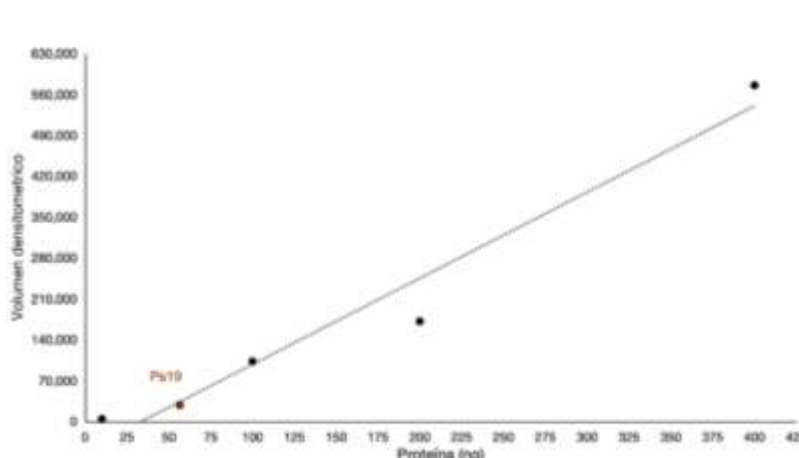
Una vez identificada la proteína Ps19 en las muestras de la fracción de AIM, se procedió a su purificación mediante electroelución. En total, se realizaron 12 electroeluciones empleando 25 mg de extracto crudo en cada una, se obtuvo un pool de eluciones de 20.5 mL, el cual fue desalado y concentrado por centrifugación y posteriormente liofilizado. Finalmente, se obtuvo un liofilizado de 1.5 mg.

### 7.3 Cuantificación de la proteína Ps19 del liofilizado mediante densitometría

Para cuantificar la proteína del liofilizado de Ps19, se realizó una curva estándar de ovoalbúmina, la cual fue separada en un gel 16% SDS-PAGE. El gel fue teñido, fotodocumentado y analizado para obtener la cantidad de píxeles de cada banda de la curva. Se obtuvo la ecuación lineal  $y = 0.000652 * x + 38.4$  ( $R^2 = 0.956376$ ) utilizada para estimar la concentración de proteína. La concentración de proteína del liofilizado de Ps19 preparado a 1000 ng/mL (peso seco) fue de 56.554 ng de proteína (Fig. 11).



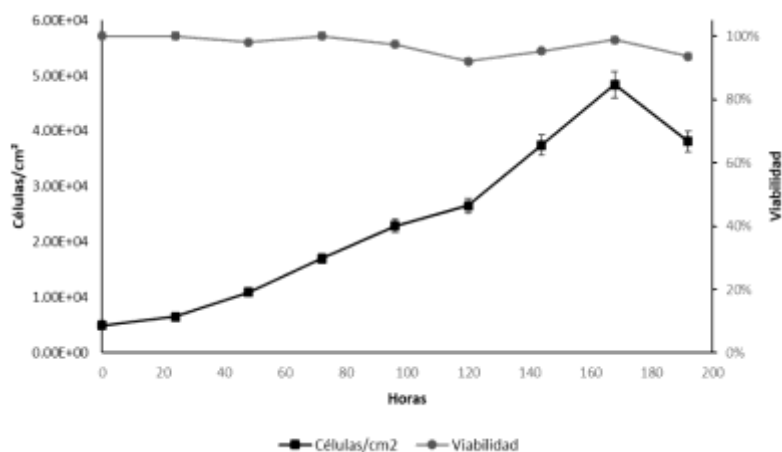
**Figura 10.** Bandas de Ps19 de las eluciones obtenidas mediante electroelución. SDS-PAGE al 16%. Tinción nitrato de plata. MM: marcador molecular; A-C: eluciones; P: extracto crudo AIM. La flecha indica las bandas de la proteína Ps19.



**Figura 11.** Cuantificación de proteína obtenida en el liofilizado de Ps19 (punto café) por densitometría.

#### 7.4 Cinética de crecimiento de células troncales mesenquimales de médula ósea humana (MSC)

Las células troncales mesenquimales de médula ósea humana (MSC) cultivadas en medio GMEM suplementado presentaron una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.01248 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación ( $T_d$ ) de 55.49 horas durante el crecimiento exponencial de las 120 a las 168 horas. Las tres réplicas realizadas mantuvieron la viabilidad superior al 90% (Fig. 12).



**Figura 12.** Curva de proliferación celular de MSC.

##### 7.4.1 Cinética de crecimiento de MSC de acuerdo con el estímulo aplicado

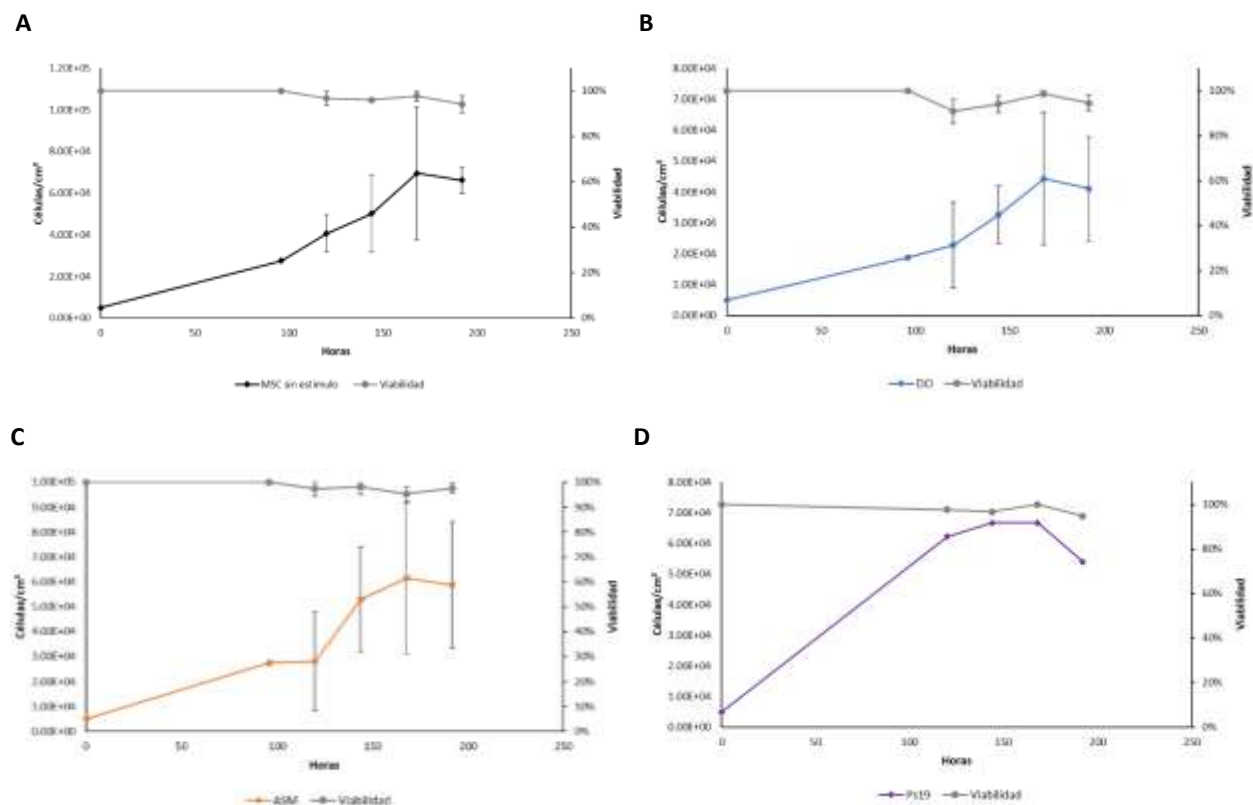
Se obtuvo la proliferación y la viabilidad de las MSC de acuerdo al estímulo aplicado: (1) MSC sin estímulo, (2) MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica; (3) MSC estimuladas con  $200 \mu\text{g/mL}$  de matriz orgánica soluble en ácido acético (ASM) y (4) MSC estimuladas con  $500 \text{ ng/mL}$  de Ps19.

Los cultivos con medio basal, con medio de diferenciación osteogénica y con  $200 \mu\text{g/mL}$  de matriz soluble presentaron una curva de proliferación similar, con una fase de latencia de las 0 a 120 horas, seguida de una fase logarítmica de crecimiento exponencial de 120 a 168 horas y posteriormente una fase de meseta en la que la tasa de crecimiento disminuyó a partir de las 168 horas (Fig. 13). La viabilidad celular se mantuvo superior al 90% en las tres réplicas de los cultivos de cada grupo. A partir de la curva de proliferación celular se determinó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $T_d$ ) durante la fase exponencial (Tabla 2). Las células no estimuladas presentaron la menor velocidad específica de crecimiento ( $0.011 \text{ h}^{-1}$ ) y el mayor tiempo de duplicación celular (62 horas). En contraste, las células estimuladas con  $200 \mu\text{g/mL}$  de

matriz soluble ( $\mu$  0.0131  $h^{-1}$ , Td 52 horas) y con medio de diferenciación osteogénica ( $\mu$  0.0138  $h^{-1}$ , Td 50 horas).

Los datos obtenidos del conteo celular de las 120 a 192 horas mostraron que el medio de diferenciación osteogénica produjo una disminución significativa en la proliferación celular ( $p=0.0433$ ), mientras que el estímulo con ASM no mostró diferencias significativas ( $p=0.7431$ ) (Fig. 14).

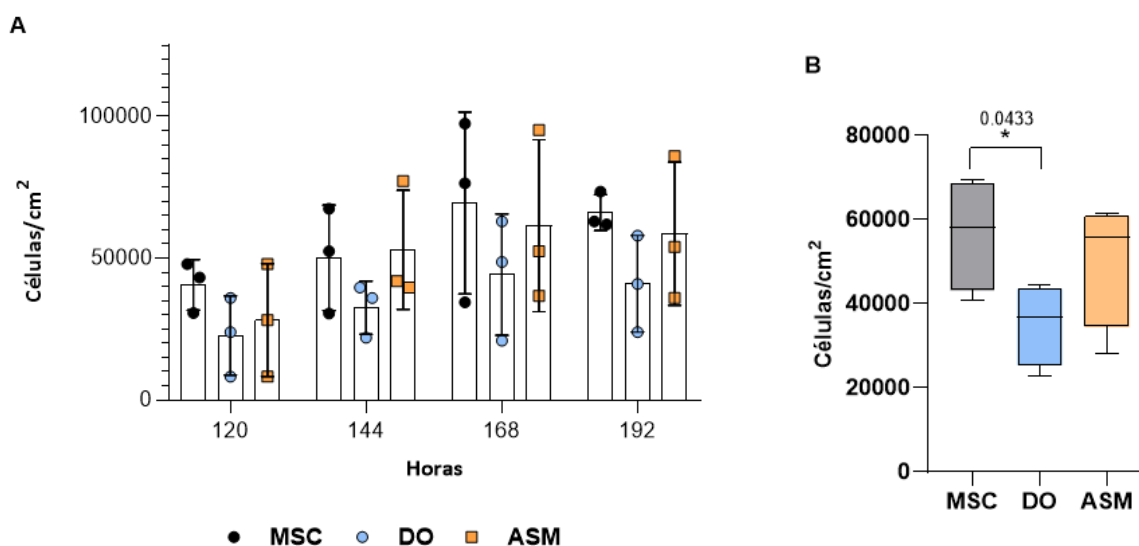
Los datos obtenidos de las células estimuladas con 500 ng/mL de Ps19 sugieren un incremento de la densidad celular de las 0 a las 120 horas, una fase estacionaria entre las 144 y 168 horas y un declive de la proliferación celular a las 192 horas (Fig. 13-D). Sin embargo, es necesario obtener datos durante las 0 y 120 horas por triplicado para determinar la fase de crecimiento exponencial y estimar la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación (Td).



**Figura 13.** Curva de proliferación celular de MSC de acuerdo al estímulo aplicado. A) sin estímulo, estimuladas B) con medio de diferenciación osteogénica (DO), C) con 200  $\mu$ g/mL de ASM y D) con 500 ng/mL de Ps19. Las barras indican desviación estándar.

