



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Comportamiento *in vitro* de células stem
mesénquimales de origen dental
humano en matrices extracelulares
tridimensionales de ácido
poliláctico/poliglicólico con y sin
hidroxiapatita

NURY TATIANA JIMÉNEZ ORTEGÓN

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Odontología

Maestría en Odontología

Bogotá, Colombia

Enero-2015

Comportamiento *in vitro* de células stem mesénquimales de origen dental humano en matrices extracelulares tridimensionales de ácido poliláctico/poliglicólico con y sin hidroxiapatita

Nury Tatiana Jiménez Ortegón

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Odontología

Director: Juan Carlos Munévar Niño

Od, MSc Ciencias biológicas y biomédicas. Especialización en Bioética. Especialización en Docencia universitaria

Codirector: José Manuel González Carreño

Od, MSc Microbiología, Especialización en Endodoncia.

Asesora Metodológica: Sandra Janeth Perdomo Lara

Biol, PhD Ciencias Biológicas

Línea de investigación

Ingeniería tisular y células stem

Grupos de investigación

Gerodontología Universidad Nacional de Colombia

Crecimiento y desarrollo Universidad Nacional de Colombia

Grupo Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) Universidad El Bosque

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Odontología

Maestría en Odontología

Bogotá, Colombia

Enero-2015

Muchas veces la malicia o la estupidez pondrán obstáculos a la nueva idea; de ahí que es preciso luchar arduamente para lograr la tolerancia mutua e incondicional. Sólo así la ciencia florece y avanza, pues su fundamento es la libre experimentación e investigación.

Max Nettlau

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, División de Investigación sede Bogotá, Facultad de Odontología y en especial a la maestría en Odontología por su financiación y el apoyo brindado para poder desarrollar este trabajo de investigación, también agradezco profundamente a la Universidad El Bosque; al grupo de investigación UIBO que me brindaron todo su apoyo con el uso de sus instalaciones y equipos, además de ofrecerme un apoyo constante en laboratorio.

Al Dr. Juan Carlos Munévar Niño, Dr. José Manuel González Carreño, Dra. Sandra Janeth Perdomo Lara y a la Dra. Clementina Infante Contreras, quienes fueron mis mentores y guías para poder llevar a cabo tan ardua labor de desarrollar esta investigación; infinitas gracias a cada uno de ellos por su paciencia y confianza en mis capacidades académicas. Agradezco al profesor Francisco Ibla, quién me guío y acompañó en todos los conocimientos de química requeridos para la ejecución de este proyecto, al profesor Luis Alberto López por su acompañamiento en estadística, base fundamental para defender los resultados y el éxito de este trabajo de investigación, infinitas gracias por enseñarme lo que verdaderamente vale y significa la estadística en trabajos investigativos experimentales. Gracias a todos los docentes que hacen parte de la maestría que de algún modo me dieron conocimientos de base para ejecutar esta tesis.

Por último, agradezco a mi familia, quienes con su infinito amor me están dando la oportunidad de continuar este camino formativo que inicio en la academia.

Resumen

En la ingeniería de tejidos óseos es fundamental estudiar el sinergismo entre las células stem mesenquimales y el biomaterial para poder tener un mayor control de las respuestas y función celular, por esto las respuestas celulares relacionadas con los procesos de proliferación, adhesión y diferenciación en matrices extracelulares tridimensionales deben ser estudiadas en diferentes biomateriales. **OBJETIVO:** El propósito de este estudio fue analizar el comportamiento *in vitro* de las células stem mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSCs) cultivadas en matrices extracelulares tridimensionales de ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA) con y sin hidroxiapatita (HA). **MÉTODO:** Estudio experimental *in vitro*. Se cultivaron hDPSCs en dos tipos de matrices (PLGA/HA y PLGA) con medio de diferenciación osteogénica STEMPRO® y se evaluó la proliferación, adhesión y diferenciación celular a linaje osteoblástico en tres tiempo diferentes; 7, 15 y 30 días. Cada experimento se realizó por triplicado. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el modelo estadístico Split Plot en bloque y Manova para datos semiparamétricos. Posteriormente, se realizó un estudio piloto en modelo animal lagomorfo para evaluar la regeneración ósea a nivel clínico e histológico **RESULTADOS:** La proliferación y diferenciación a linaje osteoblástico de las hDPSCs se incrementó en la matriz de PLGA/HA a los 7, 15 y 30 días, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la adhesión entre los dos tipos de matrices. Se observó un menor tiempo en la regeneración de lesiones óseas de tamaño crítico *in vivo* con las hDPSCs en la matrices de PLGA/HA. **CONCLUSIÓN:** El comportamiento *in vitro* de las hDPSCs en los dos tipos de constructos fue significativamente diferente, probablemente los constructos de PLGA/HA proporcionan mejores señales físicas y químicas, lo que podría explicar una mejor proliferación y diferenciación celular a linaje osteoblástico.

Palabras clave: Células stem mesenquimales de pulpa dental humana, ingeniería de tejidos, materiales biomiméticos, osteoblastos, factores de crecimiento.

Abstract

At bone tissue engineering is important to study the synergism between mesenchymal stem cells and biomaterial to have high control of cell function and cell response, for this the mechanisms involved with proliferation, adherence and differentiation on scaffolds must be to study in differents biomaterials. **OBJETIVE:** The aim of this study was to analyze the *in vitro* behavior of human dental pulp mesenchymal stem cells (hDPSCs) cultured on scaffolds of polylactic/polyglycolic acid (PLGA) with and without hydroxyapatite (HA) **METHOD:** Experimental study *in vitro* that used samples of premolars, molars included. The hDPSCs were cultured on scaffolds (PLGA/HA and PLGA) with medium osteogenic differentiation STEMPRO® and then, it was evaluated adherence, cell proliferation and differentiation to osteoblastic lineage in three differents times; 7, 15 and 30 days. Each experiment was performed in triplicate. Analysis of the data was performed with Split Plot block and Manova model. A pilot study was made in rabbits animal model for to evaluate the bone regeneration on histological and clinic level. **RESULTS:** The proliferation and differentiation of osteoblast lineage hDPSCs was better in the scaffold PLGA/HA at 7, 15 and 30 days, we didn't found statistically significant difference in adherence between the two types of scaffolds were observed. *In vivo* the scaffolds of PLGA/HA regenerated critical size bone lesions. **CONCLUSION:** The behavior *in vitro* of hDPSCs on scaffolds (PLGA/HA and PLAGA) was significantly different, PLGA/HA scaffold has provided better physical and chemical signals, giving proliferation and differentiation to osteoblastic lineage of hDPSCs.

Keywords: Human dental pulp mesenchymal stem cells, tissue engineering, biomimetic materials, scaffolds, osteoblasts, growth factors.

Contenido

Resumen	VIII
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVI
1. Introducción	3
1.1 Justificación	3
1.2 Planteamiento del problema	7
1.3 Objetivos.....	9
1.3.1 Objetivo general.....	9
1.3.2 Objetivos específicos	9
2. Marco teórico: Comportamiento de células stem dentales en ingeniería de tejidos óseos	10
2.1 Composición del tejido óseo	13
2.1.1 Biomineralización y diferenciación <i>in vivo</i> de células stem mesénquimales a osteoblastos	15
2.2 Principios generales de la ingeniería de tejidos	17
2.3 Matrices tridimensionales extracelulares para tejido óseo	18
2.3.1 Los polímeros	19
2.3.2 Cerámicas.....	20
2.3.3 Biocompuestos.....	21
2.4 Células stem mesenquimales: Aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos...	22
2.5 Factores de crecimiento implicados en la formación de tejido óseo.....	25
2.5.1 Diferenciación osteogénica de células stem mesénquimales <i>in vitro</i> ...	26
2.6 Comportamiento celular: Vista previa en la calidad de la interacción célula-biomaterial	29
3. Aspectos metodológicos específicos	32
3.1 Tipo de estudio	32
3.2 Tamaño de muestra y diseño experimental	32
3.3 Criterios de inclusión y exclusión	33
3.4 Variables a estudiar	34
3.5 Análisis estadístico	35
4. Materiales y métodos	36
4.1 Caracterización de células stem mesenquimales de origen dental humano...	36
4.1.1 Obtención de la muestra	36
4.1.2 Aislamiento y expansión de hDPSCs	37
4.1.3 Inmunofenotipificación de las hDPSCs.....	37

XII Comportamiento *in vitro* de células stem mesénquimales de origen dental humano en matrices extracelulares tridimensionales de ácido poliláctico/poliglicólico con y sin hidroxiapatita

4.1.4	Expresión génica de las hDPSCs	38
4.1.5	Tiempo de doblaje poblacional	39
4.1.6	Osteodiferenciación de hDPSCs en cultivo monocapa	40
4.2	Caracterización de las matrices extracelulares tridimensionales	41
4.2.1	Obtención y caracterización de la hidroxiapatita bovina	41
4.2.2	Síntesis de las matrices tridimensionales: PLGA/HA y PLGA	42
4.3	Estudio piloto: Diferenciación osteogénica de hDPSCs en matrices tridimensionales de PLGA/HA	43
4.3.1	Cultivo de las hDPSCs en las matrices de PLGA/HA	44
4.3.1.1	Expresión génica de las hDPSCs osteodiferenciadas	44
4.3.1.2	Morfología y adhesión de las hDPSCs osteodiferenciadas en PLGA/HA	45
4.4	Evaluación del comportamiento de las hDPSCs en matrices tridimensionales de PLGA y de PLGA/HA	45
4.4.1	Adhesión celular	46
4.4.2	Determinación de proliferación celular	46
4.4.3	Perfil de expresión génica	47
4.5	Estudio piloto: Comportamiento <i>in vivo</i> de células stem de origen dental humano en matrices de PLGA/HA	48
4.5.1	Modelo experimental <i>in vivo</i>	49
4.5.1.1	Preparación pre-quirúrgica	49
4.5.2	Análisis clínico	50
4.5.3	Análisis Histológico	50
4.5.4	Hallazgos y evolución clínica postoperatoria de los conejos Nueva Zelanda	50
5.	Resultados	52
5.1	Caracterización de células stem mesenquimales de origen dental humano ..	52
5.1.1	Evaluación morfológica	52
5.1.2	Inmunofenotipificación de las hDPSCs	53
5.1.3	Evaluación de la expresión de los genes de pluripotencia	55
5.1.3.1	PCR-RT	55
5.1.4	Doblaje poblacional (PDT) de las hDPSCs en cultivos en monocapa ..	56
5.1.5	Diferenciación osteogénica de las hDPSCs en cultivo monocapa	57
5.2	Caracterización de las matrices extracelulares tridimensionales	58
5.2.1	MEB y análisis EDX de la HA bovina	58
5.2.2	Análisis de difracción de rayos X	59
5.2.3	MEB y análisis EDX de matrices tridimensionales: PLGA/HA y PLGA ..	60
5.3	Estudio piloto: Diferenciación osteogénica de hDPSCs en matrices tridimensionales de PLGA/HA	64
5.3.1	PCR-RT de hDPSCs osteodiferenciadas en matriz de PLGA/HA	64
5.3.2	Morfología y adhesión de hDPSCs osteodiferenciadas en matriz de PLGA/HA	65
5.4	Evaluación del comportamiento de las hDPSCs en matrices 3D de PLGA y de PLGA/HA	66
5.4.1	Morfología y adhesión celular	66
5.4.2	Determinación de proliferación celular	71
5.4.3	Perfil de expresión génica	75

5.5	Estudio piloto: Comportamiento <i>in vivo</i> de hDPSCs en matrices de PLGA/HA.....	82
5.5.1	Análisis clínico.....	82
5.5.2	Análisis histológico.....	83
6.	Discusión.....	87
7.	Conclusiones.....	97
A.	Anexo: Consentimiento informado.....	98
B.	Anexo: Acuerdo de confidencialidad.....	101
C.	Anexo: Aprobación comité de ética.....	103
8.	Bibliografía.....	104

Lista de figuras

Figura 2-1: Etapas de la diferenciación osteogénica.....	27
Figura 4-1: Hidroxiapatita bovina obtenida por sinterización.....	42
Figura 4-2: Matriz tridimensional de PLGA y PLGA/HA después de liofilizar.....	43
Figura 4-3: Procedimiento quirúrgico conejos Nueva Zelanda	51
Figura 5-1: Fotografía de unidades formadoras de colonias (UFC).....	52
Figura 5-2: Fotografía de cultivo celular en monocapa.....	53
Figura 5-3: Histogramas de citometrías de flujo de hDPSCs.....	54
Figura 5-4: Electroforesis en gel de agarosa PCR convencional.....	55
Figura 5-5: Expresión de los genes de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog por cuantificación relativa 2-DDCT.....	56
Figura 5-6: Expresión relativa de los genes RUNX2, ALP y OP en hDPSCs cultivadas en monocapa.....	57
Figura 5-7: MEB Hidroxiapatita bovina obtenida por proceso de sinterización.....	58
Figura 5-8: Análisis EDX de hidroxiapatita bovina	59
Figura 5-9: Difractograma comparativo en 3D de difracción de rayos X	60
Figura 5-10: Morfología externa del material compuesto de PLGA-HA	60
Figura 5-11: Magnificación de la pared de un poro de matriz PLGA/HA	61
Figura 5-12: Distribución homogénea de las partículas de cerámica de HA en matriz de PLGA/HA	61
Figura 5-13: MEB de matriz tridimensional de PLGA.....	62
Figura 5-14: Análisis EDX de matriz tridimensional de PLGA/HA.....	63
Figura 5-15: Análisis EDX de matriz tridimensional de PLGA.....	63
Figura 5-16: Cuantificación relativa de los genes RUNX2, ALP, COL1 y OPN en hDPSCs osteodiferenciadas en PLGA/HA por 7 días.....	65
Figura 5-17: MEB morfología y adhesión de las hDPSCs en matriz de PLGA/HA.....	65
Figura 5-18: MEB de hDPSCs osteodiferenciadas en matrices de PLGA y PLGA/HA 7 días.....	66
Figura 5-19: hDPSCs osteodiferenciadas en matrices de PLGA/HA 15 días.....	67
Figura 5-20: hDPSCs osteodiferenciadas en matrices de PLGA/HA 30 días.....	68
Figura 5-21: Comparación morfológica de hDPSCs en MC de cultivo, medio de diferenciación y osteoblastos humanos en matrices de PLGA/HA 30 días.....	70
Figura 5-22: Comparación morfológica de hDPSCs en MC de cultivo, medio de diferenciación y osteoblastos humanos en matrices de PLGA 30 días.....	70
Figura 5-23: Diagramas de caja y bigotes por tipo de soporte (PLGA/HA y PLGA) en cada uno de los tiempos (7, 15 y 30 días).....	71
Figura 5-24: Perfiles de cada una de las réplicas por tipo de material y medio de cultivo en cada uno de los tiempos.....	72
Figura 5-25: Perfiles medios de cada medio de cultivo en cada uno de los materiales...	73
Figura 5-26: Plot de efecto material a través del tiempo.....	74