**Tabla 2.** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación (Td).

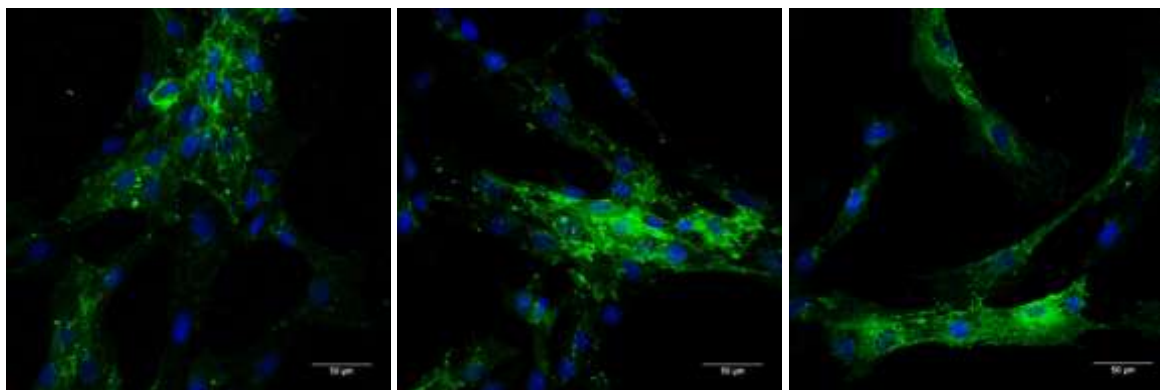
Grupo	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Td
MSC sin estímulo	0.01116	62.08237
Diferenciación osteogénica	0.01386	50.00985
ASM 200 $\mu$ g/mL	0.01316	52.63137



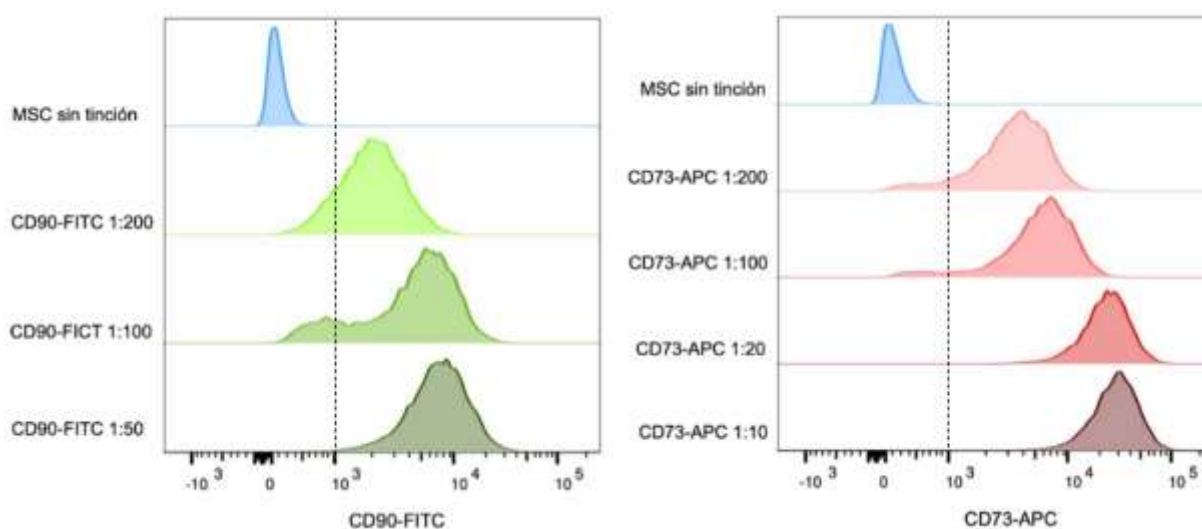
**Figura 14.** A) Proliferación celular de cada grupo de las 120 a las 192 horas. B) Efecto de los medios de cultivo sobre la proliferación ( $p \leq 0.05$ ). MSC no estimuladas (MSC), estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (DO) y estimuladas con 200  $\mu$ g/mL de matriz orgánica soluble en ácido acético (ASM).

### 7.5 Marcadores CD73 y CD90 en células troncales mesenquimales de médula ósea

Antes de aplicar los diferentes estímulos a evaluar, se observó la morfología fibroblástica de las células troncales mesenquimales de médula ósea humana (MSC) y se confirmó la expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90 (Fig. 16). De igual manera, mediante fluorescencia se localizó la expresión de CD90 en las membranas celulares y se observó la morfología fibroblastoide (Fig. 15).



**Figura 15.** Células troncales mesenquimales de médula ósea (MSC) con morfología fibroblastoide y expresión de CD90 en la membrana celular en verde y núcleos celulares en azul.



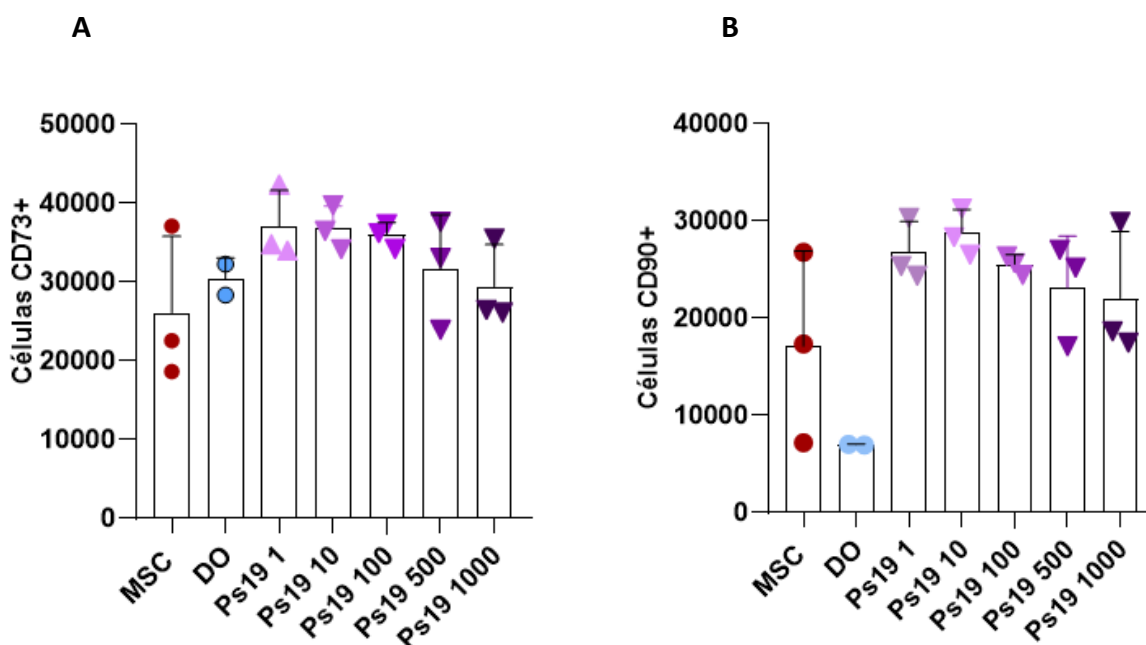
**Figura 16.** Histogramas de fluorescencia de CD90-FITC (1:200, 1:100 y 1:50) y CD73-APC (1:200, 1:100, 1:20 y 1:10) en MSC, obtenidos por citometría de flujo.

### 7.6 Expresión de CD73 y CD90 en células estimuladas con Ps19

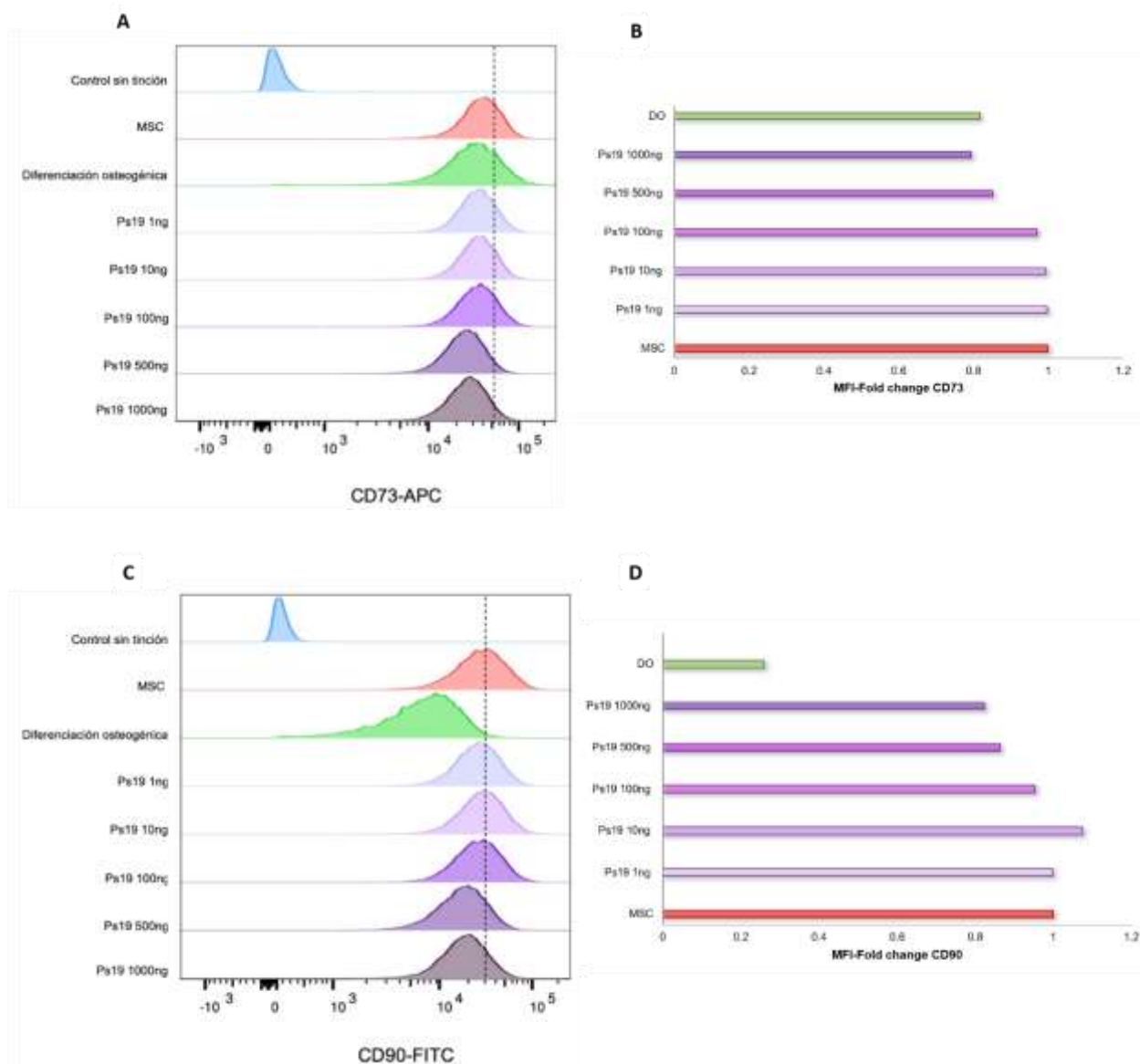
A continuación, se evaluó si la expresión de los marcadores mesenquimales cambiaba tras el estímulo con medio de diferenciación osteogénica y con Ps19 a diferentes concentraciones (1, 10, 100, 500 y 1000 ng/mL). A los 21 días post-estimulación, se evaluó el cambio de expresión de CD73 y CD90 mediante citometría de flujo. Aunque los resultados mostraron que el porcentaje de células positivas para ambos marcadores no presentó diferencias significativas (Fig. 17), se observó una tendencia hacia la disminución.

Los histogramas de fluorescencia de las MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica presentaron un desplazamiento del pico de fluorescencia hacia la izquierda para ambos marcadores, indicando una disminución de expresión. De acuerdo al MFI-Fold change, la señal de fluorescencia disminuyó un 18% (0.813) para CD73 y 76% (0.24) para CD90 respecto a las MSC sin estímulo (Fig. 18).

Las MSC estimuladas con Ps19 mostraron una tendencia a disminuir la expresión de CD73 y CD90, los histogramas de intensidad de fluorescencia de ambos marcadores mostraron un desplazamiento del pico hacia la izquierda en correspondencia al aumento de la concentración de Ps19 (Fig. 18-A y C). El estímulo con 1000 ng/mL de Ps19 indicó una disminución de señal del 21% (0.789) para CD73 y del 18% (0.82) para CD90. Se observó que a una concentración de 10 ng/mL se obtuvo un MFI-Fold change de 1.078 representando un aumento del 7% de la expresión respecto al grupo control (Fig. 18-D).



**Figura 17.** Porcentaje de células positivas para marcadores mesenquimales. A) CD73 B) CD90. MSC sin estímulo  $n=3$  (rojo), MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica  $n=2$  (azul) y MSC estimuladas con Ps19 a diferentes concentraciones ng/mL  $n=3$  (morado).

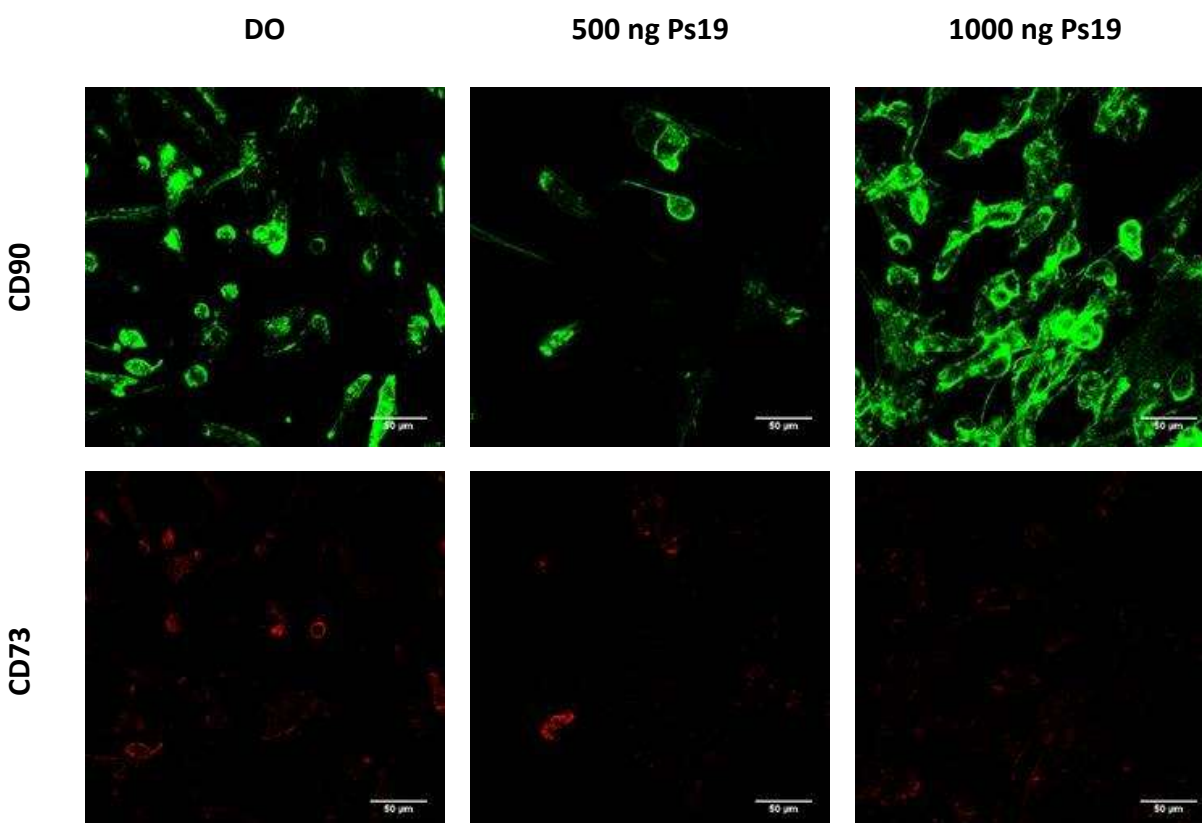


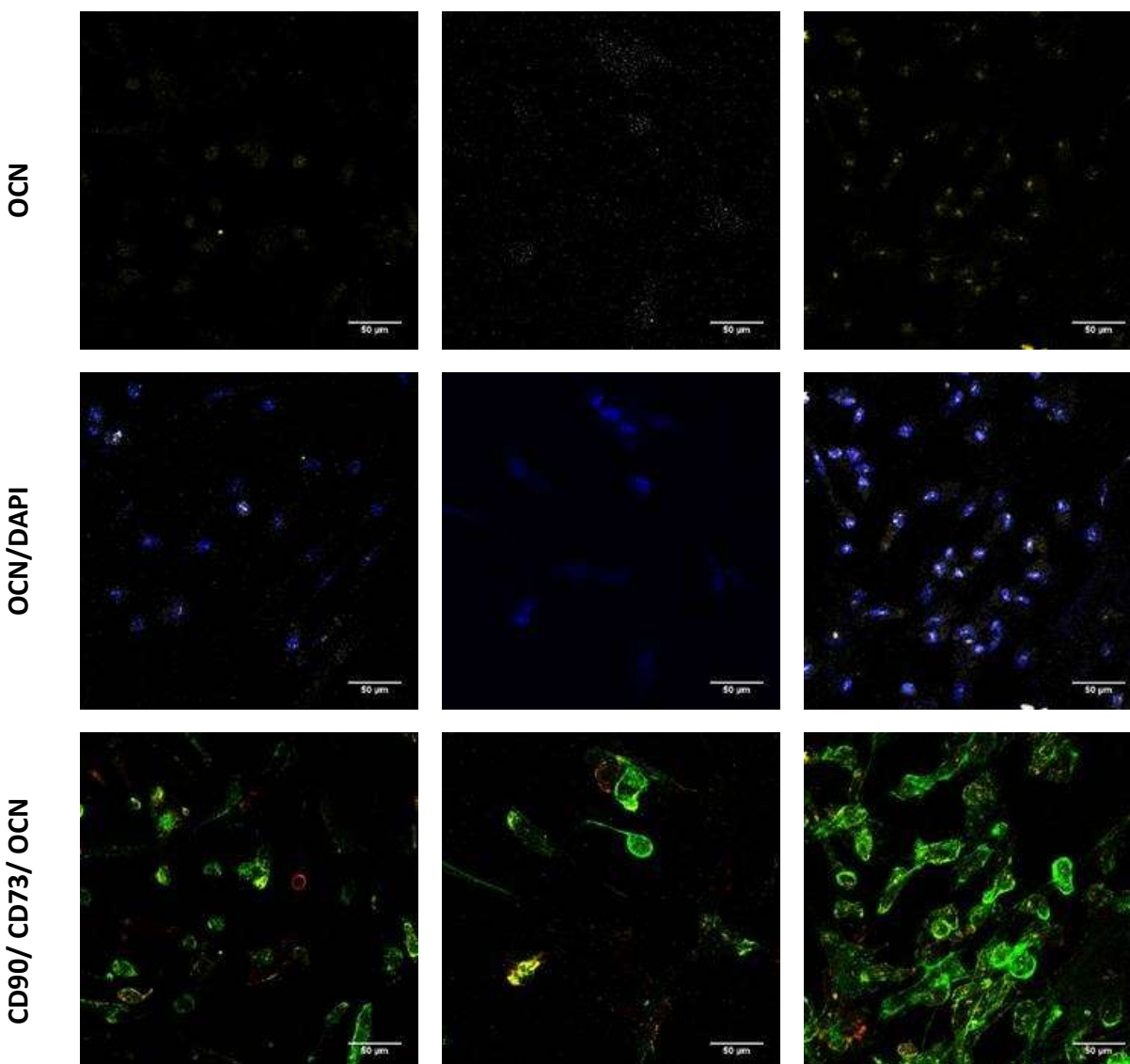
**Figura 18.** Citometría de flujo de MSC estimuladas con Ps19. A) Histograma de intensidad de fluorescencia de CD73 en las células estimuladas con diferentes concentraciones de Ps19 (histograma representativo). B) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) para CD73 (n=3). C) Histograma de intensidad de fluorescencia de CD90 en las células estimuladas con diferentes concentraciones de Ps19 (histograma representativo). D) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) para CD90 (n=3). Control sin tinción(azul), MSC sin estímulo (rojo), MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (verde) y MSC estimuladas con Ps19 a diferentes concentraciones ng/mL (morado). MFI-Fold change =1 sin cambio de expresión, >1 aumento de expresión y <1 disminución de expresión.

### 7.7 Expresión de CD73, CD90 y Osteocalcina en células estimuladas con medio de diferenciación osteogénica y con Ps19

Para investigar si la proteína Ps19 promovía la diferenciación osteogénica se evaluó la expresión del marcador osteoblástico Osteocalcina (OCN) en MSC del pase 4 estimuladas con 500 ng/mL y 1000 ng/mL de Ps19 y se corroboró su expresión en MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica, consideradas como grupo control positivo para estos análisis.

A los 21 días post-estimulación tanto en las células estimuladas con Ps19, como en las estimuladas con medio de diferenciación osteogénica, se observó una morfología prismática o circular y se localizó la expresión de CD73 y CD90 en la membrana celular y la expresión intracelular de OCN por medio de inmunofluorescencia (Fig. 19).





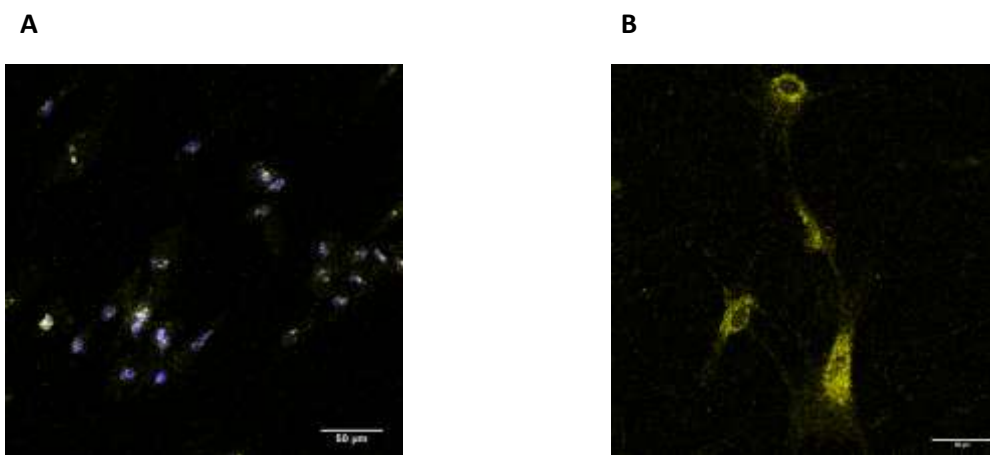
**Figura 19.** Inmunofluorescencia de MSC del pase 3 post-estimuladas durante 21 días con medio de diferenciación osteogénica (DO), 500 y 1000 ng/mL de Ps19. Tinción: CD90 (verde), CD73 (rojo), OCN (amarillo) y DAPI (azul).

### **7.8 Expresión de OCN de acuerdo con el pase celular en MSC estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19**

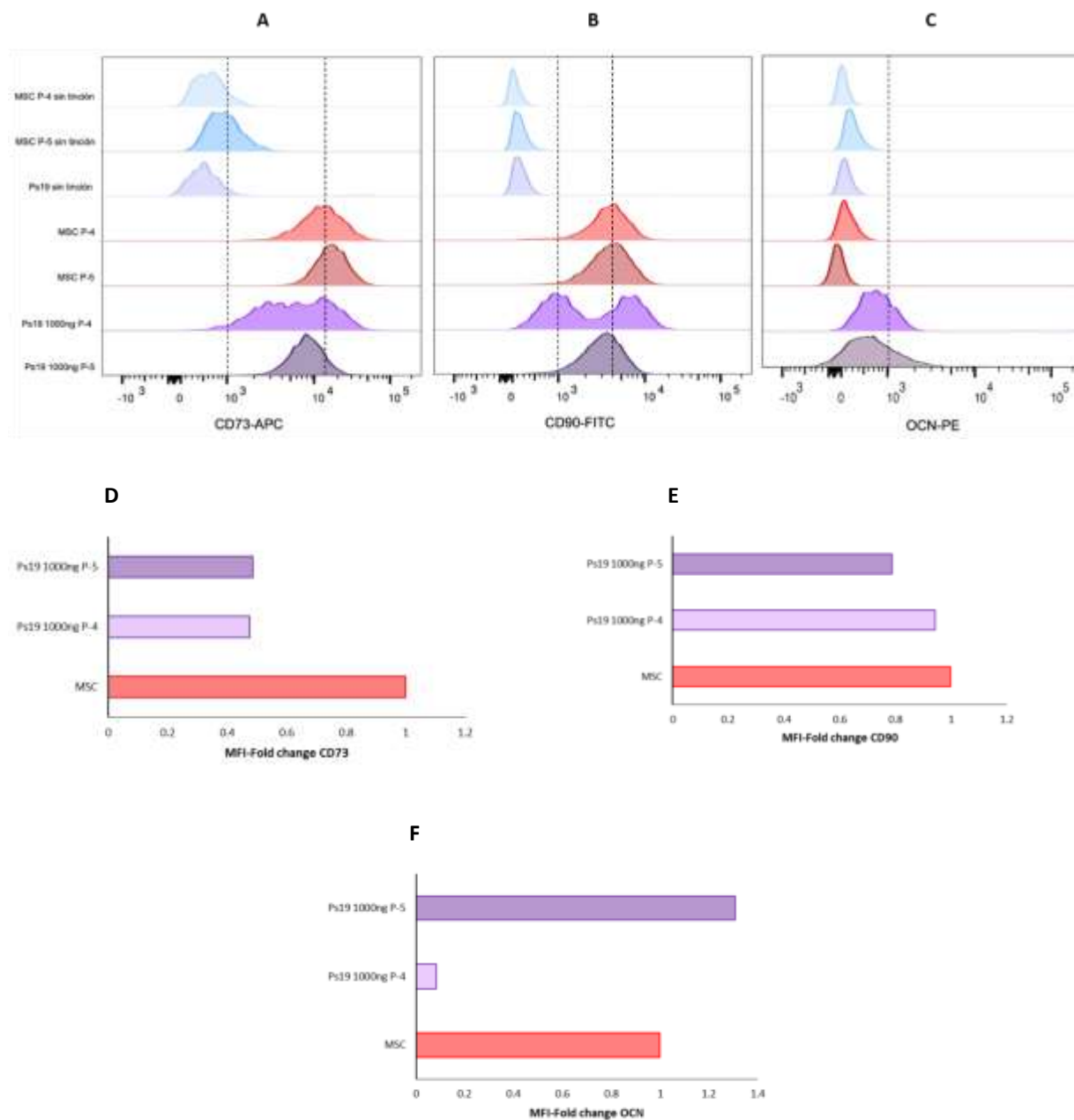
Con el objetivo de ampliar las observaciones, se analizó por citometría de flujo la expresión de OCN en MSC estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19 ya que los resultados anteriores mostraron una disminución de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90 y se localizó la expresión de OCN a esa concentración. De la misma forma, las MSC del pase 4 y 5 fueron estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19 durante 21 días. Los histogramas de intensidad de fluorescencia para CD73 y CD90

mostraron un desplazamiento del pico hacia la izquierda sugiriendo una disminución de expresión de ambos marcadores; mientras que, los histogramas de fluorescencia para OCN indicaron una diferencia de expresión de acuerdo al pase celular (Fig. 21), lo cual fue corroborado mediante el análisis de MFI-Fold change.

Las MSC estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19 del pase 4 mostraron una tendencia a disminuir la expresión de CD73 (52%), CD90 (56%) y OCN (91%) respecto a las MSC sin estímulo. En contraste, las MSC estimuladas del pase 5 mostraron una tendencia a aumentar la expresión de OCN (30%) y a mantener la disminución de CD73 (51%) y CD90 (21%). Aunque estos resultados son exploratorios y requieren ser comprobados con más ensayos para determinar el efecto observado, de manera coherente con esta observación, se evidenció una diferencia en la localización de la expresión de OCN de acuerdo al pase celular. Interesantemente, en MSC del pase 4 estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19 la expresión de OCN se localizó dentro del núcleo y alrededor de éste, mientras que en las MSC del pase 5 tratadas con el mismo estímulo, su expresión se localizó en todo el citoplasma (Fig. 20).



**Figura 20.** Localización de OCN en MSC estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19. A) MSC del pase 4; B) MSC del pase 5. Tinción: OCN-PE (amarillo) y DAPI (azul). En B) no se realizó la tinción con DAPI.



**Figura 21.** Citometría de flujo de MSC estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19. A–C) Histogramas representativos de intensidad de fluorescencia de los marcadores de troncalidad CD63 y CD90, y del marcador osteoblástico OCN, en MSC del pase 4 (P4) y pase 5 (P5) ( $n = 1$ ). D–F) Intensidad media de fluorescencia (MFI; fold change) en MSC de P4 y P5, mostrando los niveles relativos de expresión de CD73, CD90 y OCN en comparación con MSC sin estímulo. Controles: sin tinción (azul), MSC sin estímulo (rojo) y MSC estimuladas con Ps19 (morado).