Figura 5-27: Análisis estadístico descriptivo de los genes RUNX2, ALP, OPN y COL I..	78
Figura 5-28: Mapa de calor	79
Figura 5-29: Corte transversal de espécimen mandibular derecha	82
Figura 5-30: Visualización clínica ex vivo.....	83
Figura 5-31: Transición de tejidos en tinción con H&E de HA/PLGA+hDPSCs a 30 días post- implantada.....	84
Figura 5-32: Gráfico de barras Osteoblastos.....	85
Figura 5-33: Gráfico de barras vasos sanguíneos.....	85
Figura 5-34: Tinción con H&E del constructo HA/PLGA a 30 días post implantada a 20X.....	86
Figura 5-35: Tinción con H&EHA/PLGA+hDPSCs a 30 días post implantada a 40X.....	86

Lista de tablas

Tabla 2-1:	Propiedades mecánicas de los huesos (1).....	15
Tabla 2-2:	Criterios y consideraciones funcionales para el diseño de matrices 3D extracelulares utilizados en ingeniería de tejidos ósea (54)	19
Tabla 3-1:	Diseño experimental: Grupos establecidos para la evaluación de las variables a través del tiempo con sus respectivos tipos de matrices extracelulares.....	33
Tabla 3-2:	Modelo de parcelas divididas en bloque.....	35
Tabla 5-1:	Estimación de los coeficientes con su respectivo P valor.....	74
Tabla 5-2:	Salida en el software R del modelo Manova.....	80
Tabla 5-3:	Interacción obtenidas; modelo estadístico Manova semi-paramétrico.....	80

1. Introducción

1.1 Justificación

En las áreas de la ortopedia, traumatología, odontología, cirugía plástica y maxilofacial, son frecuentes los problemas en el sistema esquelético, en los que se involucra la pérdida del tejido ocasionado por enfermedades crónicas degenerativas, traumas, tumores, envejecimiento, reabsorciones en pacientes edéntulos, deformidades óseas congénitas entre otras, razón por la cual las Naciones Unidas en la década del 2000 al 2010 la denominó “La década de los huesos y las articulaciones”, esto con el propósito de generar conciencia del impacto que desencadenan los problemas óseos en la salud humana y promover la investigación y desarrollo tecnológico en esta área (1,2).

La Academia American de Cirugía Ortopédica (AAOS) reportó en 1995 tres millones de procedimientos ortopédicos en hospitales de los Estados Unidos, alrededor de 1'230.000 fracturas fueron tratadas al año usando material osteosintético, de las cuales el 80% requirieron injertos (3) . En el 2004, en Colombia, el Hospital General de Medellín reportó que un millón de procedimientos quirúrgicos realizados en el año demandan injertos óseos (4). En el 2006, el Hospital Militar Central de Bogotá reportó que recibía anualmente un promedio de 348 pacientes heridos en combate de guerra, de los cuales 12 años atrás del año 2006, 846 requirieron procesos reconstructivos a nivel óseo (5). En el 2007 se reportó que entre los años 2004 y 2006 los traumas maxilofaciales, dentales y de tejidos blandos ocasionados por accidentes de tránsito en un 57.9%, seguido por agresiones 20.4%, traumas 14.8% y otras 6.9% han sido tratados con materiales osteosintéticos (4). Actualmente, se reporta un incremento en la aplicación de implantes para hueso, por ejemplo en Europa se realizan más de 400.000 cirugías de injertos óseos anualmente y más de 600.000 se realizan en Estados Unidos (6,7). Por esto surge la necesidad de implementar estrategias terapéuticas para el manejo de

lesiones a nivel del tejido óseo. Una alternativa que se ha planteado desde años atrás es la ingeniería de tejidos, cuyo principio básico es emplear; constructos tridimensionales de biomateriales naturales o sintéticos, células stem o células ya diferenciadas a osteoblastos y moléculas señal como factores de crecimiento, esto con el objetivo de crear el tejido *in vitro* para ser posteriormente implantado en el sitio de la lesión.

Considerando los principios básicos de la ingeniería de tejidos, es de vital importancia elegir la fuente de células que permita su aislamiento, así como una rápida y eficiente expansión *in vitro*. La fuente ideal es aquella que permita la expansión en el laboratorio y no sean células inmunogénicas, además deben presentar un patrón característico de proteínas similar al del tejido que va a ser regenerado, en este caso tejido óseo. Para tratar lesiones de tamaño crítico en el tejido óseo, las mejores células serían los osteoblastos o las células stem mesenquimales (MSC).

Las MSC son células pluripotenciales y adultas con morfología fibroblastoide, capacidad de auto-renovación y potencial de diferenciación hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteoblastos, adipocitos, miocitos entre otros. Estas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo de donde se han logrado establecer cultivos que han permitido estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas (8).

Para la regeneración de tejido óseo, la fuente de células stem mesenquimales (MSC) más estudiada ha sido la médula ósea. Estas MSC son capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* para generar hueso y cartílago (9,10), aunque es una fuente importante de obtención; el 0.003% de las células mononucleares de médula ósea humana son MSC según Beyer *et al* 2006 (8), otros autores reportan que el 0.001% y el 0.01% de las células mononucleares son MSC, esto puede variar entre pacientes dependiendo de su edad (9,10). Existen algunos aspectos que dificultan su uso tales como: limitada tasa de crecimiento, la capacidad de diferenciación de acuerdo a la edad del donante de la médula y el riesgo en la toma de muestra, adicionalmente el volumen del aspirado de la medula debe ser de 150ml o superior y la técnica podrían influenciar el número de células aisladas (8).

Las células stem mesenquimales aisladas a partir de tejido adiposo, descubiertas más recientemente (11) parecen tener un buen potencial de diferenciación a osteoblastos, condrocitos, adipocitos y a células epiteliales. Los volúmenes de los lipoaspirados pueden ir desde 100ml hasta varios litros y contener una frecuencia relativamente alta de células stem mesénquimales (1 al 5%). El potencial de diferenciación depende del manejo de cultivo y de los sitios de obtención de la muestra (abdomen, brazos, glúteos). Algunos estudios han reportado una expresión positiva del marcador hematopoyético CD34 en células adherentes de cultivos primarios, poniendo en manifiesto la expresión de un marcador no mesenquimal (12,13).

Sobre la obtención de las células stem mesénquimales a partir de sangre de cordón umbilical, se afirma que es un procedimiento que requiere optimizar puntos críticos para lograr un cultivo exitoso, tales como el tiempo de recolección y procesamiento que debe ser inferior a 16 horas, así como el volumen de sangre recolectado igual o superior a 30ml (14).

Entre las fuentes de obtención de células stem mesénquimales de origen dental encontramos células stem de pulpa dental humana (hDPSCs), estas resultan ser altamente proliferativas, clonogénicas capaces de diferenciarse en células parecidas a los odontoblastos y formar el complejo dentino pulpar (15,16). Las hDPSCs se encuentran distribuidas a lo largo de una zona rica en distintos tipos celulares, frecuentemente ocupando la zona perivascular de este tejido, la pulpa cameral y radicular. Su morfología es similar a la de los fibroblastos y luego de recibir el estímulo apropiado las hDPSCs pueden tener diferenciación terminal en fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos y neuronas. Existen estudios en los cuales se afirma que en los tejidos pulpares viejos el número de hDPSCs puede decrecer, lo que conlleva a una disminución del potencial de regeneración de la pulpa dental humana, sin embargo, estas células tienen un alto potencial para regeneración de tejido óseo (15–17). Autores como Davies *et al* 2014 y Lee SH *et al* 2010, han reportado que estas células tienen una mayor capacidad de mineralización comparada con células stem de medula ósea y tejido adiposo, además según Shi *et al* 2001, bajo las mismas condiciones estándares de cultivo, han demostrado tener una mayor capacidad de proliferación que las células stem de medula ósea, hecho asociado con la fuerte expresión quinasa 6 dependiente de

ciclina (18), razones por las cuales son células idóneas para emplearlas en ingeniería de tejidos ósea.

Por otra parte, considerando la triada que conforma la ingeniería de tejidos ósea, los constructos tridimensionales mayormente empleados han sido las cerámicas como la hidroxiapatita de calcio, los polímeros como el polimetilmetacrilato, polietileno (PE), poliuretano y ácidos como el poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA) como sus copolímeros (Ácido poliláctico/glicólico) PLGA. Además de soportar el crecimiento celular; estos materiales no producen toxicidad, son bio-compatibles, se degradan por hidrólisis y están aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) (19).

Varios estudios han mostrado el uso de PLGA como un biomaterial capaz de inducir la formación de nuevo tejido óseo, entre sus ventajas se destaca su versatilidad de adquirir diferentes formas dependiendo del método de fabricación empleado, el tiempo de degradación, la resistencia mecánica y flexibilidad se puede modular fácilmente alterando la proporción del copolímero y las células se distribuyen uniformemente en el andamio mejorando así la osteogénesis en todo el sistema. Por otra parte se ha propuesto más recientemente el uso de biocompuesto; materiales que combinan una fase orgánica representada por una fase polimérica que le confiere la propiedad de resistencia a la compresión de cargas, con una fase inorgánica representada por cerámicas que confieren dureza, esto con el propósito de generar materiales bioactivos con propiedades mecánicas y perfiles de degradación mejoradas (20).

Los constructos tridimensionales que mimetizan la matriz extracelular pueden ser estudiados desde dos diferentes aspectos relacionados entre sí. En primer lugar, existen estudios que han tratado de comprender los mecanismos de adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular en estos constructos tridimensionales (20–24); estas y otras multitudinarias respuestas celulares se rigen de las complejas señales físicas y químicas del microambiente circundante que abarcan diferentes escalas de longitud, de lo macro a lo nano, mecanismos que actualmente son poco conocidos. Comprender estas interacciones puede tener profundas implicaciones en el eventual control y programación de diversas funciones celulares. Esto nos lleva al segundo aspecto; correspondiente al resultado del comportamiento de las células sembradas en los

estructuras tridimensionales de biomateriales una vez implantadas en los sitios de la lesión del paciente (25). La modulación de la diferenciación de las células stem hacia linajes celulares específicos es fundamental en la regeneración de cualquier tipo de tejido; en el tejido óseo debe formarse vasos sanguíneos para que se dé el aporte de nutrientes a las células diferenciadas, al tejido regenerado que debe integrarse con el tejido adyacente del sitio de la lesión y finalmente haya una regeneración de la lesión. Normalmente el biomaterial sirve como soporte biomimético tridimensional de la matriz extracelular que son programados para proveer señales físicas y/o químicas a las células y las respuestas celulares a estas señales deben ser estudiadas (26).

Por lo tanto, el propósito de este trabajo de investigación es estudiar el comportamiento de células stem mesénquimales con potencial osteogénico como lo han demostrado ser las hDPSCs en constructos tridimensionales de una sola fase polimérica como el PLGA y de biocompuestos constituidos por una fase polimérica y cerámica (PLGA/HA), esto para evaluar como las señales físicas y químicas de cada uno de ellos afecta las repuesta celulares involucradas en los procesos de proliferación adhesión y diferenciación celular, claves en la regeneración del tejido óseo.

1.2 Planteamiento del problema

Los defectos óseos provocados por traumas, anomalías congénitas, infecciones o resecciones de tumores no se reparan espontáneamente, lo que representa un importante desafío para la ingeniería tisular. La ingeniería tisular involucra el diseño, construcción, modificación, reparación y regeneración de los tejidos vivos utilizando biomateriales, células y factores de crecimiento (27). En los últimos años, se ha convertido en una estrategia terapéutica de regeneración tisular que produce mínima invasividad. El principal desafío consiste en aislar células obtenidas de pequeñas biopsias de los pacientes y hacerlas crecer sobre matrices tridimensionales *in vitro*, para trasplantarlas a la zona deseada y así dirigir la formación del nuevo tejido (28). En el campo de la regeneración ósea, los tratamientos clínicos actuales han generado resultados pobres relacionados con la limitada disponibilidad de hueso autólogo, como también el riesgo de transmisión de enfermedades y de rechazo que producen los aloinjertos y xenoinjertos óseos. Por otra parte, metales como el hierro, cobalto y titanio pueden ser implantados de manera permanente en el hueso para llenar los defectos y

brindar fijación interna; sin embargo, la fatiga, corrosión, infección de los tejidos y la pobre interface que se genera tejido/implante genera complicaciones haciendo necesaria su remoción (29).