### **7.9 Efecto de la matriz orgánica soluble sobre células la expresión de CD73 y CD90**

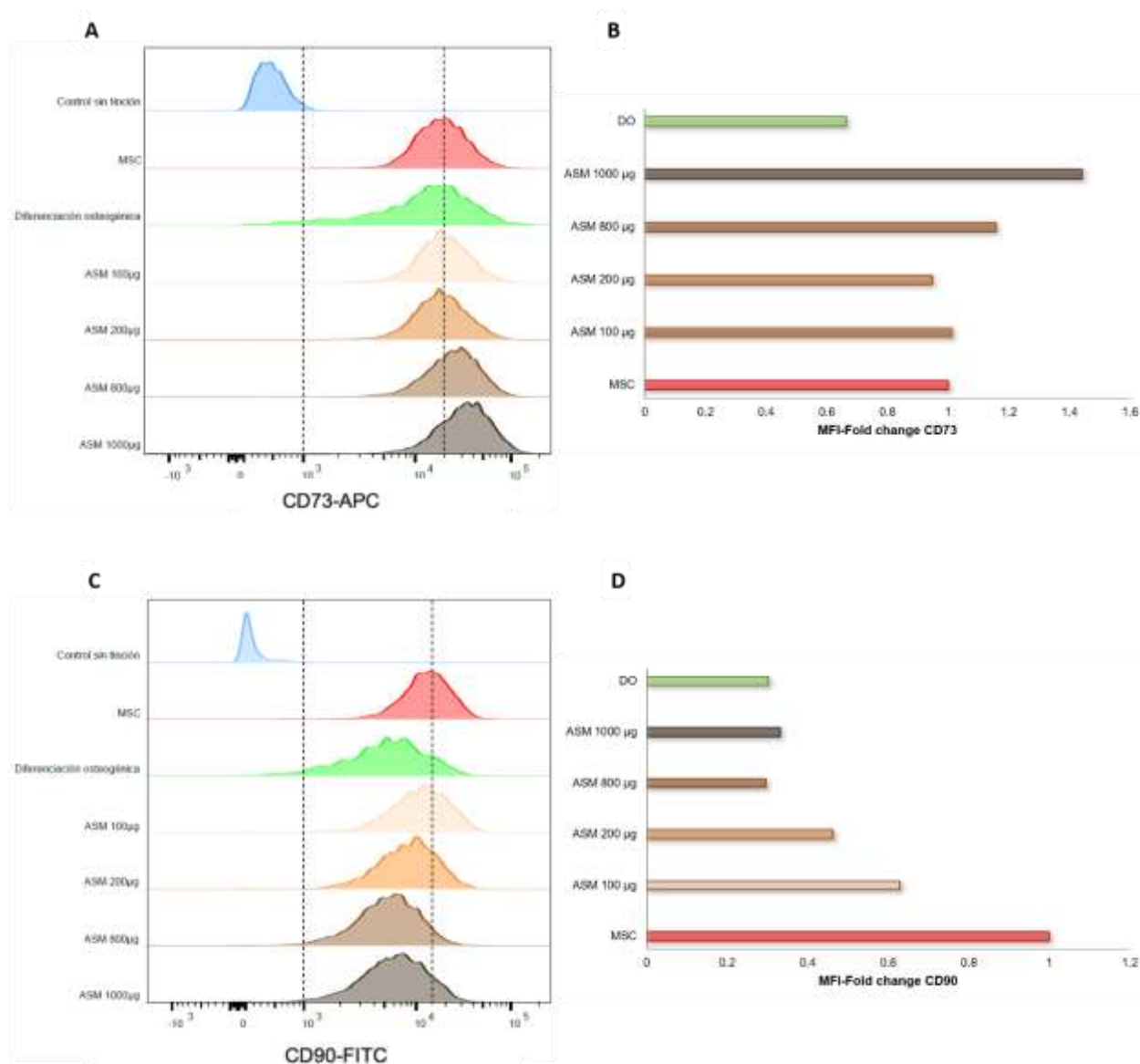
Al igual que los experimentos realizados con la proteína Ps19, se evaluó si la matriz orgánica soluble (ASM) inducía cambios en la expresión de los marcadores mesenquimales y en el marcador osteoblástico OCN. Para los ensayos de diferenciación celular, se utilizaron los grupos experimentales anteriores: MSC no estimuladas, MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica y MSC estimuladas con diferentes concentraciones de ASM.

A los 21 días post-estimulación se observó una tendencia a disminuir la señal de fluorescencia para ambos marcadores en las MSC del pase 4 estimuladas con medio de diferenciación osteogénica respecto al grupo de células sin estimular, con un MFI-Fold change de 0.64 y 0.27, indicando una disminución del 36% para CD73 y 73% para CD90 respecto al grupo de MSC no estimuladas.

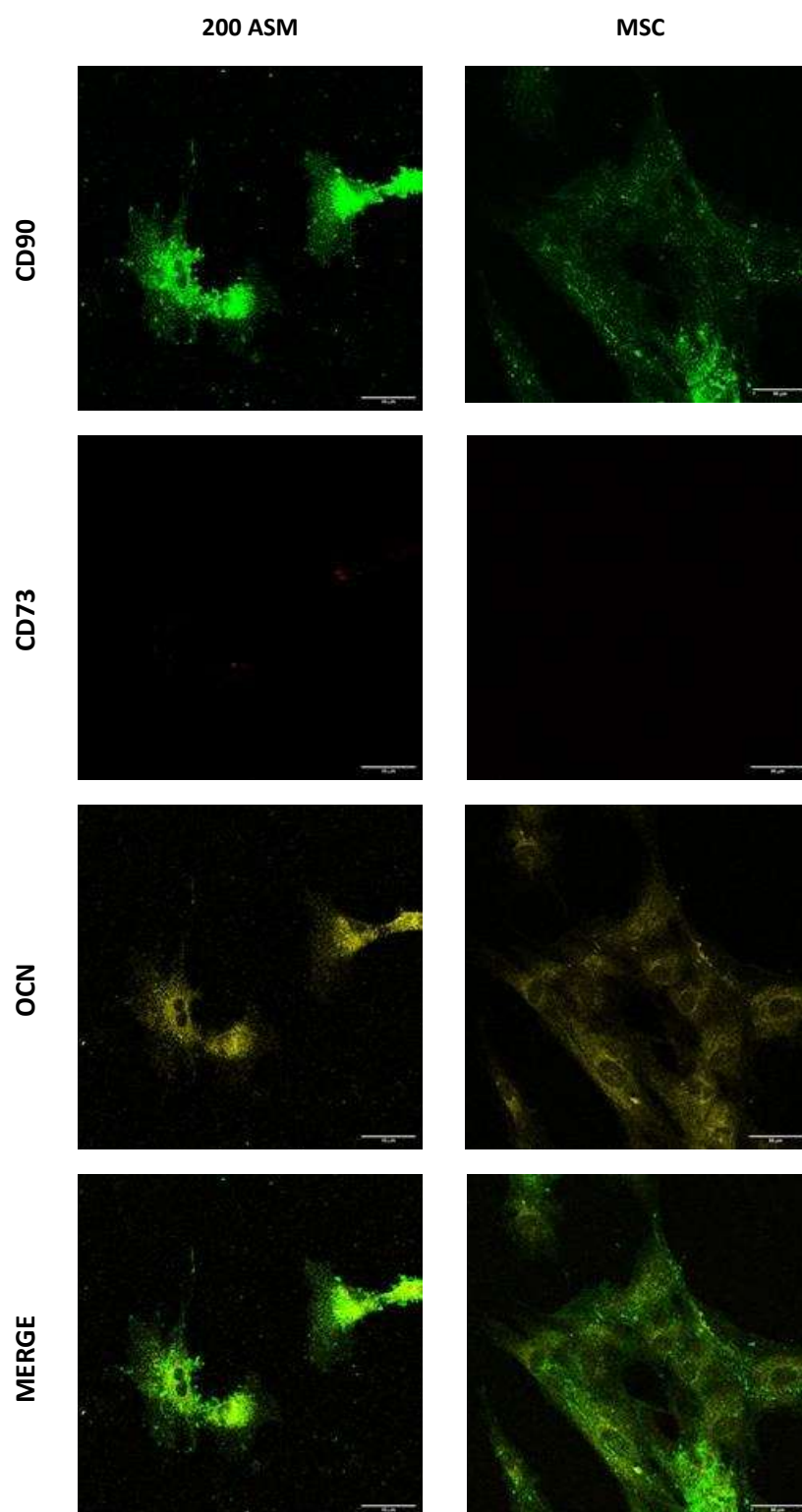
Las células MSC estimuladas con ASM mostraron una tendencia a aumentar la expresión de CD73, a la concentración de 200 µg/mL (4%), 800 µg/mL (16%) y a 1000 µg/mL (44%). En cambio, se observó una disminución de la expresión de CD90 en las células estimuladas con las diferentes concentraciones de matriz soluble, con un mínimo de expresión a 800 µg/mL donde se obtuvo un MFI-Fold change de 0.28, representando una disminución de la expresión del 72% en relación al grupo de células no estimuladas (Fig. 20).

### **7.10 Las células estimuladas con ASM expresaron CD73, CD90 y Osteocalcina.**

Para analizar si el estímulo de la ASM producía un efecto sobre la diferenciación osteogénica de las MSC, se evaluó por inmunofluorescencia la expresión de OCN de las MSC del pase 5 post-estimuladas con 200 µg/mL de ASM durante 21 días. Se demostró la expresión de los marcadores de troncalidad CD73 y CD90 en la membrana celular, también se localizó la expresión intracelular de Osteocalcina en estos cultivos celulares. Sin embargo, también se localizó la expresión de OCN en las MSC no estimuladas del pase 5 (Fig. 23), este resultado no fue observado en las MSC no estimuladas del pase 4, en las cuales no se observó la expresión de OCN.



**Figura 22.** Citometría de flujo de MSC estimuladas con ASM. A) Histograma de intensidad de fluorescencia de CD73 en las células estimuladas con diferentes concentraciones de matriz orgánica soluble (ASM). B) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) para CD73 ( $n=1$ ). C) Histograma de intensidad de fluorescencia de CD90. D) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI-Fold change) para CD90 ( $n=1$ ). MFI-Fold change = 1 sin cambio de expresión, >1 aumento de expresión y <1 disminución de expresión. MSC sin estímulo (rojo), MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (verde) y MSC estimuladas con ASM a diferentes concentraciones µg/mL (naranja-café).

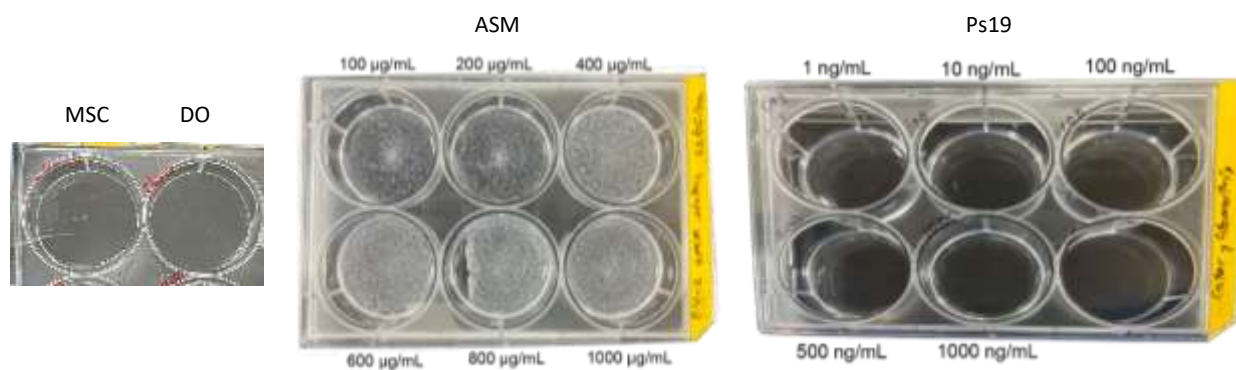


**Figura 23.** Inmunofluorescencia de MSC del pase 5 post-estimuladas durante 21 días con 1000 ng/mL de Ps19, con 200  $\mu$ g/mL de ASM y sin estímulo (MSC). Tinción: CD90 (verde), CD73 (rojo) y OCN (amarillo).

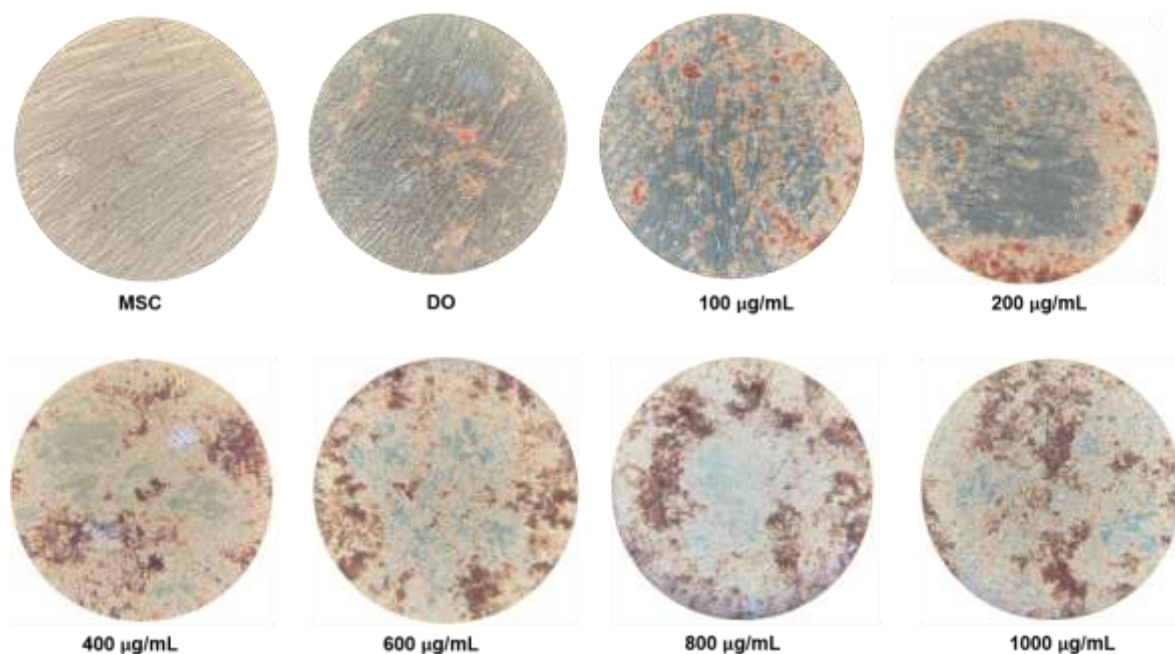
### 7.11 Las células estimuladas con medio de diferenciación osteogénica y con matriz soluble presentaron tinción de rojo de Alizarina positiva

Los resultados obtenidos anteriormente sugieren que las MSC estimuladas con el medio de diferenciación osteogénica, con 1000 ng/mL de Ps19 y con ASM podrían presentar un compromiso osteogénico, por lo tanto, se realizó la tinción de rojo de Alizarina para evaluar la mineralización de la matriz extracelular a los 21 días post-estimulación.

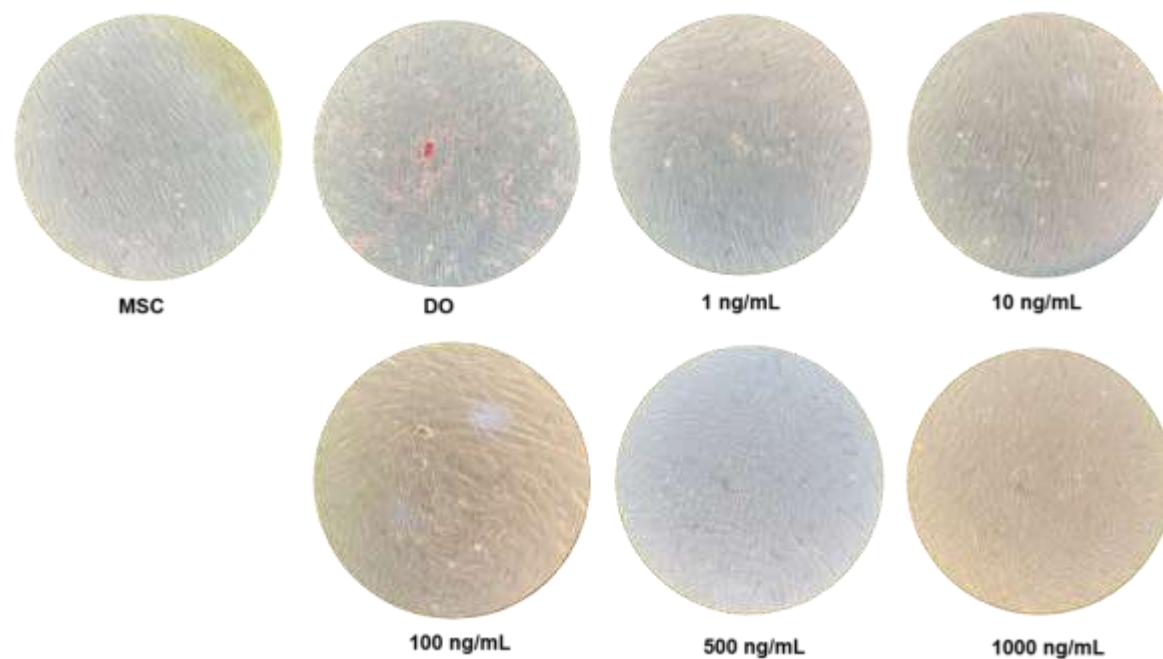
Antes de realizar la tinción, en los cultivos celulares estimulados con ASM se observó una matriz extracelular abundante sobre la que se adherían fuertemente las células (Fig. 24), lo cual representó un problema técnico para realizar los análisis de citometría de flujo de estos cultivos. Se observó una tinción positiva con gránulos de coloración roja en los cultivos de MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénica y con ASM (Fig. 25). En cambio, en los cultivos de MSC sin estímulo y estimuladas con Ps19 no se observó coloración (Fig. 26).



**Figura 24.** Matriz extracelular observada de MSC a los 21 días de cultivo. MSC sin estímulo (MSC), tratadas con medio de diferenciación osteogénica (DO), con diferentes concentraciones de matriz orgánica soluble (ASM) y de Ps19.



**Figura 25.** Tinción de Rojo de Alizarina de MSC estimuladas durante 21 días con 100, 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de matriz orgánica soluble (ASM), sin estimular (MSC) y estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (DO). Imágenes tomadas por microscopio óptico a 40X.



**Figura 26.** Tinción de Rojo de Alizarina de MSC estimuladas durante 21 días con 1, 10, 100, 500 y 1000  $\text{ng}/\text{mL}$  de Ps19, sin estimular (MSC) y estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (DO). Imágenes tomadas por microscopio óptico a 20X.

## 8. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han demostrado el efecto osteogénico de los extractos proteicos de la matriz orgánica y de algunas proteínas purificadas del nácar de las ostras perleras sobre la diferenciación de fibroblastos y osteoblastos primarios humanos, así como preosteoblastos y células estromales de médula ósea murinas. Estos estudios sugieren que dicho efecto podría atribuirse a las similitudes estructurales y funcionales entre las proteínas del nácar y aquellas involucradas en la formación ósea en vertebrados. Además, el hallazgo de genes homólogos que participan en la formación del hueso y de la concha de bivalvos sugiere que existe una similitud entre ambos procesos de biomineralización. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han evaluado el efecto de las proteínas del nácar en células ya diferenciadas o comprometidas con el linaje osteoblástico, por lo que el mecanismo mediante el cual estimulan la diferenciación osteogénica aún no se comprende completamente.

En el presente estudio se evaluó el efecto del extracto proteico de la matriz orgánica soluble en ácido acético (ASM) y de la proteína Ps19, ambos provenientes de la concha de *Pteria sterna*, sobre la diferenciación de células troncales mesenquimales de médula ósea humana (MSC) hacia el linaje osteogénico. Debido a que las MSC son consideradas una herramienta clave en terapia celular y medicina regenerativa, esta investigación aporta evidencia sobre el potencial osteogénico de las proteínas del nácar en células no comprometidas, contribuyendo así a la comprensión de su posible aplicación biomédica.

En el modelo clásico de diferenciación osteogénica, se ha propuesto que uno de los eventos característicos es la disminución progresiva de la proliferación de las MSC, acompañada por el incremento en la actividad de fosfatasa alcalina (ALP), la expresión de marcadores osteoblásticos y la mineralización de la matriz extracelular (Infante y Rodríguez, 2018; Hanna *et al.*, 2018). Por ello, inicialmente se evaluó el efecto de ASM y Ps19 sobre la proliferación celular empleando concentraciones previamente reportadas como bioactivos.

Las MSC estimuladas con 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ASM y con medio de diferenciación osteogénica mostraron un aumento en la velocidad específica de crecimiento y una disminución en el tiempo de duplicación celular. No obstante, el análisis estadístico reveló una disminución significativa en la proliferación únicamente en las células tratadas con medio de diferenciación osteogénico. Estos

resultados coinciden con estudios previos que reportan una disminución proliferativa al compromiso osteogénico.

Por otro lado, el efecto de los extractos de matriz orgánica del nácar sobre la proliferación celular ha demostrado depender del del tipo celular y de la concentración utilizada. Se ha reportado diferenciación osteogénica sin cambios proliferativos en osteoblastos primarios (Zhang *et al.*, 2006), incremento en la proliferación de pre-osteoblastos MC3T3-E1 y células estromales murinas, así como disminución dependiente de dosis en fibroblastos humanos MRC5 (Moutahir *et al.*, 2001; Mouriès *et al.*, 2002).

También, se ha observado que las MSC pueden mantener una capacidad mitótica o incluso incrementar su proliferación durante etapas tempranas o previas a su diferenciación terminal en osteoblastos (Alves, 2012). En este contexto, se sugiere que, aunque el estímulo con 200 µg/mL de ASM no mostró un efecto significativo, su impacto podría depender del tiempo de exposición, ya que el conteo celular se realizó sólo durante los ocho días posteriores al inicio del estímulo. Debido a las diferentes observaciones reportadas sobre la proliferación celular, se considera que su disminución, aumento o mantenimiento constituyen un mecanismo regulatorio que depende del tipo de estímulo, la dosis y el tiempo de exposición.

Respecto a las MSC estimuladas con 500 ng/mL de Ps19, el número de datos obtenidos fueron insuficientes para estimar de manera concluyente su efecto sobre la proliferación celular. Sin embargo, la curva de crecimiento sugiere un aumento en el número de células antes de las 120 horas, lo que indicaría un efecto proliferativo temprano que requiere ser confirmado mediante ensayos adicionales.

Después de obtener la cinética de crecimiento y observar el efecto de la ASM y de Ps19 sobre la proliferación, se evaluó la expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90 en MSC estimuladas con diferentes concentraciones de ASM y Ps19 mediante citometría de flujo, y se corroboró su localización por medio de inmunofluorescencia.

Los marcadores mesenquimales se relacionan con funciones celulares específicas; por lo tanto, el aumento o disminución de su expresión podría estar relacionada con el mecanismo de acción de los estímulos evaluados y con cambios en el fenotipo mesenquimal. En este contexto, CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) es una enzima involucrada en la generación extracelular de adenosina a partir de

AMP, molécula que regula procesos como la proliferación, supervivencia celular y la modulación del microambiente tisular (Kimura et al., 2021).

Por su parte, CD90 (Thy-1) es una glicoproteína relacionada con la regulación de las interacciones célula-célula y célula-matriz, así como con procesos de proliferación, adhesión y migración celular. Investigaciones previas han demostrado una disminución progresiva de su expresión a medida que las MSC se diferencian hacia osteoblastos y aumenta la expresión de colágeno 1 y osteonectina (Wiessman *et al.*, 2006). Además, se ha comprobado que su silenciamiento aumenta la mineralización y actividad osteoblástica (Moraes *et al.*, 2016).

Las MSC estimuladas con medio de diferenciación osteogénico mostraron una tendencia a disminuir la expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90, lo que indica la pérdida progresiva del fenotipo mesenquimal, fenómeno reportado como un cambio asociado a la diferenciación celular (Tamaño-Macchiavello *et al.*, 2025). Además, estas células presentaron una morfología prismática y la expresión intracelular del marcador osteoblástico osteocalcina (OCN), una proteína ampliamente utilizada como marcador de diferenciación osteogénica tardía, ya que es sintetizada por osteoblastos maduros y su incremento se relaciona con la síntesis y mineralización de la matriz extracelular (Rubert y De la Piedra, 2020; Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006; An *et al.*, Zoch *et al.*, 2016). En correspondencia con estos resultados, los cultivos celulares tratados con medio de diferenciación osteogénica presentaron una tinción positiva de rojo de alizarina, indicativa de la presencia de una matriz extracelular mineralizada confirmando la diferenciación de estas células a osteoblastos maduros.

Los resultados de citometría de flujo de las MSC del pase 4 estimuladas con diferentes concentraciones de Ps19 (1, 10, 100, 500 y 1000 ng/mL) mostraron una tendencia a disminuir el porcentaje de expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90 de acuerdo al aumento de la concentración. Sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos respecto al grupo de células no estimuladas. Estos resultados sugieren que el fenotipo mesenquimal podría presentar cambios a medida que la concentración de Ps19 aumenta.

Adicionalmente, en las MSC del pase 4 estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19 se observó una tendencia a disminuir la expresión de OCN respecto a las MSC no estimuladas; sin embargo, se localizó la expresión de OCN en el núcleo celular o alrededor de éste. En contraste, las MSC del

pase 5 exhibieron un aumento en la expresión de OCN y se localizó su expresión extendida en el citoplasma. Aunque se requieren más ensayos celulares por número de pase para determinar el efecto observado, Da Silva *et al.* (2023) reportaron la inmunolocalización de OCN en vesículas extracelulares durante la mineralización y una localización intracelular en etapas de formación ósea en hueso alveolar de ratas, por lo tanto se sugiere que la localización diferencial de OCN puede indicar diferentes estadios de diferenciación osteogénica ya que su localización en la región nuclear en el pase temprano corresponde a una regulación intracelular previa a su secreción mientras que, la expresión citoplasmática de OCN sugiere una producción activa de esta proteína antes de ser secretada a la matriz extracelular indicando un fenotipo osteoblástico más avanzado.

A pesar de la localización de OCN en MSC del pase 4 y 5 estimuladas con 1000 ng/mL de Ps19, la tinción de rojo de Alizarina fue negativa, lo cual indica que el estímulo no produjo una matriz extracelular mineralizada y una diferenciación osteogénica avanzada. En conjunto, estos resultados sugieren que el efecto osteogénico de Ps19 a 1000 ng/ml sobre la diferenciación de MSC a osteoblastos puede ser más efectivo en pases tardíos que en pases tempranos, y que podría requerir de la acción sinérgica de otras proteínas o compuestos para promover una diferenciación osteogénica terminal y la mineralización de la matriz extracelular.

El estímulo con matriz orgánica soluble en ácido acético (ASM) mostró una tendencia a aumentar la expresión de CD73 y a disminuir la expresión de CD90. Como se mencionó anteriormente, el aumento de CD73 podría relacionarse con el mantenimiento de la proliferación mientras que la reducción de CD90 en las células estimuladas con las diferentes concentraciones de ASM, especialmente con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , podría reflejar cambios fenotípicos asociados con su diferenciación a osteoblastos y con el reordenamiento de su citoplasma y de la matriz extracelular. En adición a esta observación, la fuerte agregación celular y adhesión de la matriz extracelular que mostraron estos cultivos, así como la localización de OCN en el citoplasma y la tinción positiva de rojo de alizarina, se sugiere que la ASM produjo la diferenciación osteogénica de las MSC y favoreció la mineralización de la matriz extracelular.