Para lograr un tratamiento efectivo en la regeneración del tejido óseo, un sustituto diseñado con ingeniería de tejidos debe cumplir con los siguientes requerimientos: **1).** Proveer resistencia mecánica de manera temporal en el área afectada; **2).** Actuar como sustrato para la deposición y crecimiento del tejido óseo; **3).** Poseer estructura porosa que permita la vascularización y crecimiento óseo; **4).** Inducir la migración de células a la zona del defecto y estimular su actividad para la regeneración y reparación; **5).** Degradarse de manera controlada sin causar toxicidad y **6).** No causar una respuesta inflamatoria significativa (30).

Los polímeros como el polimetilmetacrilato, polietileno (PE), poliuretano y ácidos como el poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA) como sus copolímeros PLGA constituyen otra fuente de biomateriales usados para reemplazo o fijación de huesos y rellenos óseos; siendo algunos de ellos biodegradables. Además de soportar el crecimiento celular; estos materiales no producen toxicidad, son bio-compatibles, se degradan por hidrólisis y están aprobados por la FDA (19).

Varios estudios han mostrado el uso de PLGA como un biomaterial capaz de inducir la formación de nuevo tejido óseo, sus ventajas incluyen: Se puede fabricar con diferentes formas; el tiempo de degradación, la resistencia mecánica y flexibilidad se puede modular fácilmente por alterar la proporción del copolímero y las células se distribuyen uniformemente en el andamio mejorando así la osteogénesis en todo el sistema(27,29,31)

Las cerámicas, se han utilizado como alternativa a los materiales metálicos con el fin de aumentar la biocompatibilidad de los implantes. La Hidroxiapatita (HA) es un fosfato de calcio cuyo fórmula estequiométrica es $(Ca_{10} (PO_4)_6(OH_2))$ (22,26), es el mayor componente inorgánico del hueso, es un cerámico osteoinductivo, con excelente bioactividad y contribuye a la promoción celular, sin embargo provee baja resistencia mecánica si es empleada de forma individual, por lo que se hace necesario combinarla

con copolímeros, para mejorar sus propiedades mecánicas. Se cree que la fabricación de este tipo de composites aumenta la proliferación, adhesión y viabilidad celular (19,32,33). Por otra parte, la alta porosidad e interconectividad obtenida de la combinación de estos materiales proporciona suficiente espacio para promover la infiltración celular (31). Todas estas propiedades del PLGA e hidroxiapatita (HA) combinado con el potencial de diferenciación multilineal de las células stem de pulpa dental (hDPSCs) podrían ser el método terapéutico de elección para la regeneración tisular ósea. Sin embargo es necesario realizar estudios *in vitro* previos para determinar si este biocomposito (PLGA y HA) mejora el comportamiento de las células stem cultivadas en ellas y así garantizar la regeneración ósea, por tanto la pregunta de investigación planteada es ¿Cómo se comportan las hDPSCs en matrices extracelulares tridimensionales de PLGA con y sin HA? Esto con el fin de determinar las diferencias existentes entre las matrices con y sin HA y poder elegir la matriz que provea las mejores propiedades biológicas para regeneración de tejido óseo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Analizar el comportamiento *in vitro* de las hDPSCs cultivadas en matrices extracelulares tridimensionales de ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA) con y sin hidroxiapatita (HA).

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la adhesión de las células stem dentales en las matrices tridimensionales de ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA) con y sin Hidroxiapatita (HA).
- Analizar la cinética de la proliferación celular al interior de las matrices tridimensionales de ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA) con y sin Hidroxiapatita (HA).
- Determinar *in vitro* la diferenciación osteogénica evaluando la expresión génica de las hDPSCs y de los osteoblastos cultivados en las matrices extracelulares tridimensionales sintéticas.

2. Marco teórico: Comportamiento de células stem dentales en ingeniería de tejidos óseos

El tejido óseo es altamente organizado, vascularizado, dinámico, extremadamente especializado y se encuentra en continua remodelación, proceso que consiste en la destrucción y formación de masa ósea lo que permite la auto-regeneración de pequeñas lesiones sin ningún tipo de tratamiento. Además, es fuente de minerales con capacidad de movilizarlos y liberarlos según la demanda fisiológica. En General, el esqueleto de los vertebrados cumple múltiples funciones; como proveer soporte y protección a los tejidos blandos, mantener la homeostasis principalmente de calcio y fosforo, contribuir a la contracción muscular y se encarga de la producción de células sanguíneas, ya que en la medula ósea se encuentran células hematopoyéticas indiferenciadas. Cualquier alteración en este tejido puede afectar el balance corporal y la calidad de vida, por esto el tejido óseo es objetivo de investigación a nivel mundial, donde los estudios principalmente se focalizan en aspectos histológicos y función sistémica (34).

La remodelación ósea resulta del balance entre la actividad de los osteoblastos y osteoclastos, permitiendo la adaptación a las tenciones mecánicas, de este modo se mantiene la salud del tejido y permite la regeneración de lesiones pequeñas. Un estudio reciente demostró que es necesario el acople entre la resorción ósea realizada por los osteoclastos y la formación ósea realizada por los osteoblastos para la homeostasis del tejido (35). Debido al potencial del hueso en regenerarse espontáneamente, lesiones pequeñas como fracturas se curan con terapia convencional o con cirugía. Sin embargo, en lesiones de tamaño crítico, que se definen como lesiones que superan en longitud el 10% o más del hueso afectado causadas por traumas, patologías congénitas, resección

de tumores, no pueden regenerarse espontáneamente(36), por lo que se acude en la práctica clínica al uso de injertos óseos o biomateriales.

La primera elección para tratar lesiones de tamaño crítico son los injertos óseos, estos se definen como; un material implantado que promueve la regeneración del tejido solo o en combinación con otro tipo de material (37), debido a su capacidad de promover osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción(34,38,39). No obstante, en esta elección se deben considerar diferentes factores como la viabilidad del tejido, el tamaño del defecto, el tamaño del injerto, la forma y el volumen, las características biomecánicas, la manipulación del injerto, costo, consideraciones éticas, características biológicas y las complicaciones asociadas(39,40).

Existen diferentes tipos de injertos óseos, entre ellos se encuentran los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. Los autoinjertos son considerados como el *gold standard* en la reconstrucción de defectos óseos pequeños, son osteogénicos, osteoconductivos y osteoinductivos, sirven como soporte activo y como transportador de células indiferenciadas, capaces de migrar y proliferar a la zona central de la lesión guiando la regeneración de hueso (39,41), sin embargo tiene algunas desventajas y limitaciones como; la necesidad de otro procedimiento quirúrgico para obtener el injerto, largo tiempo de recuperación, susceptibilidad a infección y reabsorción ósea constante y progresiva (34). Por otra parte los aloinjertos y xenoinjertos tienen propiedades osteoinductivas y osteoconductivas pero carecen de la capacidad osteogénica, sus principales desventajas son; el posible rechazo del injerto, transmisión de agentes patógenos, el costo, tener baja capacidad de asociarse con el tejido óseo sano del huésped comparado con el autoinjerto y puntualmente, los xenoinjertos pueden transmitir enfermedades zoonóticas. Por lo tanto el desarrollo de biomateriales para el tratamiento de lesiones óseas es de vital importancia, pues se requiere satisfacer la creciente demanda de implantaciones ortopédicas y odontológicas.

Actualmente, se encuentra en incremento la necesidad de implantes para hueso, por ejemplo en Europa se realizan más de 400.000 cirugías de injertos óseos anualmente y más de 600.000 se realizan en Estados Unidos (6,7). Por esto surge la necesidad de implementar estrategias terapéuticas para el manejo de lesiones a nivel del tejido óseo,

una alternativa que se ha planteado desde años atrás es la ingeniería de tejidos, cuyo principio básico es emplear; constructos tridimensionales de biomateriales naturales o sintéticos, células stem o células ya diferenciadas a osteoblastos y moléculas señal como factores de crecimiento, esto con el objetivo de crear el tejido *in vitro* para ser posteriormente implantado en el sitio de la lesión. Sin embargo, esto no ha podido llevarse directamente a la práctica clínica por la existencia de desafíos aun no superados.

Los desafíos relacionados a esta triada de la ingeniería de tejidos se encuentran representados por preguntas clínicas relevantes que deben ser formuladas y contestadas; y estas respuestas deben ser objetadas con rigor y con estándares de desempeño cuantificables, estas preguntas son: ¿Cuáles son las concentraciones fisiológicas y terapéuticas necesarias de las células y los mediadores biológicos? ¿Qué distribución temporal y espacial se requiere de los elementos que conforman la triada para la regeneración de tejidos y cuáles son las dinámicas fisiológicas y cinéticas asociadas a estas distribuciones? (42).

Para responder estas preguntas, biólogos, químicos, ingenieros, científicos de materiales se deben comprometer a trabajar por un frente común, debe existir coalescencia entre los principios multidisciplinarios de la ingeniería de tejidos y el código del desarrollo. Es necesario trascender del principio filosófico de la ingeniería de tejidos a una realidad clínicamente guiada para la implementación terapéutica (42). Específicamente, se debe lograr una precisión y coordinación entre las respuestas de las células con el biomaterial y con las moléculas de señalización biológica para que coincida con el proceso de la regeneración dinámica de la lesión ósea; esto es fundamental, dado que las células responden de una manera heterogénea a la superficie de diferentes biomateriales.

La importancia de los constructos tridimensionales que mimetizan la matriz extracelular puede ser disertada desde dos diferentes aspectos que son a su vez relacionados entre sí. En primer lugar, existen estudios que han tratado de comprender los mecanismos de adhesión, proliferación, migración y diferenciación de las células en estos constructos tridimensionales (20–24); estas y otras multitudinarias respuestas celulares se rigen de las complejas señales físicas y químicas del entorno circundante que abarcan diferentes escalas de longitud, de lo macro a lo nano, mecanismos que actualmente son poco

conocidos. Comprender estas interacciones puede tener profundas implicaciones en el eventual control y programación de diversas funciones celulares. Esto nos lleva al segundo aspecto; correspondiente al resultado del comportamiento de las células sembradas en los constructos tridimensionales de biomateriales una vez implantadas en el sitio de la lesión del paciente (25). El control en la diferenciación de las células madre a linajes celulares específicos es vital en la regeneración de cualquier tipo de tejido; en el tejido óseo debe formarse vasos sanguíneos para que se dé el aporte de nutrientes a las células diferenciadas, al tejido regenerado que debe integrarse con el tejido adyacente del sitio de la lesión y finalmente haya una regeneración de la herida. Normalmente el biomaterial sirve como soporte biomimético tridimensional de la matriz extracelular que son programados para proveer señales físicas y/o químicas a las células y las respuestas de ellas a estas señales deben ser estudiadas (26). Esto puede ser un buen punto de partida para entender las diferentes facetas de las interacciones célula-material, no obstante debemos considerar que *in vivo* las células stem se encuentran en un complejo nano ambiente tridimensional, el cual envía señales controladas espaciales y temporales a las células para provocar respuestas específicas. Además, la interacción entre diferentes células influye en el comportamiento celular (43–46).

Las funciones avanzadas como el preciso control de las señales temporo-espaciales simultáneas con las físico-químicas en los constructos 3D biomiméticos es difícil. Por esto, se intentará delinear el estado del arte actual en la interacción célula-biomaterial *in vitro*, discutiendo ejemplos científicos representativos en la regeneración del tejido óseo mediante la implementación de células stem dentales humanas. Para lograr esto es fundamental dilucidar la conformación histológica del tejido óseo y su funcionamiento.

2.1 Composición del tejido óseo

La composición química del tejido óseo corresponde al 25% de agua, el 45% a su contenido inorgánico o mineral y el 30% restante es materia orgánica. De este modo, los componentes inorgánicos alcanzan un peso estimado al 70% de la masa total de tejido óseo y tan solo el 30% corresponde a la fase orgánica. Estos componentes minerales no son inertes, ni permanecen constantes, estos son permanentemente reemplazados e

intercambiados junto con los componentes orgánicos por el proceso del remodelado óseo.

Microestructuralmente, el tejido óseo está compuesto por:

- Células de origen mesénquimal: Las cuales contribuyen a la síntesis de la matriz intercelular (células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y las células de recubrimiento), y por los osteoclastos de origen hematopoyético, encargados de la reabsorción ósea (47,48).
- La matriz se compone de una fase orgánica y una fase inorgánica. La porción orgánica corresponde al 30% de la masa ósea total, esta se compone principalmente de colágeno tipo I y de proteínas no colágenas en menor proporción como osteocalcina, osteonectina, sialoproteína ósea, proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, factores de crecimiento, proteínas morfogenéticas de hueso, etc.), glicoproteínas, carbohidratos y lípidos. La porción inorgánica que constituye el 70% de la masa ósea; está compuesta principalmente por hidroxiapatita de calcio y fases no apatitas formadas por carbonato de calcio, fosfato octacálcico, entre otros (47).