Las MSC no estimuladas expresaron los marcadores mesenquimales CD73 y CD90 como se esperaba. Por medio de inmunofluorescencia no se observó la expresión de OCN en las MSC del pase 4; sin embargo, se localizó su expresión citoplasmática en las células del pase 5. Estudios

previos han reportado la pérdida del fenotipo mesenquimal y la activación basal y transitoria de marcadores osteogénicos en MSC no estimuladas debido a que la senescencia *in vitro* puede producir una diferenciación espontánea parcial en cultivos de MSC prolongados o una expresión oscilatoria sin producir una diferenciación osteogénica (Yang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021; Hughes *et al.*, 2024).

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que los estímulos probados fueron diferentes y se sugiere que pueden estimular la diferenciación de MSC hacia el linaje óseo mediante diferentes mecanismos. Es conocido que la diferenciación osteogénica *in vitro* es inducida por la adición de los compuestos solubles: ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerolfosfato y dexametasona al medio de cultivo. Estos compuestos actúan en conjunto para promover la expresión del fenotipo osteoblástico mediante diferentes mecanismos regulatorios a lo largo del tiempo.

La dexametasona es un glucocorticoide que se difunde al citoplasma celular y se une a los receptores membranales de glucocorticoides (GR, *glucocorticoid receptor*), el complejo formado entre la dexametasona y el GR se trasloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) ubicados en los promotores de los genes diana para regular su transcripción (Eijken *et al.*, 2006). Entre los genes regulados por la dexametasona se encuentran FHL2, TAZ, MPK1, Col1. De manera que, la dexametasona aumenta la expresión de la proteína FHL2, activando la vía Wnt/ $\beta$ -catenina responsable de la expresión del factor de transcripción Runx2, el cual dirige la diferenciación celular hacia el linaje osteogénico e inhibe otras vías de diferenciación (Hamidouche *et al.*, 2008), así mismo activa la expresión de genes que codifican a proteínas osteogénicas como osteocalcina (OCN), colágeno tipo 1 (Col1), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), entre otras (Felber *et al.*, 2015). Además, el aumento de la expresión de Runx2 derivado de la sobreexpresión de FHL2 aumenta la expresión del colágeno tipo 1 (Col1). De esta manera, la dexametasona induce la diferenciación osteogénica a nivel transcripcional, pero también actúa como modulador de la actividad funcional de Runx 2 mediante la activación de la vía TAZ (Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif) y MKP-1. La vía TAZ coactiva la transcripción de los genes osteogénicos regulados por Runx2 y MPK1 conduce a la defosforilación de Runx2 provocando su transactivación en etapas tardías de la diferenciación (Langenbach y Handschel, 2013).

El ácido ascórbico es un cofactor de las enzimas que forman el colágeno tipo 1 (Col1) de la matriz extracelular, en este sentido, provoca la acumulación y maduración de la matriz extracelular a la que se unen los osteoblastos. Al mismo tiempo, la unión célula-matriz o ligando-Col1 activa la vía de señalización MAPK, la cual aumenta la actividad de Runx2 y permite la unión de las proteínas de quinasas ERK a los promotores de genes que codifican a las proteínas osteogénicas OCN y BSP (Langenbach y Handschel., 2013). Además, el aumento en la producción de la matriz extracelular se asocia con un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), considerada como un marcador temprano de la diferenciación osteogénica. Al mismo tiempo, la ALP induce la mineralización al hidrolizar el  $\beta$ -glicerolfosfato y producir iones de fosfato inorgánico utilizados en la formación de depósitos de calcio y de cristales de hidroxiapatita (Coelho *et al.*, 2000). Por lo tanto, el  $\beta$ -glicerolfosfato funciona como “una fuente de fosfato” para la deposición mineral y como un regulador de la señalización ya que el fosfato inorgánico también puede difundirse al interior de la célula y activar la vía de señalización ERK, la cual regula la expresión de proteínas osteogénicas dependientes del factor de transcripción Runx2 (Langenbach y Handschel., 2013).

Por otro lado, diferentes investigaciones han considerado que los efectos osteogénicos de los extractos de matriz soluble del nácar de ostras perleras son resultado de la acción sinérgica de las diferentes proteínas que los componen, parecido a lo que sucede con los factores solubles del medio de diferenciación osteogénica. Por lo tanto, pueden estar presentes proteínas que sean reconocidas por las MSC y que activen factores de transcripción para promover la expresión de proteínas osteogénicas o enzimas que regulen la síntesis y ensamblaje de la matriz extracelular. En este estudio, los cultivos estimulados con ASM mostraron una tendencia hacia la disminución de CD90, lo cual se ha reportado que estimula la producción de Col1, resultando en la producción y acumulación de la matriz extracelular, tal como se observó en estos cultivos. Además, la presencia de depósitos de calcio y la localización de OCN, se sugiere que ASM puede activar el factor de transcripción Runx2 que promueve la expresión de OCN y a su vez esta proteína promueve la deposición mineral. Estos resultados hacen énfasis en la importancia de la síntesis de la matriz extracelular para promover la diferenciación osteogénica y la deposición mineral como se ha descrito en los procesos de biomineralización tanto del nácar como del hueso.

Respecto al efecto osteogénico reportado de algunas proteínas purificadas del nácar, como las proteínas p10 (Zhang *et al.*, 2006) y N16 (Ma *et al.*, 2016) obtenidas de la capa nacarada de la

concha de *Pinctada fucata*, son proteínas ácidas que forman cristales de aragonita *in vitro*, como se demostró para la proteína Ps19 de *P. sterna* en estudios previos realizados por Arroyo-Loranca et al. (2023), por lo que se esperaba un efecto osteogénico de Ps19 sobre MSC. Sin embargo, las líneas celulares en las que se ha evaluado el efecto de p10 y N16, como fibroblastos humanos y preosteoblastos de ratón se tratan de células diferenciadas o en proceso de diferenciación que expresan Col1, el cual se ha comprobado que promueve la diferenciación osteoblástica mediante la interacción célula-matriz.

En este estudio, el efecto de Ps19 mostró una tendencia a disminuir los marcadores mesenquimales, pero no en una medida significativa que demuestre la pérdida del fenotipo mesenquimal, incluso en estos cultivos no se observó una matriz extracelular mineralizada y aunque se localizó la expresión intracelular de OCN se requiere mayor número de estudios para determinar si es una expresión oscilatoria o si las células se comprometieron al linaje osteogénico en sus etapas iniciales.

Debido a que estudios previos han demostrado que Ps19 es capaz de formar cristales de aragonita *in vitro* en presencia de soluciones salinas, se sugiere que esta proteína podría actuar en sinergia con una fuente de iones fosfato para promover la diferenciación osteogénica, tal como sucede entre la ALP y el  $\beta$ -glicerolfosfato.

Finalmente, los análisis realizados en esta investigación se realizaron en un solo tiempo, es decir a los 21 días post-estimulación, por lo que se sugiere que Ps19 y ASM podrían tener efectos diferentes en distintos tiempos, por lo tanto, se considera necesario realizar estos análisis en diferentes tiempos de la estimulación. Es preciso mencionar que se obtuvo el ARN de las células de todos los grupos utilizados: MSC no estimuladas, estimuladas con medio de diferenciación osteogénico, con las diferentes concentraciones de matriz orgánica soluble y con las diferentes concentraciones de Ps19, a los 7, 14 y 21 días para analizar por RT-qPCR la expresión de genes osteogénicos Runx2, Osx, OPN, OCN, ON, BMP2 y BMP4, con el objetivo de elucidar el mecanismo de acción de los tratamientos. A pesar de ello los resultados no son mostrados en esta investigación debido a la falta de tiempo para obtenerlos, considerando que cada ensayo celular dura 21 días. Por lo tanto, se espera que el término de estos análisis brinde información para comprender mejor los resultados obtenidos.

## 9. CONCLUSIONES

En este estudio, se ha demostrado que la proteína Ps19 y la matriz orgánica soluble en ácido acético de la concha de *Pteria sterna* producen cambios en el fenotipo mesenquimal de las células troncales mesenquimales de médula ósea (MSC) después de 21 días de estimulación ya que se observaron cambios fenotípicos, incluyendo cambios morfológicos, variaciones en la expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90, del marcador osteoblástico Osteocalcina (OCN) y la presencia de una matriz extracelular mineralizada. Estos cambios fueron dependientes del estímulo aplicado, la concentración utilizada y del pase celular. Aunque los resultados obtenidos referentes al estímulo con Ps19 requieren de más estudios para su confirmación se demostró la expresión de OCN en células del pase 4 y 5 lo que sugiere que Ps19 fue capaz de producir un estímulo osteogénico. Respecto a los resultados obtenidos del efecto de ASM, la tendencia hacia la disminución de CD90, la localización de la expresión de OCN y la matriz extracelular mineralizada observada en estos cultivos, demuestran su potencial osteogénico.

Estos resultados pueden ser considerados para futuras investigaciones que exploren el potencial bioactivo de las proteínas aisladas del nácar y la matriz orgánica soluble sobre la diferenciación osteogénica de MSC para el desarrollo de terapias o biomateriales, incluso como una investigación exploratoria sobre la pérdida del fenotipo mesenquimal en la diferenciación celular.

## 10. LITERATURA CITADA

- Addadi, L., & Weiner, S. (2014). Biomineralization: Mineral formation by organisms. *PHYSICA SCRIPTA*, 89(9), Article 098003. <https://doi.org/10.1088/0031-8949/89/9/098003>
- Alves, R. (2012). *Osteoblast Differentiation and Bone: Relevant proteins, regulatory processes and the vascular connection*. Tesis doctoral. Universidad Erasmo de Róterdam.
- An, J., Leeuwenburgh, S., Wolke, J., & Jansen, J. (2016). Mineralization processes in hard tissue. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-338-6.00005-3>
- Aranda, M.A. & Di Carlo, M.B. (2022). Alkaline phosphatase: General characteristics and serum determination. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 56(3), 257-272.
- Arias, J. L., & Fernández, M. S. (2008). Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based biomineralization. *Chemical reviews*, 108(11), 4475–4482. <https://doi.org/10.1021/cr078269p>
- Arroyo-Loranca, R. G., Hernández-Saavedra, N. Y., Hernández-Adame, L., & Rivera-Pérez, C. (2020). Ps19, a novel chitin binding protein from *Pteria sterna* capable to mineralize aragonite plates in vitro. *PLoS one*, 15(3), e0230431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230431>
- Arroyo-Loranca, R. G., Rivera-Pérez, C., Hernández-Adame, L., Cruz-Villacorta, A. A., Rodríguez-López, J. L., & Hernández-Saavedra, N. Y. (2023). Effect of ion and protein concentration of Ps19, a shell protein from *Pteria sterna*, on calcium carbonate polymorph. *Biotecnia*, 25(2), 136-145. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i2.1885>
- Atlan, G., Balmain, N., Berland, S., Vidal, B., & Lopez, E. (1997). Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: Histological evidence for bone regeneration. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 320(3), 253–258. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(97\)86933-8](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(97)86933-8)
- Atlan, G., Delattre, O., Berland, S., LeFaou, A., Nabias, G., Cot, D., & Lopez, E. (1999). Interface between bone and nacre implants in sheep. *Biomaterials*, 20(11), 1017–1022. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)90212-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)90212-5)
- Aubin, J. (2008). Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00026-4>.
- Barry F. P. & Murphy J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4): 568-584.
- Brion, A., Zhang, G., Dossot, M., Moby, V., Dumas, D., Hupont, S., Piet, M. H., Bianchi, A., Mainard, D., Galois, L., Gillet, P., & Rousseau, M. (2015). Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts. *Journal of structural biology*, 192(3), 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.10.012>
- Bruder, S. P., Jaiswal, N., & Haynesworth, S. E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64(2), 278–294. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(199702\)64:2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2)
- Camacho, H.H., Damboreana, S. & Del Río, C. (2008). Bivalvia. En *Los invertebrados fósiles*. (Tomo I, pp. 387-440). Fundación de Historia natural Félix De Azara.
- Cañón Dávila, D.F., Zubieta Otero, L.F., Martínez Muñoz, P. E. y otros (2022). El hueso, un desecho en la cocina y una oportunidad para la medicina. *Ciencia UNAM*. <https://ciencia.unam.mx/leer/1279/el-hueso-un-desecho-en-la-cocina-y-una-oportunidad-para-la-medicina>

- Cao, X., Xiao, S., Shen, C., & Fan, Y. (2025). Microdamage in biological hard tissues and its repair mechanisms. *Biomedical Engineering Online*, 24(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12938-025-01423-3>
- Castro, M. M. E., & Montesinos, M. J. J. (2015). Células troncales mesenquimales: Biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(1), 38–44.
- Checa, A. G. (2018). Physical and biological determinants of the fabrication of molluscan shell microstructures. *Frontiers in Marine Science*, 5, 353. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00353>
- Cheng, M., Liu, M., Chang, L., Liu, Q., Wang, C., Hu, L., Zhang, Z., Ding, W., Chen, L., Guo, S., Qi, Z., Pan, P., & Chen, J. (2023). Overview of structure, function and integrated utilization of marine shell. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161950>
- Coelho, M. J., & Fernandes, M. H. (2000). Human bone cell cultures in biocompatibility testing: Part II. Effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 21(11), 1095–1102. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00192-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00192-1)
- Coronado, I. (2022). Biomineralización: Cuando los organismos crean minerales. *Ambiociencias*, 77–100. <https://doi.org/10.18002/ambioc.i20.7490>
- Da Silva Sasso, G. R., Florencio-Silva, R., de Pizzol-Júnior, J. P., Gil, C. D., Simões, M. J., Sasso-Cerri, E., & Cerri, P. S. (2023). Additional Insights Into the Role of Osteocalcin in Osteoblast Differentiation and in the Early Steps of Developing Alveolar Process of Rat Molars. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 71(12), 689–708. <https://doi.org/10.1369/00221554231211630>
- Delany, A. M., Kalajic, I., Bradshaw, A. D., Sage, E. H., & Canalis, E. (2003). Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology*, 144(6), 2588–2596. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221044>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Du, X., Fan, G., Jiao, Y., Zhang, H., Guo, X., Huang, R., Zheng, Z., Bian, C., Deng, Y., Wang, Q., Wang, Z., Liang, X., Liang, H., Shi, C., Zhao, X., Sun, F., Hao, R., Bai, J., Liu, J., Chen, W., ... Liu, X. (2017). The pearl oyster *Pinctada fucata martensii* genome and multi-omic analyses provide insights into biomineralization. *GigaScience*, 6(8), 1–12. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix059>
- Eijken, M., Koedam, M., van Driel, M., Buurman, C. J., Pols, H. A., & van Leeuwen, J. P. (2006). The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Molecular and cellular endocrinology*, 248(1-2), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.034>
- Evans, J. S. (2019). The Biomineralization Proteome: Protein Complexity for a Complex Bioceramic Assembly Process. *Proteomics*, 19(16), e1900036. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900036>
- Fang, D., Pan, C., Lin, H., Lin, Y., Zhang, G., Wang, H., He, M., Xie, L., & Zhang, R. (2012). Novel basic protein, PfN23, functions as key macromolecule during nacre formation. *The Journal of biological chemistry*, 287(19), 15776–15785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341594>