En la literatura se reporta que la fuerza y dureza del tejido óseo dependen de su contenido mineral, sin embargo, es evidente que ambas fases, orgánica e inorgánica, contribuyen con las propiedades mecánicas del hueso. Las propiedades mecánicas del hueso varían dependiendo del tipo de hueso, sea cortical o trabecular. El hueso cortical tiene un mayor módulo de Young con respecto al hueso trabecular, de igual forma tiene una mayor resistencia a las fracturas, límites de tracción y compresión comparado con el hueso trabecular (Tabla 2-1) (1). El contenido de agua en los huesos es otro factor importante que determina el comportamiento mecánico. Los lípidos de las proteínas no colágenas que corresponden al 2% del hueso, juegan una función importante en la biomineralización. El grado de biomineralización es el factor más importante para determinar las capacidades mecánicas del hueso.

Tabla 2-1. Propiedades mecánicas de los huesos (1).

Propiedades	Medidas	
	Hueso cortical	Hueso trabecular
Módulo de Young (GPa)	14-20	0.05-0.5
Límite a tracción (MPa)	50-150	10-20
Límite a compresión (MPa)	170-193	7-10
Resistencia a la fractura (MPa m ^{1/2})	2-12	0.1
Rotura a tracción	1-3	5-7
Densidad (g/cm ³)	18-22	0.1-1.0
Densidad aparente (g/cm ³)	1.8-2.0	0.1-1.0
Volumen superficie/hueso (mm ² /mm ³)	2.5	2.0
Volumen total del hueso (mm ³)	1.4 ~ 10 ⁶	0.35 ~ 10 ⁶

2.1.1 Biomineralización y diferenciación *in vivo* de células stem mesénquimales a osteoblastos

Los osteoblastos; son las células responsables de la deposición de la matriz para formar el hueso. En este proceso inicialmente los osteoblastos depositan una matriz extracelular, compuesta principalmente por colágeno tipo I y proteínas no colágenas. El colágeno forma una matriz fibrosa entrecruzada que determina la organización estructural del hueso ya sea cortical o trabecular y en ella se alojan los depósitos minerales y proteínas no colágenas, permitiendo la flexibilidad del tejido mineralizado (17). Es importante puntualizar que los minerales no están directamente ligados al colágeno, están ligados a través de las proteínas no colágenas contribuyendo a la biomineralización y unión celular. Cuando los osteoblastos depositan matriz extracelular, esta inicialmente es desorganizada y estructuralmente débil, al transcurrir el tiempo se mineraliza.

La mineralización es el resultado de la deposición de cristales de fosfato tricálcico que después de hidroxilación se convierte en la hidroxiapatita, dando así al hueso la característica de tejido duro. A nivel macroestructural el hueso laminar maduro puede ser esponjoso o trabecular; este se caracteriza por tener una mayor porosidad y

concentración de vasos sanguíneos en comparación con el cortical, el tamaño de los poros pueden ser de micrómetros hasta de milímetros. El hueso cortical es mucho más denso, con menor concentración de vasos sanguíneos y menor porosidad, el tamaño de los poros oscilan entre 10 a 20 micrómetros y existen espacios entre ellos de aproximadamente 200 a 300 micrómetros.

Los osteoblastos provienen de la diferenciación de células stem mesénquimales. Este proceso para ser bien entendido usualmente suele dividirse en etapas; de células stem mesenquimales indiferenciadas a pre-osteoblastos y de pre-osteoblastos a osteoblastos maduros. Aunque esta división suele ser útil para la discusión biológica de los osteoblastos, las identidades de las células en las diferentes etapas no son bien comprendidas. Los osteoblastos maduros se caracterizan por la expresión de osteocalcina, osteonectina, sialoproteína ósea, colágeno tipo I y fosfatasa alcalina, sin embargo los pre-osteoblastos, que abarcan todas las células que se encuentran en la transición de célula stem a osteoblasto maduro, son por definición heterogéneas, no obstante se consideran que al encontrarse en esta etapa expresan el factor de transcripción RUNX2 y en una etapa más avanzada de diferenciación expresan RUNX2 y OSX (Osterix) (48).

En la especialización de los osteoblastos hay cambios morfológicos y bioquímicos; la célula de morfología plana y fibroblastoide cambia a cuboide y expresa distintos genes; RUNX2, OSX que desencadenan la transcripción y expresión de proteínas no colágenas, fosfatasa alcalina, osteopontina, sialoproteína ósea y osteocalcina (49), las cuales participan activamente en la formación de la matriz extracelular y en su posterior mineralización. Cada proteína tiene una función específica que determina en un momento dado la calidad y la salud del hueso. Es esta complejidad, la que hace del tejido óseo una estructura única, con características que hasta ahora no son reproducibles en el laboratorio por técnicas de ingeniería. En este aspecto, el desarrollo y la regeneración del tejido óseo es un proceso extremadamente regulado, a partir del cual se involucra un gran conjunto de factores de crecimiento y transcripción que coordinan la interacción de estas células con la matriz extracelular ósea, en respuesta a los estímulos internos o externos que influyen el balance entre los osteoblastos y osteoclastos. Dentro del campo de la medicina regenerativa, el control de la diferenciación de las células

indiferenciadas a osteoblastos maduros sigue siendo un reto para la mejoría de las intervenciones terapéuticas y múltiples investigaciones han sido conducidas con el objetivo de controlar la adhesión y proliferación de las células stem mesénquimales, sin embargo aún se requieren múltiples estudios que permitan dilucidar como se puede controlar estos dos factores fundamentales para la regeneración de tejido óseo, dado que en diferentes biomateriales el comportamiento celular en cuanto a la proliferación, adhesión y diferenciación puede variar (34,43,50–52).

2.2 Principios generales de la ingeniería de tejidos

Como se discutió previamente en relación con la ingeniería de tejidos, se puede concluir que unos de los grandes desafíos en este campo es el desarrollo de los tejidos *in vitro*. Así, el nuevo tema de discusión inicia con una pregunta: ¿Cómo hacer crecer un tejido en el laboratorio?

El primer paso es tener un conocimiento de la biología del tejido óseo. Conocimientos básicos como los tipos de las células que lo componen, los mecanismos de adherencia, proliferación y todos los acontecimientos involucrados en la diferenciación de células stem mesénquimales a ser osteoblastos maduros, lo que demuestra ser esencial para el éxito de este objetivo. A través de este conocimiento, los investigadores debemos trasladar todas esta características biológicas del tejido óseo a un ambiente *in vitro*, teniendo en cuenta el tipo de sustrato, factores de crecimiento, iones y así sucesivamente. Para la regeneración del tejido óseo o incluso para uno diferente, siempre se va a requerir células, matriz extracelular, vasos sanguíneos, nervios, comunicación intracelular y mecanismos que rigen la interacción célula/biomaterial para el desarrollo *in vitro* del tejido. Además de estos requerimientos, los protocolos quirúrgicos bien establecidos y definidos son fundamentales para la utilización exitosa de estos procedimientos.

La estrategia que se emplearía para la intervención de regeneración ósea variaría según el estado clínico del paciente, no obstante existen unos elementos comunes en todas las intervenciones y son; el uso de moléculas señal como los factores de crecimiento, las células stem pluripotenciales, multipotenciales o totipotenciales y la matriz extracelular

3D bien sea natural o sintética, necesaria para el crecimiento y la diferenciación celular. Ahora la combinación de estos tres elementos varía de acuerdo a la edad del paciente, el género, las condiciones sistémicas, hábitos y la forma anatómica del tejido a regenerar. Durante los últimos años, dentro de las estrategias que se han implementado, han sido empleando diferentes combinaciones; desde la utilización del andamio solo, hasta cargarlos con factores de crecimiento(53).

2.3 Matrices tridimensionales extracelulares para tejido óseo

Las matrices tridimensionales extracelulares para regeneración de tejido óseo se obtienen a partir de biomateriales. El término biomaterial hace referencia a cualquier sustancia de origen natural o sintético o en combinación, que pueda ser empleada para reemplazar, aumentar o mantener algún órgano o tejido del cuerpo (30,42,54). Son numerosos los biomateriales estudiados, sin embargo, pocos son empleados en la práctica clínica por las condiciones que deben cumplir en los humanos; compatibilidad, ser aceptado por el organismo receptor, no ser tóxico, ni carcinógeno, ser químicamente estable o biodegradable en productos no tóxicos y que el diseño, el tamaño y la forma sean los adecuados de acuerdo a la lesión. Además, se busca que el biomaterial interactúe con los tejidos adyacentes por medio de poros interconectados que permitan el alojamiento de las células, la comunicación química entre las células y la afinidad molecular del sustrato favoreciendo la interacción con las membranas celulares (7,51,54). La composición y estructura de los biomateriales deben ir en relación a la inducción de respuestas celulares tales como la adhesión, la expresión genética y el fenotipo celular, teniendo en cuenta que las células responden al biomaterial de forma similar a una matriz extracelular natural (20,21,23,34,54).

Las matrices tridimensionales para regeneración ósea debe cumplir con los siguientes requerimientos: Biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, microarquitectura, osteoinductividad, porosidad y debe tener también propiedades en su superficie (Tabla 2-2) (54).

Tabla 2-2. Criterios y consideraciones funcionales para el diseño de matrices 3D extracelulares utilizados en ingeniería de tejidos ósea (54).

Criterio	Función
Biocompatibilidad	Capacidad para realizar su función en el tejido del huésped sin provocar respuesta inmune.
Biodegradabilidad	Tasa de degradación ajustada que coincida con la formación del tejido óseo nuevo.
Propiedades mecánicas	Resistencia mecánica suficiente para prestar un apoyo temporal en la región del defecto y resistir las fuerzas de carga <i>In vivo</i> .
Microarquitectura	La estructura del andamio sea interconectada para distribuir uniformemente las tensiones a lo largo de la matriz extracelular tridimensional.
Osteoinductividad	Propiedad de reclutar y diferenciar células osteoprogenitoras en el lugar de la lesión.
Porosidad	Toda el área de la matriz extracelular tridimensional, debe tener el tamaño y número de poros que permitan el crecimiento del tejido, la neovascularización, el transporte de masas y la osteogénesis.
Propiedades de superficie	Propiedades químicas y topográficas que influyen en la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

En los últimos años se ha producido un fuerte incremento en el número de los andamios tridimensionales para la ingeniería de tejidos ósea, mediante el uso de diferentes materiales y diferentes métodos de fabricación. Los polímeros son los materiales más investigados, seguidos por las cerámicas y los biocompuestos (54).

2.3.1 Los polímeros

Los polímeros biodegradable son los principalmente empleados en la ingeniería de tejidos ósea, su uso y popularidad incrementa con el tiempo (55–58) Los polímeros sintéticos como el polimetilmetacrilato, polietileno (PE), poliuretano y ácidos como el poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA) como sus copolímeros ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA) constituyen otra fuente de biomateriales usados para reemplazo o fijación de huesos y rellenos óseos; siendo algunos de ellos biodegradables; los polímeros sintéticos en general tienen la ventaja de tener tasas de degradación tolerables para el cuerpo humano, mayor previsibilidad de sus propiedades y pueden tener una mejor consistencia de lote a lote de fabricado, además de soportar el crecimiento celular; estos materiales no producen toxicidad, son biocompatibles, se degradan por hidrólisis y están aprobados

por la FDA (Administración de comida y alimentos) (54,59,60). Los polímeros naturales tales como colágeno, quitosano, ácido hialurónico tiene un bajo potencial inmunogénico, con un potencial bioactivo que es capaz de interactuar con el tejido del huésped (59,61).

Varios estudios han mostrado el uso de PLGA como una matriz que induce la formación de nuevo tejido óseo, sus ventajas incluyen: Se puede fabricar con diferentes formas; el tiempo de degradación, la resistencia mecánica y flexibilidad se puede modular fácilmente modificando la proporción de los polímeros que lo conforman y las células se distribuyen uniformemente en el andamio de este tipo de copolímero mejorando así la osteogénesis en todo el sistema y además ha sido ampliamente usado en estudios *in vitro* y en estudios de regeneración ósea *in vivo* (62–65). Aunque sus derivados, el ácido poliláctico y el ácido poliglicólico pueden causar una inflamación local moderada, su compatibilidad y la bioseguridad en la regeneración se ha demostrado en estudios experimentales y clínicos (66). No obstante, este polímero puede llegar a presentar una desventaja; este tienden a tener un módulo de elasticidad bajo, siendo propenso de deformación por un mecanismo denominado arrastre (67), por esto se cree necesario reforzar una matriz de este tipo de material algún tipo de cerámica y se emplee como biocompuesto en la ingeniería de tejidos ósea.

2.3.2 Cerámicas

Las cerámicas más empleadas en la ingeniería de tejidos ósea son aquellas que contienen fosfatos de calcio, las más comúnmente empleadas son la Hidroxiapatita (HAp) y el fosfato tricálcico por su buena biocompatibilidad (32). La Hidroxiapatita (HAp) es un fosfato de calcio cuyo fórmula estequiométrica es $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH_2))$, es el mayor componente inorgánico del hueso, es un cerámico osteoinductivo, con excelente bioactividad y contribuye a la promoción celular (19,32,65,68), sin embargo provee baja resistencia a la fractura si se emplea de forma individual, tiene un elevado módulo de Young entre 7 y 234 GPa y por tanto se emplea en condiciones de cargas compresivas (59,69). Una de las propiedades más importante de las cerámicas es su tribología, en comparación con los metales y polímeros, las cerámicas tienen tasas de desgaste muy bajas de aproximadamente 0.003 mm /año, lo que da como resultados sus altos valores

de dureza, por lo que se emplea comúnmente en la superficie de articulaciones (68,70–72).

2.3.3 Biocompuestos

Los biocompuestos o materiales compuestos poseen las propiedades deseables de diferentes biomateriales con el fin de lograr un efecto sinérgico en sus propiedades resultantes. Estos se han empleado en la ingeniería de tejidos ósea con el fin de eludir las deficiencias de algunos materiales como la resistencia a la fractura, biocompatibilidad o la insuficiencia de elasticidad (31,68,73).

Los biocompuestos comprenden dos fases; una matriz y una fase dispersa. La fase dispersa es generalmente más rígida y dura para impedir el movimiento de la fase matriz. La fase matriz funciona principalmente como medio de transferencia de estrés (59). Los biocompuestos pueden clasificarse en: 1) reforzados con partículas, 2) reforzados con fibra y 3) biocompuestos estructurales. Una de las formas de estimar los resultados de las propiedades combinadas es empleando la fórmula “regla de mezclas”, ecuación que representa el límite superior y el límite inferior del módulo de elasticidad, de la siguiente forma:

$$\text{Límite superior: } E_c(U) = E_m V_m + E_p V_p$$

$$\text{Límite inferior: } E_c(I) = \frac{E_m E_p}{V_m E_p + V_p E_m}$$

Donde m; representa matriz, p; particular, E; módulo de elasticidad y V; fracción de volumen presente. De este modo un aumento en el porcentaje del volumen de la fase dispersa se traduciría en una mayor rigidez debido a la elasticidad combinada. En la ingeniería de tejidos ósea estos biocompuestos están fabricados la fase de la matriz con polímeros y se combinan con cerámicas principalmente aquellas que están compuestas por fosfatos de calcio, lo que ha demostrado tener mejoras en la capacidad de compresión de cargas, mayor bioactividad y una mejor interacción entre huésped e implante (74–77). De acuerdo a la forma 3D del biocompuesto y a la porosidad, los fosfatos de calcio pueden promover desde la superficie adsorción de proteínas morfogenéticas óseas y permitir la circulación endógena de estas, confiriéndole de este modo la osteoinductividad al biocompuesto (34,74,77,78).

2.4 Células stem mesenquimales: Aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos

Considerando los conceptos básicos de la bioingeniería, después de elegir el material adecuado para la regeneración del tejido óseo, surge la necesidad de elegir la fuente de células que permita su aislamiento y expansión en altos números. La fuente ideal es que permítala expansión en el laboratorio y no sean inmunogénicas, además deben presentar un patrón característico de proteínas similar al del tejido que va a ser regenerado, en este caso tejido óseo. Para tratar lesiones de tamaño crítico, las fuentes más representativas son los osteoblastos o las células stem mesenquimales.

Las células stem mesénquimales son células pluripotenciales y adultas con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteoblastos, adipocitos, miocitos entre otros. Estas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo de donde se han logrado establecer cultivos que han permitido estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas (8).

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios para definir las células stem mesénquimales humanas (hMSC); 1), éstas células deben ser adherentes en cultivo; 2), expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y 3), las células madre mesénquimales deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condición estándar de cultivo (79), aunque también se ha reportado diferenciación a linajes neurogénicos y miogénicos. Además de los antígenos propuestos por ISCT, otros autores proponen moléculas como STRO-1, CD44, y CD166 principalmente, además de CD140B, D1K1, CD146, SSEA-4, CD90.2 (Thy1.2), colágeno tipo I, II, IV, V, Agrecan, Byglican, Decorin, (componentes de la matriz extracelular) Cbfa-1 también conocido como RUNX2 (Factor de transcripción) y Bapx-1 (Receptor transcripcional), VCAM, ICAM, L-selectina (moléculas de adhesión), y la secreción de citosinas como MCP-1, VEGF-A IL-6, IL-8 y ENA-78 para la tipificación de células mesénquimales (79–81).

Para la regeneración de tejido óseo, la fuente de obtención más estudiada ha sido la médula ósea en cuanto se reconoció que en su estroma se encontraban células stem mesénquimales capaces de diferenciarse y formar hueso y cartílago (9,10), aunque es una fuente importante de obtención; el 0.003% de las células mononucleares de médula ósea humana son hMSCs según Beyer *et al* 2006 (8), otros autores reportan que el 0.001 y el 0.01% de las células mononucleares son hMSCs, esto puede variar entre pacientes dependiendo de su edad (9,10). Existen algunos aspectos que dificultan su uso tales como: limitada tasa de crecimiento, la capacidad de diferenciación de acuerdo a la edad del donante de la médula y el riesgo en la toma de muestra, adicionalmente el volumen del aspirado de la medula debe ser de 150ml o superior y la técnica puede influenciar en el número de células aisladas (8), no obstante se destaca que las células stem obtenidas de la medula ósea mantiene su potencial de osteodiferenciación en individuos mayores y que en las condiciones apropiadas *in vitro* (Medios de cultivo suplementado con factores de crecimiento) pueden mantener su potencial de diferenciación (82–84).

Las células stem mesénquimales a partir de tejido adiposo, descubiertas más recientemente (11) parecen tener un buen potencial de diferenciación a osteoblastos, condrocitos, adipocitos y a células epiteliales. Los volúmenes de los lipoaspirados pueden ir desde 100ml hasta varios litros y contener una frecuencia relativamente alta de células stem mesénquimales (1 al 5%). El potencial de diferenciación depende del manejo de cultivo y de los sitios de obtención de la muestra (abdomen, brazos, glúteos). Algunos estudios han reportado una expresión positiva del marcador hematopoyético CD34 en células adherentes de cultivos primarios, poniendo en manifiesto la expresión de un marcador no mesénquimal (12,13).

Sobre la obtención de las células stem mesénquimales a partir de sangre de cordón umbilical, se afirma que es un procedimiento que requiere optimizar puntos críticos para lograr un cultivo exitoso, tales como el tiempo de recolección y procesamiento que debe ser inferior a 16 horas, así como el volumen de sangre recolectado igual o superior a 30ml (14).

Entre las fuentes de obtención de células stem mesénquimas de origen dental encontramos células stem de pulpa dental humana (hDPSCs), estas resultan ser

altamente proliferativas, clonogénicas capaces de diferenciarse en células parecidas a los odontoblastos y formadoras del complejo dentino pulpar (15,16). Las hDPSCs se encuentran distribuidas a lo largo de una zona rica en distintos tipos celulares, frecuentemente ocupando la zona perivascular de este tejido, la pulpa cameral y radicular. Su morfología es similar a la de los fibroblastos y luego de recibir el estímulo apropiado las hDPSCs pueden tener diferenciación terminal en fibroblastos, osteoblastos y odontoblastos. Existen estudios en los cuales se afirma que en los tejidos pulpares viejos el número de hDPSCs puede decrecer, lo que conlleva a una disminución del potencial de regeneración de la pulpa dental humana, sin embargo, estas células tienen un alto potencial para regeneración de tejido óseo (15–17).

Se han aislado células stem mesenquimales de dientes deciduos en exfoliación (SHEDs) y se notó que pueden inducir la formación de hueso y dentina *in vivo* (85). Se comprobó además que estas subpoblaciones celulares tenían la capacidad de diferenciación en células neuronales, adipocitos, osteoblastos y células semejantes a los odontoblastos, productoras de dentina (86–88).

Las células stem de ligamento periodontal se aislaron por primera vez en el 2004 y se ha demostrado que dan lugar a colonias clonogénicas adherentes que semejan a los fibroblastos siendo capaces de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y cementoblastos *in vitro* (89), además de producir tejidos como el cemento, ligamento periodontal y hueso *in vivo* (90). Estudios recientes han demostrado su habilidad para diferenciarse en precursores neuronales (89–91). Las células stem del ligamento periodontal también expresan marcadores de cementoblastos y osteoblastos, así como también antígenos STRO-1 y CD146, que se encuentran en hDPSCs (91,92). Esto indica que las células stem del ligamento periodontal tienen propiedades similares a las células stem de la pulpa dental y medula ósea.

En el 2006, se aislaron y caracterizaron las células stem de la papila apical de dientes humanos (93,94), estas células forman colonias clonogénicas adherentes y de forma similar a otras poblaciones de células stem mesenquimales, son capaces de diferenciarse en adipocitos y odontoblastos / osteoblastos *in vitro*. Las células stem de la papila apical extraídas de terceros molares han demostrado dar lugar a tejido dentinal en

ratones inmunosuprimidos, y de generar un complejo radicular/periodontal capaz de soportar las coronas cerámicas después de trasplantar células stem de ligamento periodontal en cerdos (93,95). Todo esto demuestra que las células stem de origen dental son una alternativa promisoría en la regeneración tisular ósea, mediante matrices extracelulares y factores de crecimiento adecuados para este objetivo.

2.5 Factores de crecimiento implicados en la formación de tejido óseo

Los factores de crecimiento son proteínas extracelulares, que se unen a los receptores y regulan la actividad celular. Muchos factores de crecimiento participan durante el desarrollo y reparación de los tejidos dentales, sin embargo, algunos factores son claves para la proliferación de células stem y mineralización de tejidos.

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) aparentemente juegan un rol principal en la estimulación de la regeneración, además son usadas para promover la mineralización del tejido formado, las BMPs están estructuralmente relacionadas con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y fueron originalmente identificadas por su capacidad de inducir la formación de hueso ectópico en roedores (48,96,97) Miembros de la familia de las BMPs tienen diversas funciones biológicas durante el desarrollo embrionario incluyendo un rol fundamental en la osteogénesis. Entre los miembros de las familias de las BMPs tenemos las BMPs2, que han sido ampliamente estudiadas por sus funciones biológicas: condrogénicas y de diferenciación osteogénica (48,96). El factor de crecimiento derivado del hueso (BDGF) y el factor de crecimiento del esqueleto humano (hSGF) junto con la osteogenina, contribuyen no solo a la producción celular ósea, sino que además ejercen acciones sobre la síntesis colágena y sobre otras proteínas óseas (96,98). La implementación de factores de crecimiento debe tener una concentración adecuada para regular la actividad celular, si se encuentra elevada puede tener el efecto opuesto generando apoptosis de las células stem mesenquimales (34,48,96).

De este modo, en la ingeniería de tejidos para regular el comportamiento de las células, se deben considerar dos aspectos: 1) Las señales físicas que se manifiestan de acuerdo

a la rigidez de la matriz extracelular tridimensional fabricada y a las características topográficas (56,99,100). 2) Las señales bioquímicas mediada por los factores de crecimiento(citoquinas) (101,102). Los factores de crecimiento pueden presentarse de forma soluble en el medio o pueden estar ligados a la matriz extracelular tridimensional fabricada o *scaffold*. Por ejemplo las BMP's juegan una función crucial en la formación de células óseas, se cree que estas son secuestradas al interior de la matriz extracelular, puesto que en la porción orgánica de la matriz extracelular; compuesta principalmente de colágeno existen interacciones sitio específicas con BMP's. Por lo tanto las BMP's son presentadas a las células en forma de unión a la matriz extracelular (43,103,104). La comprensión y manipulación racional de estos efectos debe ser incorporada en los diseños de los biomateriales que van a mimetizar la matriz extracelular, a fin de lograr el control deseado sobre los andamios artificiales 3D para el crecimiento de las células stem y su diferenciación.

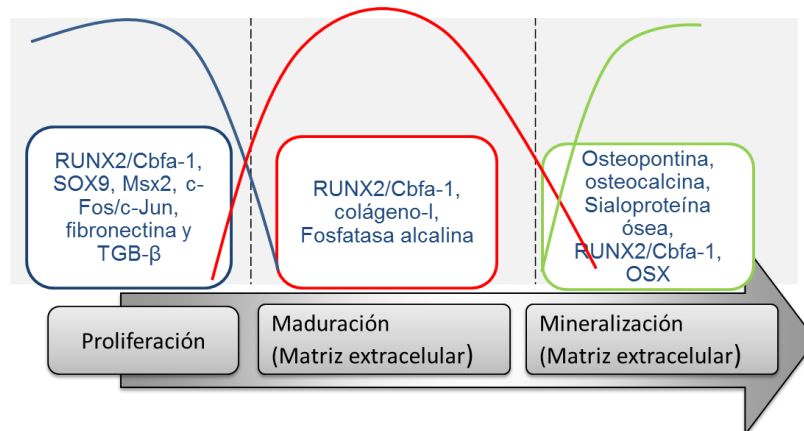
2.5.1 Diferenciación osteogénica de células stem mesénquimales *in vitro*

La diferenciación osteogénica comprende una serie de diferentes etapas, correspondientes a estadios intermedios de diferenciación del linaje osteoblástico, para culminar finalmente con osteoblastos maduros y funcionales denominados osteocitos (48,105). Es posible reconstruir este modelo de diferenciación osteogénica *In vitro*, cultivando las hMSCs bajo el estímulo de factores osteoinductores presentes en el medio de cultivo. En estos modelos, se observan cambios tanto a nivel celular como molecular representativos en la diferenciación progresiva hacia células osteoblásticas maduras, obteniéndose al cabo de 14 días una matriz extracelular mineralizada, aceptada como el marcador fenotípico terminal de una vía de diferenciación osteogénica.