- Felber, K., Elks, P. M., Lecca, M., & Roehl, H. H. (2015). Expression of osterix Is Regulated by FGF and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling during Osteoblast Differentiation. *PLoS one*, *10* (12), e0144982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144982>
- Feng, X., & McDonald, J. M. (2011). Disorders of bone remodeling. *Annual review of pathology*, *6*, 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130203>
- Fernández, V., Valeria B.; Labovsky, V.; Martínez, L. M. & Chasseing, N. A. (2010) Células madre mesenquimales y Medicina Regenerativa; Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias; *Ciencia E Investigación*; 58-76.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-G., Alobera G. M A., del Canto Pingarrón M. & Blanco Jerez L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*;11:E47-51.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-G., Alobera G. M A., del Canto Pingarrón M. & Blanco Jerez L.(2006) Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*;11:E151-7.
- Freites, L., Jara, F. Gregori, M., Marquez, A., Saucedo, P. & Lodeiros, C. (2020). Performance of the winged pearl oyster *Pteria sterna* (GOULD, 1851), implanted for half-pearl (mabé) production in two size groups. *Aquaculture*. 524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735267>
- Gilbert, P. U. P. A., Bergmann, K. D., Boekelheide, N., Tambutté, S., Mass, T., Marin, F., Adkins, J. F., Erez, J., Gilbert, B., Knutson, V., Cantine, M., Hernández, J. O., & Knoll, A. H. (2022). Biomineralization: Integrating mechanism and evolutionary history. *Science advances*, *8*(10), eabl9653. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl9653>
- Gorski J. P. (2011). Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *16*(7), 2598–2621. <https://doi.org/10.2741/3875>
- Gosling, E. (2003). *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. Oxford: Fishing News Books.
- Granéli, C., Thorfve, A., Ruetschi, U., Brisby, H., Thomsen, P., Lindahl, A., & Karlsson, C. (2014). Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem cell research*, *12*(1), 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.009>
- Green, D. W., Kwon, H. J., & Jung, H. S. (2015). Osteogenic potency of nacre on human mesenchymal stem cells. *Molecules and cells*, *38*(3), 267–272. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.2315>
- Green, D. W., Padula, M. P., Santos, J., Chou, J., Milthorpe, B., & Ben-Nissan, B. (2013). A therapeutic potential for marine skeletal proteins in bone regeneration. *Marine drugs*, *11*(4), 1203–1220. <https://doi.org/10.3390/md11041203>
- Hamidouche, Z., Haÿ, E., Vaudin, P., Charbord, P., Schüle, R., Marie, P. J., & Fromigué, O. (2008). FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *22*(11), 3813–3822. <https://doi.org/10.1096/fj.08-106302>
- Hanna, H., Mir, L. M., & Andre, F. M. (2018). In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem cell research & therapy*, *9*(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>
- Haszprunar, G. (2026). Mollusca (molluscs). *Encyclopedia of Life Sciences*, 565–571. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029219>

- Heinegård, D., & Oldberg, Å. (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *The FASEB Journal*, 3(9), 2042–2051. <https://doi.org/10.1096/fasebj.3.9.2663581>
- Huang, Jingliang & Zhang, Rong. (2022). The Mineralization of Molluscan Shells: Some Unsolved Problems and Special Considerations. *Frontiers in Marine Science*. 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.874534>
- Hughes, A.M., Kuek, V., Oommen, J. *et al.* (2024). Murine bone-derived mesenchymal stem cells undergo molecular changes after a single passage in culture. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63009-8>
- Ibrahim, H., El-Sayed, W. & El-Sheekh, M. (2022). Marine Biomaterials: Resources, Categories, and Applications. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-5374-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5374-2_1)
- Iduarte Frias, B. I. (2018). *Establecimiento y caracterización de dos modelos para el estudio de la remodelación ósea*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ciencias de la Vida. Baja California, México.
- Infante & Rodríguez. (2018). *Stem Cell Research & Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0995-x>
- Kamen T., Michael M. & Georg, G. (2008). On the nature of the stiffness of nacre. *Materials Science and Engineering: C*, Volume 28, Issue 7, pp. 1164-1172, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.039>.
- Kassem M. (2004) “Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications.” *Cloning Stem Cells*. 6(4): 369-74. <https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.369>
- Kim, H., Lim, H., Kim, S. *et al.* Investigation on mussel periostracum, a viscoelastic-to-poro-gel graded material, as an interface between soft tissue and rigid materials. *NPG Asia Mater* 16, 23 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41427-024-00543-x>
- Kimura, K., Breitbach, M., Schildberg, F. A., Hesse, M., & Fleischmann, B. K. (2021). Bone marrow CD73+ mesenchymal stem cells display increased stemness *in vitro* and promote fracture healing *in vivo*. *Bone reports*, 15, 101133. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2021.101133>
- Kocot, K.M., Aguilera F., McDougall, C., Jackson, D. J. & Degnan, B. M. (2016). Seashell diversity and rapidly evolving secretomes: insights into the evolution of biomineralization. *Front Zool*. Jun 7;13:23. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0155-z>
- Lamghari, M., Antonietti, P., Berland, S., Laurent, A., & Lopez, E. (2001). Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16(12), 2232–2237. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.12.2232>
- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro*. *Stem cell research & therapy*, 4(5), 117. <https://doi.org/10.1186/scrt328>
- Lee, K., Kim, H., Kim, J. M., Chung, Y. H., Lee, T. Y., Lim, H. S., Lim, J. H., Kim, T., Bae, J. S., Woo, C. H., Kim, K. J., & Jeong, D. (2012). Nacre-driven water-soluble factors promote wound healing of the deep burn porcine skin by recovering angiogenesis and fibroblast function. *Molecular biology reports*, 39(3), 3211–3218. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1088-4>
- Lin, J. B., Wu, H., Liu, Y. L., Shaw, P. C., & Li, P. B. (2019). Transcriptome analysis reveals functional roles of nacreous protein N16 in prednisolone-induced osteoporotic zebrafish. *International journal of biological macromolecules*, 122, 1071–1079. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.055>

- Liu, J., Pei, Y., Dong, Y., Rao, Z., Chen, J. & Tang, K. (2021). Conversion of Protein and Polysaccharide Wastes into Value-Added Composite Products. En *Conversion of Renewable Biomass into Bioproducts* (pp.219-260).
- Loh, X. J., Young, D. J., Guo, H., Tang, L., Wu, Y., Zhang, G., Tang, C., & Ruan, H. (2021). Pearl Powder- An Emerging Material for Biomedical Applications: A Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(11), 2797. <https://doi.org/10.3390/ma14112797>
- López, E., Vidal, B., Berland, S., Camprasse, S., Camprasse, G., & Silve, C. (1992). Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro. *Tissue & cell*, 24(5), 667–679. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(92\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90037-8)
- Lowenstam H. A. (1981). Minerals formed by organisms. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4487), 1126–1131. <https://doi.org/10.1126/science.7008198>
- Luo, Y. J., Takeuchi, T., Koyanagi, R., Yamada, L., Kanda, M., Khalturina, M., Fujie, M., Yamasaki, S. I., Endo, K., & Satoh, N. (2015). The Lingula genome provides insights into brachiopod evolution and the origin of phosphate biomineralization. *Nature communications*, 6, 8301. <https://doi.org/10.1038/ncomms9301>
- Ma, J. Y., Wong, K. L., Xu, Z. Y., Au, K. Y., Lee, N. L., Su, C., Su, W. W., Li, P. B., & Shaw, P. C. (2016). N16, a Nacreous Protein, Inhibits Osteoclast Differentiation and Enhances Osteogenesis. *Journal of natural products*, 79(1), 204–212. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00854>
- Mann, S. Molecular recognition in biomineralization. *Nature* 332, 119–124 (1988). <https://doi.org/10.1038/332119a0>
- Marin, F., Le Roy, N., & Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4(3), 1099–1125. <https://doi.org/10.2741/s321>
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., & Medakovic, D. (2007). Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology*, 80, 209–276. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(07\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(07)80006-8)
- Marin, F. & Luquet, G. (2004). Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol.* 3. 469-492. <https://doi.org/10.1016/j.crvp.2004.07.009>
- Miyashita, T., Hanashita, T., Toriyama, M., Takagi, R., Akashika, T., & Higashikubo, N. (2008). Gene cloning and biochemical characterization of the BMP-2 of *Pinctada fucata*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(1), 37–47. <https://doi.org/10.1271/bbb.70302>
- Montagnani, C., Marie, B., Marin, F., Belliard, C., Riquet, F., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Fleury, E., Gueguen, Y., Piquemal, D., & Cochennec-Laureau, N. (2011). Pmarg-pearlin is a matrix protein involved in nacre framework formation in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 12(13), 2033–2043. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100216>
- Moraes, D. A., Sibov, T. T., Pavon, L. F., Alvim, P. Q., Bonadio, R. S., Da Silva, J. R., Pic-Taylor, A., Toledo, O. A., Marti, L. C., Azevedo, R. B., & Oliveira, D. M. (2016). A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem cell research & therapy*, 7(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0359-3>
- Mouriès, L. P., Almeida, M. J., Milet, C., Berland, S., & Lopez, E. (2002). Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 132(1), 217–229. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00524-3](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00524-3)

- Moutahir-Belqasmi, F., Balmain, N., Lieberherr, M., Borzeix, S., Berland, S., Barthelemy, M., Peduzzi, J., Milet, C., & Lopez, E. (2001). Effect of water soluble extract of nacre (*Pinctada maxima*) on alkaline phosphatase activity and Bcl-2 expression in primary cultured osteoblasts from neonatal rat calvaria. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.1023/a:1026759431595>
- Nguyen, D. K., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Thomas, M., Linossier, M. T., Peyroche, S., Farlay, D., Follet, H., Laquerrière, P., Lafage-Proust, M. H., Thomas, T., Vico, L., Marotte, H., & Rousseau, M. (2023). Dietary supplementation with nacre reduces cortical bone loss in aged female mice. *Experimental gerontology*, 184, 112337. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112337>
- Osterhoff, G., Morgan, E. F., Shefelbine, S. J., Karim, L., McNamara, L. M., & Augat, P. (2016). Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. *Injury*, 47 Suppl 2(Suppl 2), S11–S20. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(16\)47003-8](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(16)47003-8)
- Pasqualini, U., & Pasqualini, M. E. (2009). *Treatise of Implant Dentistry: The Italian Tribute to Modern Implantology*. Ariesdue.
- Pei, J., Wang, Y., Zou, X., Ruan, H., Tang, C., Liao, J., Si, G., & Sun, P. (2021). Extraction, Purification, Bioactivities and Application of Matrix Proteins From Pearl Powder and Nacre Powder: A Review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 649665. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.649665>
- Perlas del Mar de Cortez (2026, enero 17). Perlas del Mar de Cortez. [https://perlas.com.mx/?srsltid=AfmBOorVreSeiuxlMUJOunhwXg17FItCmCbI6bVoKZX7QofcRhIvl\\_6M](https://perlas.com.mx/?srsltid=AfmBOorVreSeiuxlMUJOunhwXg17FItCmCbI6bVoKZX7QofcRhIvl_6M)
- Popov, S. V. (2015). Formation of bivalve shells and their microstructure. *Paleontological Journal*. 48. <https://doi.org/10.1134/S003103011414010X>
- Prasanna, L., Bothra, Y., Bhat, K. & Managuli, V. (2024). Exploring the Bone Tissue: Instrumental Methods for Characterization and Biomedical Research Application. *Translational Research in Anatomy*. 38. <https://doi.org/10.1016/j.tria.2024.100374>
- Rao, A., Berg, J., Kellermeier, M. & Gebauer, D. (2014). Sweet on biomineralization: Effects of carbohydrates on the early stages of calcium carbonate crystallization. *European Journal of Mineralogy*. 26. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2014/0026-2379>
- Rivera-Pérez, C., Flores-Sánchez, I., Ojeda - Ramírez, J., Rojas-Posadas, D. & Hernández -Saavedra, N. (2020). A shell matrix protein of *Pinctada mazatlanica* produces nacre platelets in vitro. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77320-7>
- Rivera-Pérez, C. & Hernández-Saavedra, N. (2020). ¿Cómo se forma la concha de moluscos?. *Recursos Naturales y Sociedad*, Vol. 6 (1): 24-39. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2020.06.06.01.0007>
- C. Rivera Pérez y Norma Y. Hernández Saavedra. 2020. ¿Cómo se forma la concha de moluscos?. *Recursos Naturales y Sociedad*, 2020. Vol. 6 (1): 24-39. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2020.06.06.01.0007>
- Rivera-Perez, C., Magallanes-Dominguez, C., Dominguez-Beltran, R.V., Ojeda-Ramirez de Areyano J.J., Hernández-Saavedra, N.Y. (2019). Biochemical and molecular characterization of N66 from the shell of *Pinctada mazatlanica*. *PeerJ* 7:e7212 <https://doi.org/10.7717/peerj.7212>
- Rodríguez, J. P., González, M., Ríos, S., & Cambiazo, V. (2004). Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, 93(4), 721–731. <https://doi.org/10.1002/jcb.20234>

- Rosset, E. M., & Bradshaw, A. D. (2016). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 52-54, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.02.001>
- Rousseau, M., Meibom, A., Gèze, M., Bourrat, X., Angellier, M., & Lopez, E. (2009). Dynamics of sheet nacre formation in bivalves. *Journal of structural biology*, 165(3), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.11.011>
- Rousseau, M., Pereira-Mouriès, L., Almeida, M. J., Milet, C., & Lopez, E. (2003). The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 135(1), 1–7.
- Rubert, M., & De la Piedra, C. (2020). La osteocalcina: de marcador de formación ósea a hormona; y el hueso, un órgano endocrino. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 12(4), 146-151. <https://dx.doi.org/10.4321/s1889-836x2020000400007>
- Serna-Gallo, I., Ruíz-Velazco, J. M. J., Acosta-Salmón, H., Peña-Messina, E., Torres-Zepeda, G., & Saucedo, P. E. (2014). Patrones de crecimiento y reproducción de la concha nácar, *Pteria sterna*, cultivada en un ambiente tropical de México: Implicaciones para el cultivo de perlas. *Ciencias marinas*, 40(2), 75-88. <https://doi.org/10.7773/cm.v40i2.2393>
- Shahi, M., Peymani, A., & Sahmani, M. (2017). Regulation of Bone Metabolism. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 5(2), 73–82.
- Sharma, V., Srinivasan, A., Nikolajeff, F., & Kumar, S. (2021). Biomineralization process in hard tissues: The interaction complexity within protein and inorganic counterparts. *Acta biomaterialia*, 120, 20–37. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.049>
- Song, X., Liu, Z., Wang, L., & Song, L. (2019). Recent Advances of Shell Matrix Proteins and Cellular Orchestration in Marine Molluscan Shell Biomineralization. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00041>
- Song, Y., Chen, W., Fu, K., & Wang, Z. (2022). The Application of Pearls in Traditional Medicine of China and Their Chemical Constituents, Pharmacology, Toxicology, and Clinical Research. *Frontiers in pharmacology*, 13, 893229. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.893229>
- Suwannasing, C., Buddawong, A., Khumpune, S., Habuddha, V., Weerachatyanukul, W., & Asuvapongpatana, S. (2021). Bone Morphogenetic Protein 2/4 in Mollusk, *Haliotis diversicolor*: Its Expression and Osteoinductive Function In Vitro. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 23(5), 836–846. <https://doi.org/10.1007/s10126-021-10071-2>
- Tamaño-Machiavello, M. N., Marín Payá, J. C., Flores, S., Cerdón, L., Sempere, A., Sabater I Serra, R., & Gómez Ribelles, J. L. (2025). Maintenance of pluripotency and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on acrylate-based substrates exhibiting gelatin or heparin grafting. *Scientific reports*, 15(1), 22821. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-05640-7>
- Sharma, V., Srinivasan A. & Nikolajeff, F. (2021). Biomineralization process in hard tissues: The interaction complexity within protein and inorganic counterparts. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.049>
- Wang, H., Li, X., Xuan, M., Yang, R., Zhang, J., & Chang, Jinke. (2024). Marine Biomaterials for Sustainable Bone Regeneration. *Giant*. 19. 100298. [10.1016/j.giant.2024.100298](https://doi.org/10.1016/j.giant.2024.100298).
- Wang, Z., Ren, L., Li, Z., Qiu, Q., Wang, H., Huang, X., & Ma, D. (2025). Impact of Different Cell Types on the Osteogenic Differentiation Process of Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells international*, 2025, 5551222. <https://doi.org/10.1155/sci/5551222>

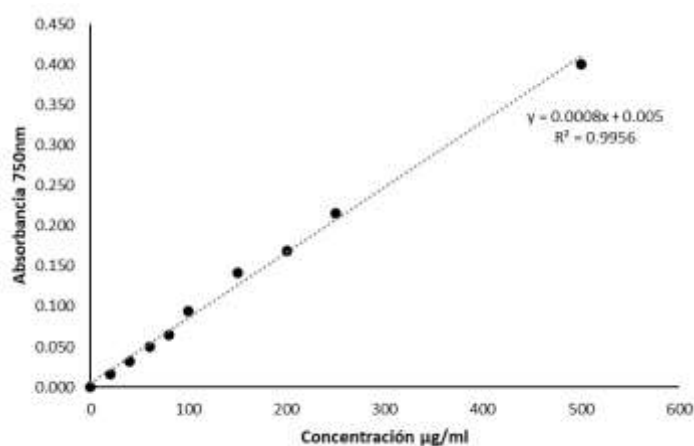
- Wiesmann, A., Bühring, H. J., Mentrup, C., & Wiesmann, H. P. (2006). Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head & face medicine*, 2, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-2-8>
- Xu, Z. Y., Liu, Y. L., Lin, J. B., Cheng, K. L., Wang, Y. G., Yao, H. L., Wei-Peng, Wu, H. Y., Su, W. W., Shaw, P. C., & Li, P. B. (2018). Preparative expression and purification of a nacreous protein N16 and testing its effect on osteoporosis rat model. *International journal of biological macromolecules*, 111, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.054>
- Yan, X., Zhang, Q., Ma, X., Zhong, Y., Tang, H., & Mai, S. (2023). The mechanism of biomineralization: Progress in mineralization from intracellular generation to extracellular deposition. *The Japanese dental science review*, 59, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2023.06.005>
- Yang, Y. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T. Y., & Barabino, G. A. (2018). Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0876-3>
- Zhang, C., Li, S., Ma, Z., Xie, L., & Zhang, R. (2006). A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effects on both CaCO<sub>3</sub> crystal formation and mineralogenic cells. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 8(6), 624–633. <https://doi.org/10.1007/s10126-006-6037-1>
- Zhang, G., Willemin, A. S., Brion, A., Piet, M. H., Moby, V., Bianchi, A., Mainard, D., Galois, L., Gillet, P., & Rousseau, M. (2016). A new method for the separation and purification of the osteogenic compounds of nacre Ethanol Soluble Matrix. *Journal of structural biology*, 196(2), 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.016>
- Zhao, M., Shi, Y., He, M., Huang, X., & Wang, Q. (2016). PfsMAD4 plays a role in biomineralization and can transduce bone morphogenetic protein-2 signals in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *BMC developmental biology*, 16, 9. <https://doi.org/10.1186/s12861-016-0110-4>
- Zhao, R., Takeuchi, T., Luo, Y. J., Ishikawa, A., Kobayashi, T., Koyanagi, R., Villar-Briones, A., Yamada, L., Sawada, H., Iwanaga, S., Nagai, K., Satoh, N., & Endo, K. (2018). Dual Gene Repertoires for Larval and Adult Shells Reveal Molecules Essential for Molluscan Shell Formation. *Molecular biology and evolution*, 35(11), 2751–2761. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy172>
- Zhao, Y., Sun, Q., Wang, S., & Huo, B. (2019). Spreading Shape and Area Regulate the Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 16(6), 573–583. <https://doi.org/10.1007/s13770-019-00213-y>
- Zhu, Siyu & Chen, Wei & Masson, Alasdair & Li, Yiping. (2024). Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discovery*. 10. 10.1038/s41421-024-00689-6.
- Zielak, J. C., Neto, D. G., Cazella Zielak, M. A., Savaris, L. B., Esteban Florez, F. L., & Deliberador, T. M. (2018). In vivo regeneration functionalities of experimental organo-biomaterials containing water-soluble nacre extract. *Heliyon*, 4(9), e00776. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00776>
- Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 82, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.046>

## 11. ANEXOS

### Anexo A. Cuantificación de proteína de la ASM por el método de Lowry

**Tabla 3.** Curva estándar de ovoalbúmina para la cuantificación de proteína del liofilizado de ASM empleando el método de Lowry *O. et al.* (1951).

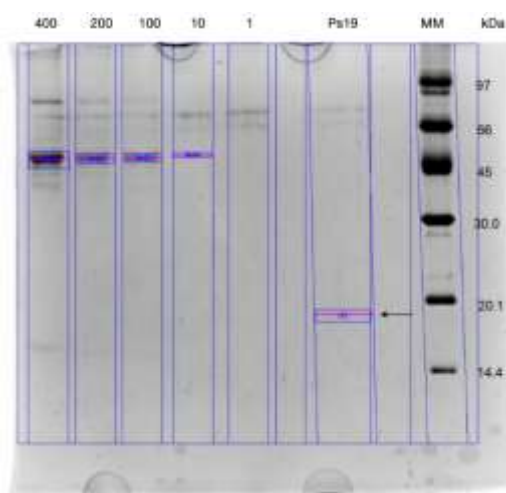
Tubo	Concentración µg/mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4
1	0	0	0	0	0.000
2	20	0.024	0.016	0.008	0.016
3	40	0.032	0.034	0.028	0.031
4	60	0.05	0.051	0.049	0.050
5	80	0.057	0.063	0.074	0.065
6	100	0.11	0.092	0.08	0.094
7	150	0.166	0.128	0.132	0.142
8	200	0.174	0.176	0.157	0.169
9	250	0.222	0.209	0.214	0.215
10	500	0.392	0.4	0.409	0.400



**Figura 26.** Gráfico de curva estándar de ovoalbúmina para la cuantificación de proteína

**Tabla 4.** Cuantificación de proteína de liofilizado ASM utilizado en los cultivos celulares

Muestra para cuantificación	Abs 750 nm	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Proteína en 1 mg/0.5 mL	Liofilizado mg	Proteína total mg
1 mg/500 $\mu\text{l}$	0.067	75.576	37.788	7230	273.208126

**Anexo B.** Cuantificación de proteína del liofilizado de Ps19 por densitometría de Vicent *et al.* (1997).**Figura.27** Curva de ovoalbúmina para densitometría y cuantificación de proteína Ps19 purificada. Ovoalbúmina: 400, 200, 100 10 y 1 ng/mL; Ps19: liofilizado de Ps19 utilizado en los ensayos de diferenciación celular (1000 ng/ mL); MM: marcador molecular. El recuadro azul indica el área de medición de píxeles y la flecha indica la banda de la proteína Ps19.**Volume Analysis**

No.	Label	Type	Volume (Int)	Adj. Vol. (Int)	Mean Bkgd. (Int)	Abs. Quant. (ng)	Rel. Quant.	# of Pixels	Min. Value (Int)	Max. Value (Int)	Mean Value (Int)	Std. Dev.	Area (mm <sup>2</sup> )
1	U1	Unknown	4,443,993	27,845	2,091.0	56.5	N/A	2,112	2,054	2,170	2,104.2	15.6	24.5
2	Std1	Standard	5,195,708	575,521	2,169.1	400.0	N/A	2,130	1,994	2,825	2,439.3	221.8	24.7
3	Std2	Standard	2,632,905	171,283	2,194.0	200.0	N/A	1,122	2,098	2,526	2,346.6	114.6	13.0
4	Std3	Standard	2,096,054	102,597	2,190.6	100.0	N/A	910	2,070	2,448	2,303.4	88.9	10.6
5	Std4	Standard	1,140,237	3,995	2,088.7	10.0	N/A	544	2,073	2,119	2,096.0	8.0	6.3

**Figura 28.** Resultados del análisis de volúmen densitométrico por medio del programa Image Lab 5.1 para la cuantificación de proteína. Se utilizó un tamaño de pixel X: 107.8 Y: 107.8.

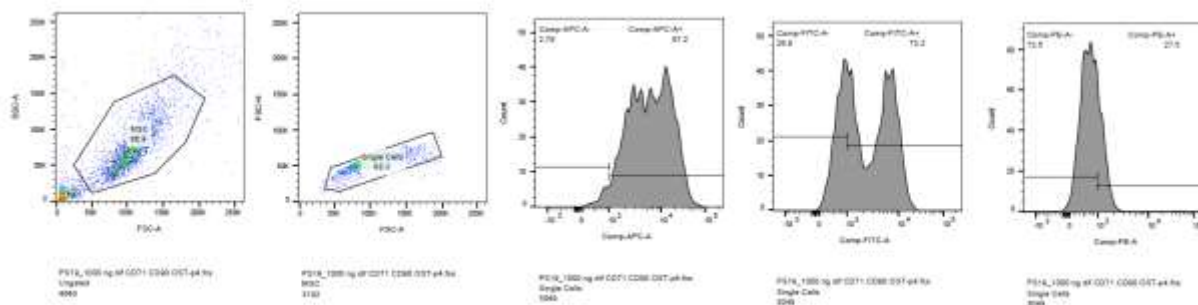
**Tabla 5.** Cuantificación de proteína del liofilizado de Ps19 (1000 ng/ml) utilizado en el cultivo celular

Muestra	Proteína (ng)	Volúmen densitométrico integrado
1	400*	575, 521
2	200*	171, 283
3	100*	102, 597
4	10*	3995
Ps19	56.554	27, 845

Notas: \* Curva estándar de ovoalbúmina

### Anexo C. Citometría de flujo

Para la citometría de flujo se seleccionó la población celular utilizando los parámetros de área dispersión lateral (SSC-A, del inglés *side scatter area*) y área de dispersión frontal (FSC-A, del inglés *forward scatter area*). Posteriormente se seleccionaron las células individuales con los parámetros de altura de dispersión frontal (FSC-H, del inglés *forward scatter height*) y área de dispersión frontal (FSC-A). Finalmente, en la población de células individuales se analizó la intensidad media de fluorescencia para cada fluorocromo.



**Figura 29.** Gates realizados para cada selección de poblaciones celulares.