Se han encontrado diferentes factores proteicos y esteroidales que contribuyen a dicha diferenciación osteoblástica, entre ellos se encuentran glucocorticoides y algunos miembros de la familia de factores de crecimiento transformante β (TGF- β), como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (35,105). En la primera etapa de la diferenciación se da la proliferación de células indiferenciadas; esta se caracteriza por el elevada expresión de: 1) Genes c-myc y c-fos, factor de transcripción SOX9, 2) Proteínas tipo histonas y ciclinas, 3) Componentes de la matriz extracelular como fibronectina y, 4)

Componentes asociados a la regulación de la biosíntesis de la matriz extracelular (TGB- β). De forma paralela los genes que se encuentran implicados en la funcionalidad del fenotipo osteoblástico se encuentran suprimidos (106). Posterior a la proliferación se observa un aumento en la síntesis de proteínas asociadas a la organización y maduración de la matriz extracelular, entre las cuales se observa colágeno tipo I y fosfatasa alcalina (figura 2-1). Una vez sintetizada la matriz, esta debe ser mineralizada, esta tercera etapa se encuentra caracterizada por la expresión del factores de transcripción como osterix (OSX) que se ve involucrado en la vía de señalización para la expresión de proteínas involucradas en la deposición del mineral óseo entre las que se encuentra involucradas osteopontina, osteocalcina, sialoproteína ósea (97,107,108).

Figura 2-1. Etapas de la diferenciación osteogénica: Esquema representativo de las etapas de proliferación, maduración y mineralización de la matriz extracelular junto con los marcadores asociados en cada etapa.



En la diferenciación osteogénica de MSCs *in vitro*, las células deben ser estimuladas con glucocorticoides como dexametasona y otros suplementos como β -glicerofosfato y ácido ascórbico para que estas sean capaces de formar depósitos de calcio y expresar fosfatasa alcalina.

- La dexametasona: Es un glucocorticoide sintético, con propiedades inmunosupresoras, antiinflamatorias y reguladoras de calcio sanguíneo que además en condiciones fisiológicas (10nM) promueve la diferenciación osteogénica *in vitro* mediante la vía MPK-1 (Proteína quinasas activadas por mitógenos-1). La dexametasona tiene la capacidad de regular la fosforilación de

un residuo de serina de RUNX2 (ser 125), que tiene una función reguladora en la transcripción. Como se ha mencionado, RUNX2 dirige la diferenciación osteogénica uniéndose al elemento de respuesta cis-2 (OSE2), este complejo proteico se une a la región promotora de los genes blanco regulando la expresión y activación de genes como osteocalcina, sialoproteína ósea y aumenta la actividad fosfatasa alcalina generando de este modo la diferenciación osteoblástica (figura 2) (109,110).

- El β glicerofosfato: este fosfato orgánico en el medio de cultivo promueve la formación de depósitos minerales mediante la formación de calcio. Este es un sustrato de la fosfatasa alcalina, en cuya reacción enzimática induce un incremento de fosfatos inorgánicos en el medio (111).

Una vez es sintetizada la fosfatasa alcalina que se encuentra en forma de vesículas acopladas a fosfatidilinositol, toman el β glicerofosfato y lo hidrolizan, obteniendo de ello fosfatos inorgánicos, los cuales serán convertidos en hidroxiapatita, de este modo se inicia la mineralización (111).

- Ácido ascórbico: Este es otro suplemento esencial para la formación de matriz extracelular. La parte orgánica de la matriz extracelular está compuesta por fibras de colágeno, este colágeno se sintetiza a partir de hidroxilaciones de residuos de serina y prolina en el retículo endoplásmico de la célula, de este proceso depende la formación de la triple hélice de las fibras de colágeno que permiten mantener la estructura del tejido. Las enzimas hidroxilasas, que catalizan esta hidroxilación requieren de ácido ascórbico para que funcionen, por lo que sin ácido ascórbico, no se podría sintetizar la matriz extracelular secretada por las células (112).

De este modo las células stem mesénquimales (hMSCs) son capaces de diferenciarse a linaje osteoblástico *in vitro*, esto mediante las concentraciones apropiadas de cada uno de estos componentes en el medio de cultivo, si la dexametasona por ejemplo se encuentra en elevadas concentraciones genera efectos inhibitorios en la formación de hueso (109).

2.6 Comportamiento celular: Vista previa en la calidad de la interacción célula-biomaterial

El biomaterial sirve como soporte biomimético tridimensional de la matriz extracelular que es programado para proveer señales físicas y químicas a las células (26). Esto es un buen punto de partida para entender las diferentes facetas de las interacciones célula-material *in vitro*, no obstante debemos considerar que *in vivo* las células madre se encuentran en un complejo nano ambiente tridimensional, el cual envía señales controladas espaciales y temporales a las células para provocar respuestas específicas. Además, la interacción entre diferentes células influye en el comportamiento celular (43–46). La comprensión y manipulación racional de estas señales debe ser incorporada en los diseños de los biomateriales que van a mimetizar la matriz extracelular, a fin de lograr el control deseado sobre los andamios artificiales 3D para el crecimiento de las células stem y su diferenciación *in vitro* e *in vivo*.

Es un hecho que las células responden de forma diferente a la superficie de diferentes materiales, en esta perspectiva Caplan y Shah 2009 y otros autores (113–115), sugieren que la interpretación de la célula en respuesta al biomaterial refleja un paradigma central, que implica la activación de receptores de membrana, en el que la transducción de señales se da por cascadas de señalización ordenadas, capaces de alterar la expresión de genes específicos, dirigiendo de este modo el comportamiento celular. Más recientemente se ha sugerido que estas cascadas de señalización, son capaces de interpretar las características químicas y topográficas del material, incluso cuando estas variaciones ocurren a escalas manométricas (43,116). Partiendo de esto, se sugiere que la comprensión de los mecanismos de señalización intracelular que participan en la adhesión, proliferación y diferenciación de las células en la superficie y al interior del constructo es fundamental para la concepción de nuevos biomateriales.

La nueva generación de los biomateriales “inteligentes”, se desarrollará en base a la respuesta celular deseada, por lo que el resultado esperado puede ser inducido. El dominio de estos mecanismos celulares y moleculares en respuesta al biomaterial es de suma importancia, especialmente si se considera el escenario irreversible de la terapia celular (117).

Se ha encontrado que durante el proceso de adhesión de los osteoblastos en superficies de polímeros simples como polietileno, se da bajo una rigurosa alteración en la reorganización de los filamentos de actina que otorga a las células su morfología y la activación de las integrinas. Molecularmente se ha comprobado que la reorganización del citoesqueleto de la célula se da de una forma ordenada e involucra señales originadas desde diferentes direcciones y que implica proteínas clave como la cofilina, proteína de choque térmico 27 (HSP27), proteína quinasa activada por mitogenos (MAPK), fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A) (118). Esta diversidad de proteínas intracelulares involucradas en la reorganización del citoesqueleto en el momento de la adherencia de las células, incita a la creación de una plataforma de datos biológicos, potencialmente eficaces para guiar el análisis de nuevos materiales, basándose en un conjunto de biomarcadores proteicos. De hecho, la literatura actual muestra una tendencia en que el uso y el entendimiento de los mecanismos de transducción de señales intracelulares son un paso muy importante para la comprensión de la interacción célula-biomaterial, incluso empleando modelos matemáticos, herramientas de bioinformática y sistemas biológicos (34,118).

Décadas de esfuerzos de diferentes grupos de investigación han mostrado investigaciones con células stem en los que se da un importante cruce de caminos, donde la comprensión fundamental de la composición del nanoambiente de las células stem y sus señales está empezando a traducirse en el diseño de andamios biomiméticos sensibles que puedan regular con precisión las acciones de las células stem, dándose así una gran promesa y difíciles implicaciones en la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (43).

Aunque existe numerosas investigaciones que demuestran el efecto de las señales físicas dadas por la rigidez y la topografía y las señales químicas, dadas por los factores de crecimiento y ligandos bioactivos, influyen sobre el comportamiento celular; sobre la diferenciación, proliferación y adhesión, sin embargo, una gran cantidad de esta literatura se ha producido en condiciones de cultivo celular en 2D. La comprensión de estos fenómenos es fisiológicamente relevantes en cultivos 3D, para poder desarrollar andamios eficaces para las células stem.

Nosotros creemos que el futuro de las investigaciones con células stem se encuentra en este dominio, ya que se debe elucidar los mecanismos moleculares intracelulares relacionados con el nanoentorno de las células stem, para poder obtener un resultado inducido por la fabricación adecuada del andamio.

3. Aspectos metodológicos específicos

3.1 Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro* de carácter exploratorio.

3.2 Tamaño de muestra y diseño experimental

La unidad muestral corresponde a cada matriz extracelular tridimensional que tiene un promedio de 250.000 células stem mesenquimales dentales provenientes de las pulpas humanas obtenidas de pacientes sistémicamente sanos que asistieran a las Clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque. En este estudio se evaluó el comportamiento de las células stem mesenquimales en las matrices tridimensionales de PLGA y de PLGA/HA en tres (3) diferentes grupos:

- Grupo experimental: Corresponde a las matrices tridimensionales en las que se encuentran cultivadas las células stem dentales estimuladas con medio de diferenciación osteogénica. Está compuesto por el grupo de matriz de PLGA sola y de PLGA con HA. Por cada tiempo de estudio que corresponde a 7, 15 y 30 días los experimentos se realizaron por triplicados, para poder evaluar cada una de las variables de estudio.
- Grupo control positivo: Corresponde a las matrices tridimensionales en las que se encuentran cultivados osteoblastos con medio de crecimiento. Está compuesto por el grupo de matriz de PLGA sola y de PLGA con HA. Por cada tiempo de estudio (7, 15 y 30 días) los experimentos se realizaron por triplicado.
- Grupo control negativo: Corresponde a las matrices tridimensionales en las que se encuentran cultivadas células stem dentales sin medio de diferenciación

osteogénica, estas se mantendrán con medio de crecimiento. Está compuesto por el grupo de matriz de PLGA sola y de PLGA con HA. Por cada tiempo de estudio (7, 15 y 30 días) los experimentos de evaluación de las 3 variables dependientes, se realizaron por triplicado, por tanto para cada tiempo se obtuvieron 9 matrices, una por pozo; se emplearon 3 matrices para evaluar adhesión, 3 para evaluar proliferación y 3 para evaluar perfil de expresión de genes (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Diseño experimental: Grupos establecidos para la evaluación de las variables a través del tiempo con sus respectivos tipos de matrices extracelulares.

	GRUPO EXPERIMENTAL		GRUPO CONTROL NEGATIVO		GRUPO CONTROL POSITIVO	
	Cultivo DSCs con osteoinductores		Cultivo DSCs sin osteoinductores		Cultivo de osteoblastos	
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 1	GRUPO 2
	Matriz PLGA/HA	Matriz PLGA	Matriz PLGA/HA	Matriz PLGA	Matriz PLGA/HA	Matriz PLGA
Tiempo 1	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices
(7 días)						
Tiempo 2	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices
(15 días)						
Tiempo 3	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices	9 matrices
(30 días)						
3 matrices para evaluar adhesión 3 matrices para evaluar proliferación 3 matrices para evaluar diferenciación TOTAL: 9 matrices para cada tiempo y tipo de matriz. Por lo tanto 9 matrices por 18 subgrupos constituye un n=162						

3.3 Criterios de inclusión y exclusión

De pacientes para obtención de muestra:

Pacientes entre 14 y 22 años de edad, sistémicamente sanos, con indicación de exodoncia con fines ortodónticos de dientes sanos premolares, terceros molares, erupcionados, semierupcionados o incluidos.

Los criterios de exclusión de paciente fueron: Pacientes con enfermedades sistémicas, mayores de 22 años, dientes con enfermedad periodontal, caries o con compromisos pulpares.

De células para cultivo en las matrices tridimensionales:

El criterio de inclusión de cultivo, son las células que tengan expresión de marcadores CD105+, CD73+, CD90+, y una baja o nula expresión de los marcadores CD34-, CD45- además que expresen los genes SOX2, OCT4 y Nanog, genes responsables de mantener la pluripotencia de las células stem y que según lo reportado por Gronthos en el 2000, las células stem de pulpa dental tienen la capacidad de expresar (15).

El criterio de exclusión de cultivo, células que no sean capaces de expresar los marcadores CD90, CD105 y CD73 además de presentar una expresión positiva de los marcadores CD34 y CD45.

3.4 Variables a estudiar

Variables independientes:

- Matrices extracelulares
 - Matriz de PLGA
 - Matriz de PLGA/HA
- Tiempo de cultivo:
 - 7 días
 - 15 días
 - 30 días

Las Variables dependientes:

- Adhesión
- Proliferación
- Perfil de expresión de genes

Variable de bloqueo:

- Factores de osteoinducción (diferenciación osteogénica)

3.5 Análisis estadístico

El modelo estadístico que se empleó es Split Plot en bloque, también conocido como modelo en parcelas divididas. Este modelo estadístico se empleó para la variable continua de este estudio (proliferación), que permite hallar la relación de los factores implicados.

Para la evaluación de la variable de proliferación, el modelo fue el siguiente (Tabla 3-2).

Tabla 3-2. Modelo de parcelas divididas en bloque.

Grupos del estudio	BLOQUE 1			BLOQUE 2			BLOQUE 3		
	GRUP EXP	GRUP C +	GRUP C -	GRUP EXP	GRUP C +	GRUP C -	GRUP EXP	GRUP C +	GRUP C -
PLGA/HA	30	40	23	34	56	34	65	78	44
PLGA	35	45	34	56	43	76	77	55	44

En donde la parcela completa corresponde a cada bloque o replica, en este estudio el bloque corresponde a los 3 tiempos diferentes de la investigación (7, 15 y 30 días), por otra parte esta parcela completa está conformada por 3 tratamientos principales que corresponden a los 3 grupos que hacen parte del estudio; el grupo experimental, el grupo control positivo y el grupo control negativo. La subparcela está representada por los dos tipos de matrices; PLGA/HA y PLGA.

El factor A, correspondería por ejemplo a las parcelas completas y el factor B a las subparcelas, para lo cual se permite la correlación de factores AB. Donde se correlaciona el tipo de matriz con cada grupo del diseño experimental.

El modelo lineal del modelo de parcelas divididas sería:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \gamma_k + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \phi_{ijk}$$

Donde β_j , $(\tau\beta)_{ij}$, γ_k corresponden a los datos de las parcelas completas, $\gamma_k + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk}$ corresponde a los datos de las subparcelas y ϕ_{ijk} a el error de la parcela completa.

Para la variable diferenciación se empleó el modelo MANOVA en función del tiempo y el material empleando el software estadístico R, específicamente la función adonis de datos semi-paramétricos, esto con el propósito de evaluar las interacciones entre los genes evaluados con el tipo de biomaterial a través del tiempo.

4. Materiales y métodos

4.1 Caracterización de células stem mesenquimales de origen dental humano

4.1.1 Obtención de la muestra

La muestra se obtuvo de pacientes que asistieron a las Clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque, sistémicamente sanos, entre 14 y 22 años de edad que tuvieran premolares y terceros molares erupcionados sanos indicados para exodoncia con fines terapéuticos como la ortodoncia, esto se realizó con la previa autorización del paciente firmando el consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo A); la pulpa de los dientes obtenidos se extrajo realizando una odontosección a nivel de la unión amelo-cementaria con pieza de alta velocidad y una fresa Zekrya. La irrigación se realizó manualmente con una jeringa de 50 ml y de forma constante con solución salina para garantizar esterilidad en el proceso. Se retiró la pulpa dental de las dos porciones del diente y se lavó con solución salina durante 3 segundos, posteriormente se depositaron en la solución de transporte (Dulbecco's Modified Eagle's Media DMEM GIBCO bajo en glucosa suplementado con Penicilina 100U/ml /estreptomicina 100 µg /ml y anfotericina 2,5 µg/ml de Lonza). Luego, estas muestras se llevaron al laboratorio, en donde se trabajó en la cabina de flujo laminar bajo el protocolo de esterilidad estipulado por el laboratorio. Este protocolo fue estandarizado por el grupo Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) de la Universidad El Bosque, Línea de investigación de células troncales craneofaciales e ingeniería de tejidos.

Para este estudio, en la fase de caracterización celular se tomaron 2 pulpas de premolares inferiores de un paciente hombre de 18 años de edad, 2 pulpas de terceros

molares superiores de un paciente hombre de 21 años y 2 pulpas de premolares inferiores de un paciente hombre de 14 años de edad. Considerando los criterios de inclusión de cultivo celular tridimensional, se decidió emplear las células stem del paciente de 14 años de edad, estas fueron sembradas en los dos tipos de matrices tridimensionales extracelulares para realizar la evaluación del comportamiento celular en cada uno de los tiempos del estudio.

4.1.2 Aislamiento y expansión de hDPSCs

Para aislar las hDPSCs se digirió el tejido de forma enzimática; se tomó el tejido y se cortó en pequeños fragmentos, posteriormente se depositaron en 10 mg/ml de Colagenasa (SIGMA) y 5 mg/ml de Dispasa (SIGMA) en Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM, GIBCO, Invitrogen) durante 2 horas en incubadora por agitación constante en frasco agitador a 37°C, 5% CO₂ en atmosfera húmeda. Una vez digerido el tejido la acción enzimática fue inhibida adicionando medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB-Hyclon), posteriormente la muestra fue centrifugada a 1.500 rpm durante 4 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 1ml de medio completo de cultivo, después se evaluó la viabilidad celular por el método Azul Tripán en dilución 1/1 por microscopia invertida.

El aislamiento de las hDPSCs fue por cultivo; el tejido disgregado se sembró en cajas de cultivo T-25 con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM, GIBCO, Invitrogen) bajo en glucosa, suero fetal bovino Hyclon al 10%, solución penicilina 100U/ml /estreptomina 100 µg /ml y anfotericina 2,5 µg/ml al 1%. Las células aisladas fueron expandidas en cultivo por tripsinización y pasajes seriados. La morfología fue evaluada desde la primera semana de cultivo por microscopia invertida.

4.1.3 Inmunofenotipificación de las hDPSCs

Cuando el cultivo alcanzó el 90% de confluencia en el pasaje 5, las hDPSCs fueron lavadas con solución tamponada de fosfato (PBS), se agregó tripsina a una concentración de 0.25%, se centrifugó a 1.500g por 4 minutos y posteriormente las células fueron contadas en microscopio invertido con azul tripan dilución 1/1. Para el experimento se tomaron 4 tubos de microcentrifuga; 1) Contenía 2.5×10^5 células sin

marcar, 2) Corresponde al control de isotipos que contiene CD105 marcado con ficoeritrina (PE) conjugado con IgG1 y CD45 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) marcado con IgG2, 3) Contenía 2.5×10^5 células con los anticuerpos CD105 marcado con PE conjugado con IgG1, CD34 marcado con FITC conjugado con IgG2a , CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PERCP) conjugado con IgG2a y CD90 marcado con alofocianina (APC) conjugado con IgG1, 4) Contenía 2.5×10^5 células con los anticuerpos CD146 marcado con FITC conjugado con IgG1 y CD73 marcado con (PE) conjugado con IgG1. Todos fueron incubados durante 2 horas antes de ser leídos en el citómetro de flujo Guava Merck Millipore. Como control positivo se emplearon células stem de médula ósea donadas por el Grupo de Investigación de Fisiología celular y Molecular, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y células stem de tejido adiposo donadas por el Banco de Células Stem de Bogotá, Colombia, a las cuales también se les realizó citometría de flujo bajo este mismo protocolo.

4.1.4 Expresión génica de las hDPSCs

Se realizó reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para verificar si las células expresan los genes SOX2, Nanog y OCT4 y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real o cuantitativa (RT-qPCR) para verificar la expresión relativa de los genes SOX2, Nanog y OCT4, responsables de mantener la pluripotencia de las células stem, como gen control se empleó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el diseño de estos cebadores se realizó en el software Primer3, las secuencias fueron:

SOX2: Forward 5' GCTCGCAGACCTACATGAAC 3' Reverse 3' GCC TCGGACTTGACCACAG 5'.

OCT4: Forward 5' AGTTGGCGTGGAGACTTTGC 3' Reverse 3' CAGGGCTTTTCATGTCCTGG 5'

Nanog: Forward 5' TTGCTTACAAGGGTCTGCTACT 3' Reverse 3' ACTGGTAGAAGAATCAGGGCT 5'

GAPDH: GAPDH: Forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' Reverse 3'-GAAGATGGTGTGGGATTTTC-5'.

RT-PCR: En primera instancia se realizó la extracción del ARN de células stem de pulpa dental pasaje 5 con el kit *Quick-RNA™ Micro Prep de Zymo Research* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se tomó 1µg de RNA total y posteriormente se realizó la retrotranscripción con el kit *SuperScript™ III (Invitrogen®)* empleando la enzima retrotranscriptasa SuperScript™ RT siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante, una vez fue obtenido el cDNA se procedió a realizar la RT-PCR, los productos fueron electroforados y marcados con el agente intercalante *Sybr Safe (Invitrogen®)*, el gel de agarosa fue observado bajo luz ultravioleta y fotografiado.

La RT-qPCR: La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa a tiempo real o cuantitativa se realizó en el equipo CFX96, Bio-Rad Laboratories, utilizando SYBR Green como sistema de detección y el kit KAPA™ SYBR FAST One Step (Applied Biosystem). Para la cuantificación relativa de cada gen se tomó 500ng/µl de cDNA de células stem mesenquimales y de fibroblastos. Se realizaron triplicados para evaluar la expresión relativa de cada gen con sus respectivos controles. La cuantificación relativa de estos genes (Nanog, SOX2, OCT4) se calculó utilizando el método DDCT, el cual usa la fórmula aritmética 2^{-DDCT} en donde se emplearon como control células adultas ya diferenciadas (fibroblastos humanos) y de este modo determinar el número de veces que se expresa un gen sobre el control empleado. Los fibroblastos fueron donados por la línea de Investigación de Biología Molecular del grupo UIBO de la Universidad el Bosque, estos fueron cultivados en cajas de cultivo T-25 con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM, GIBCO, Invitrogen) bajo en glucosa, suero fetal bovino Hyclon al 10%, solución penicilina 100U/ml /estreptomicina 100 µg /ml y anfotericina 2,5 µg/ml al 1%, el cual fue cambiado 3 veces por semana y se emplearon como control una vez alcanzaron el pasaje 5.

4.1.5 Tiempo de doblaje poblacional

Se realizó el análisis de la proliferación celular mediante la fórmula tiempo de doblaje poblacional empleada por Siegel G *et al* 2013 (93) $PDT = (\text{tiempo de cultivo} * \ln 2) / (\ln \frac{\# \text{ células finales}}{\# \text{ de células Sembradas}})$, este ensayo se realizó en células hDPSCs en pasaje 5. Para este ensayo se emplearon 3×10^4 células stem de pulpa dental, cuyo número inicial de células sembradas por poso fue de 2.5×10^2 en caja de cultivo de 96

pozos y el indicador de óxido reducción empleado fue resazurina. La absorbancia fue leída en el lector TECAN Infinite® 200 Pro Series en 4 tiempos diferentes correspondientes al tiempo cero, 24 horas, 48 horas y 72 horas, por cada tiempo se hicieron tres mediciones diferentes o triplicados. Los resultados fueron corroborados empleando el software en línea *Doubling Time*. Los valores obtenidos fueron comparados con los reportados en la literatura de otras células stem mesenquimales.

4.1.6 Osteodiferenciación de hDPSCs en cultivo monocapa

Se empleó 1×10^6 células que fueron cultivadas en cajas de cultivo T-25 en medio de diferenciación osteogénico STEMPRO® *Osteocyte/Chondrocyte* bajo condiciones estándares de cultivo (atmosfera húmeda, 37°C y 5% de CO₂). Las células fueron estimuladas con este medio por un periodo de 15 días y el medio fue cambiado 3 veces por semana. Al finalizar este periodo de tiempo, se tripsinizó, se extrajo el RNA de las células osteodiferenciadas con el kit *Quick-RNA™ Micro Prep (Zymo Research®)* siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente la retrotranscripción se realizó con el kit *SuperScript™ III (Invitrogen®)* y finalmente se realizó RT-qPCR para realizar el cálculo de la expresión relativa de los genes RUNX2, Fosfatasa Alcalina (ALP), osteopontina (OP) y GAPDH mediante la técnica 2 delta-delta ct (2-DDCT). Para cuantificar los cambios de expresión (*fold change*) de estos genes fueron empleadas células hDPSCs osteodiferenciadas y como control células hDPSCs sin diferenciar. Los cebadores que se emplearon fueron los siguientes, diseñados en con el software Primer3.

RUNX2:	Forward	5'	CATCTAATGACACCACCAGGC-3'	Reverse	3'
			GCCTACAAAGGTGGGTTTGA5'		
ALP:	Forward	5'	TCAGAAGCTCAACACCAACG-3'	Reverse	3'-
			GTCAGGGACCTGGGCATT 5'		
OPN:	Forward	5'	TGAAACGAGTCAGCTGGATGACCA-3'	Reverse	3'-
			TGGCTGTGAAATTCATGGCTGTGG-5'		
GAPDH:	Forward	5'	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	Reverse	3'-
			GAAGATGGTGATGGGATTTTC-5'.		

4.2 Caracterización de las matrices extracelulares tridimensionales

4.2.1 Obtención y caracterización de la hidroxiapatita bovina

Para la obtención de la hidroxiapatita se tomó hueso bobino medular y se le realizó un proceso de limpieza y desinfección para retirar tejidos, material orgánico y microorganismos. Posteriormente, el hueso fue recortado y lavado con abundante agua caliente para la extracción de la medula ósea, para retirar grasas y proteínas los trozos de hueso se dejaron sumergidos en ácido clorhídrico por un periodo de 2h. Luego los trozos del hueso fueron sometidos al proceso de sinterización empleando un horno de mufla de Thermoline™ series, donde la rampa de calentamiento alcanzó una temperatura máxima de 800°C para evaporar por completo la materia orgánica (Figura 4-1), protocolo reportado por López et al 2003 (119). La hidroxiapatita obtenida fue molida y tamizada a un tamaño de 20 a 106 μm , tamaño ideal reportado para uso en matrices extracelulares tridimensionales en ingeniería de tejidos ósea (64,120,121). Posteriormente se llevó a microscopia electrónica de barrido (MEB) empleando el microscopio JEOL, modelo JSM 6490-LV de última generación con detector de espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDX) con el cual se realizó análisis químico cualitativo para evaluar la pureza del material.

Con el objetivo de confirmar la identidad y estructura química del material obtenido por sinterización, se realizó difracción de rayos X con el equipo Panalytical X'Pert PRO MPD de la Universidad Nacional sede Bogotá con los siguientes parámetros: rango de medición entre 2 y 90° (2 θ), tamaño de paso 0.02° (2 θ), tiempo por paso 0.4 segundos, radiación CuK α 1 ($\lambda=1.5406$ Å), detector LynxEye. El difractograma obtenido de la muestra fue comparado con los patrones de la base de datos *Power Diffraction File* (PDF-2) del *International Centre for Diffraction Data* (ICDD) empleando el software *HighScore Plus*.

Figura 4-1. Hidroxiapatita bovina obtenida por proceso de sinterización, antes de ser molida



4.2.2 Síntesis de las matrices tridimensionales: PLGA/HA y PLGA

Para la síntesis de las matrices tridimensionales se empleó el método de congelado/liofilizado (68), donde se tomó 0.73g de poli (ácido láctico-co-glicólico (PLGA)) de Sigma-Aldrich® 50:50 peso Mw de 24.000 a 38.000, viscosidad de 0.32 a 0.44 dL/g, 01% en cloroformo cuya velocidad de degradación es menor de 3 meses y se mezcló con la hidroxiapatita (HA) bobina obtenida en una proporción de 1:3, considerando la composición histológica del hueso y según lo reportado por Raman 2005 y Saito *et al* 2010 (68,122). Una vez mezclados los dos componentes en un tubo de centrifuga de 50ml se agregó 8ml de cloroformo grado molecular, esta mezcla se dejó por un periodo de 24h para garantizar la completa disolución del polímero. Posteriormente la mezcla fue trasferida a un recipiente de vidrio y se mezcló con un agitador magnético durante 5min, durante este proceso se fue agregando 2ml de agua por goteo. La mezcla obtenida fue trasferida a moldes plásticos y fue congelada por un tiempo de 4h, posteriormente fue liofilizada a -60° en el liofilizador Heto PowerDry LL 1500 (Thermo) de 24-48h para asegurar la completa evaporación del solvente. Las muestras fueron cortadas con hoja de bisturí, la forma de las muestras es circunferencial con diámetro de 8mm x 2mm de alto. Estas fueron esterilizadas con rayos UV durante 2h, posteriormente fueron almacenadas hasta su uso (Figura 4-2). Para la síntesis de la matriz de solo PLGA 50:50 peso Mw de 24.000 a 38.000, viscosidad de 0.32 a 0.44 dL/g se siguió el mismo protocolo de congelado/liofilizado reportado por Raman 2005, se empleó este copolímero con el objetivo de controlar la velocidad de degradación y por mantener sus propiedades mecánicas después de ser implantado en el sitio de la lesión *in vivo* (68), con la diferencia que no se agregó la hidroxiapatita. Posteriormente se llevaron a microscopia electrónica de barrido (MEB) para evaluar la morfología de las matrices y la distribución de la fase cerámica sobre la polimérica, para lo que se realizó un análisis con imágenes considerando diferentes campos de la muestra y se le realizó un análisis químico por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) para confirmar la composición química de cada una de las matrices. Para calcular el área o tamaño de los poros de las matrices se empleó el software *ImageJ*; para esto se realizó un ajuste de contraste, se

cuadró el umbral de escala de grises, la imagen se convirtió en binaria y de este modo se calculó el tamaño de los poros.

Figura 4-2. Matriz tridimensional de PLGA y PLGA/HA después de liofilizar.



4.3 Estudio piloto: Diferenciación osteogénica de hDPSCs en matrices tridimensionales de PLGA/HA

En la ingeniería de tejidos ósea los biocompuestos se fabrican principalmente de polímeros en combinación con cerámicas, lo que ha demostrado tener mejoras en la capacidad de compresión de cargas, mayor bioactividad y una mejor interacción entre huésped e implante (34,64,65,123,124). Además, el uso de hidroxiapatita natural proporciona osteoinductividad, por su excelente bioactividad y contribución a la promoción celular (65).

La síntesis de matrices tridimensionales compuestas de PLGA/HA potencian las propiedades de sus componentes en cuanto a las propiedades mecánicas y osteoconductoras, además la presencia de la hidroxiapatita ejerce una acción amortiguadora sobre los productos finales de la degradación de los ácidos poliláctico y glicólico ya que los neutraliza, mejorando de este modo la biocompatibilidad del polímero(65).

En este estudio, se encontró que en cultivo monocapa de las hDPSCs, estimuladas con medio de diferenciación osteogénica durante un periodo de 15 días expresaron el gen RUNX2, gen que se expresa cuando las células indiferenciadas se comprometen a linaje

osteoblástico, es decir, que en cultivo monocapa al cabo de 15 días aun no son osteoblastos maduros (hallazgos que se describen en resultados; capítulo 5). El objetivo de este estudio piloto fue analizar si al cabo de 7 días de cultivo tridimensional las células hDPSCs se diferenciaban a osteoblastos humanos, considerando la relevancia de evaluar este tiempo (7 días) en la fase del estudio del comportamiento celular, pues se consideró pertinente no evaluarlo. Sin embargo según lo reportado en la literatura científica, las propiedades de un constructo tridimensional afecta directamente el comportamiento celular, por lo tanto las hDPSCs fueron sembradas en matrices de PLGA/HA y estimuladas con medio de diferenciación osteogénica y se evaluó la diferenciación celular mediante RT-qPCR para verificar la expresión relativa de genes de linaje osteoblástico.

4.3.2 Cultivo de las hDPSCs en las matrices de PLGA/HA

Se tomaron hDPSCs previamente caracterizadas y sembradas en matrices de PLGA/HA. Para este estudio piloto se sembró 250.000 células por matriz. El total de matrices empleadas fueron 6; 3 de estas fueron estimuladas con el medio de diferenciación osteogénica STEMPRO® Osteocyte/Chondrocyte bajo condiciones estándares de cultivo (atmosfera húmeda, 37°C y 5% de CO₂) y las otras 3 matrices corresponde a los controles del experimento, las cuales se encontraban en medio estándar de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM, GIBCO, Invitrogen) bajo en glucosa, suero fetal bovino al 10%, solución estreptomycin/penicilina/anfotericina al 1%.

Para el cultivo celular en las matrices se empleó una caja de 24 pozos, se agregó 1ml de medio de diferenciación osteogénica a las 3 matrices experimentales y 1ml de medio estándar de cultivo a las 3 matrices control. El medio fue cambiado 3 veces durante estos 7 días y se mantuvo en agitación constante. Posteriormente se realizó el análisis de expresión génica y se evaluó la morfología y la adhesión celular.

4.3.2.1 Expresión génica de las hDPSCs osteodiferenciadas

Una vez terminado el periodo de cultivo correspondiente a 7 días, se procedió a realizar la extracción del RNA de las células osteodiferenciadas y sin diferenciar con trizol: Se tomó cada una de las matrices y se depositaron en un tubo de microcentrífuga por

separado, se agregó 500ml de trizol por 5min y se homogenizó la mezcla, posteriormente se centrifugó por 3min a 600g. Para la extracción del RNA se agregó a esta mezcla 100µl de cloroformo grado molecular, se mezcló y se dejó incubar en hielo por 10min, luego se centrifugó a 12.000g por 15min a 4°. Se tomó la fase acusa y se continuó el proceso de extracción con el kit *Quick-RNA™ Micro Prep de Zymo Research®* siguiendo las indicaciones del fabricante, una vez obtenido el RNA se realizó la retrotranscripción con el kit *SuperScript™ III (Invitrogen®)*. La RT-qPCR se realizó en el equipo CFX96, Bio-Rad Laboratories, utilizando SYBR Green como sistema de detección y el kit *KAPA™ SYBR FAST One Step (Applied Biosystem)*. Para la cuantificación relativa de los genes Col I, ALP, RUNX2, OPN y GAPDH se calculó con el método DDCT, el cual usa la fórmula aritmética 2- DDCT.

4.3.2.2 Morfología y adhesión de las hDPSCs osteodiferenciadas en PLGA/HA

La evaluación morfología de las células y adhesión se realizó microscopia electrónica de barrido (MEB), para esto, la matriz fue fijada con glutaraldehído al 2.5% tamponado con fosfato salino (PBS) 0.1M con pH de 7.4, este se dejó por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS por 10min y se deshidrato en series crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 95% y 100%) durante 10min en cada concentración. En el último cambio de etanol se llevó a secado a punto crítico que se realizó por 1h, luego se recubrió con oro y se visualizó en MEB para corroborar la adhesión de las células en el constructo 3D.

4.4 Evaluación del comportamiento de las hDPSCs en matrices tridimensionales de PLGA y de PLGA/HA

Para evaluar el comportamiento de las hDSCs, estas fueron cultivadas en dos tipos de matrices extracelulares tridimensionales (PLGA y PLGA/ HA), los cultivos se realizaron por triplicado (tabla 3). El grupo experimental corresponde a las matrices con hDPSCs con medio basal de diferenciación osteogénica *STEMPRO® Osteocyte/Chondrocyte* y suplementos osteogénicos *STEMPRO®*. Los grupos control corresponden a las matrices con las hDPSCs y osteoblastos sin los osteoinductores. Ambos grupos se cultivaron a

una densidad de 2.5×10^5 células y fueron mantenidos en incubadora a 37°C y 5% de CO_2 durante 7, 15 y 30 días, el medio fue cambiado tres veces por semana.

Las variables analizadas fueron: Adhesión celular, proliferación celular, y perfil de expresión de genes de las hDPSCs y de osteoblastos empleados como control positivo.

4.4.1 Adhesión celular

La adhesión celular se evaluó empleó el protocolo modificado de Vohra *et al* 2008 (125), en el cual se siembra las hDPSCs en los tipos de matrices en concentraciones de 2.5×10^5 , en una placa de 24 pozos y se someten a adhesión en los diferentes tiempos establecidos en el protocolo mediante lavado con solución salina tamponada de fosfato (PBS), las células que permanecieron adheridas a la matriz fueron microfotografiadas por microscopia electrónica de barrido MEB.

4.4.2 Determinación de proliferación celular

La proliferación celular fue determinada mediante el ensayo con resazurina, el cual se basa de una reacción redox que ocurre en la mitocondria de las células; el producto coloreado es transportado fuera de la célula y se puede medir espectrofotométricamente. Para esto se sembraron 5×10^3 hDPSCs en cada uno de los constructos de PLGA y de PLGA/HA. La medición se realizó en el lector de absorbancia Infinite® 200 Pro-Tecan en los tiempos de 1, 7, 15 y 30 días. En cada tiempo de medición se realizaron triplicados por tipo de constructo y por tipo de medio de cultivo, pues se evaluó si existían cambios en la proliferación de las células sembradas en los constructos durante la estimulación con el medio de diferenciación osteogénica y sin estimulación osteogénica.

En una caja de cultivo de 24 pozos; por pozo se tenía un constructo cargado con las células inmersos en medio DMEM bajo en glucosa sin FBS a una concentración de 10% de resazurina. El periodo de incubación fue por 4 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Culminado el tiempo de incubación los constructos fueron retirados de los pozos y se procedió a la medición de la absorbancia a longitud de onda de 540 a 600nm. El número de células viables se correlacionó con la magnitud de la reducción del colorante (24).

4.4.3 Perfil de expresión génica

Para determinar la expresión de genes específicos de osteogénesis del grupo experimental, se realizó RT-qPCR, en donde se empleó 1µg de ARN para sintetizar la primera cadena de cDNA por transcriptasa inversa. Los genes evaluados fueron Osteopontina (OPN), Colágeno tipo I (COL I), Fosfatasa alcalina (ALP), RUNX2, y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se emplea como control para normalizar las mediciones de los otros productos. La RT-qPCR se realizó en el equipo CFX96, Bio-Rad Laboratories, utilizando SYBR Green como sistema de detección y el kit KAPA™ SYBR FAST One Step (Applied Biosystem). La cuantificación relativa de estos genes (RUNX2, ALP, OPN, COL I y GAPDH) se calculó utilizando el método DDCT, el cual usa la fórmula aritmética 2^{-DDCT}.

Los cebadores que se emplearon son los siguientes, diseñados en con el software Primer3.

RUNX2:	Forward	5'	CATCTAATGACACCACCAGGC-3'	Reverse	3'
			GCCTACAAAGGTGGGTTTGA5'		
ALP:	Forward	5'	TCAGAAGCTCAACACCAACG-3'	Reverse	3'-
			GTCAGGGACCTGGGCATT 5'		
COL I:	Forward	5'	TGACCTCAAGATGTGCCACT-3'	Reverse	3'-
			ACCAGACATGCCTCTTGTCC-5'		
OPN:	Forward	5'	TGAAACGAGTCAGCTGGATGACCA-3'	Reverse	3'-
			TGGCTGTGAAATTCATGGCTGTGG-5'		
GAPDH:	Forward	5'	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	Reverse	3'-
			GAAGATGGTGATGGGATTTTC-5'.		

Una vez obtenidos los datos de cambios de expresión (*fold change*) de cada uno de los genes mediante el modelo 2-DDCT, se emplearon para hacer un mapa de calor mediante el software *MultiExperiment Viewer*, con el objetivo de hacer una agrupación jerárquica de los datos en clusters, que es una forma de disponer los elementos en una jerarquía según la distancia o la similitud entre ellos establecida mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

4.5 Estudio piloto: Comportamiento *in vivo* de células stem de origen dental humano en matrices de PLGA/HA

El estudio de los constructos tridimensionales que mimetizan la matriz extracelular puede ser disertado desde dos aspectos relacionados entre sí. En primer lugar, existen estudios que han tratado de comprender los mecanismos de adhesión, proliferación, migración y diferenciación de las células en estos constructos tridimensionales *in vitro* (20–24); estas y otras multitudinarias respuestas celulares se rigen por señales físicas y químicas del entorno, mecanismos que actualmente son poco conocidos. Comprender estas interacciones puede tener profundas implicaciones en el eventual control y programación de diversas funciones celulares. Esto nos lleva al segundo aspecto; correspondiente al resultado del comportamiento de las células sembradas en los constructos tridimensionales de biomateriales una vez implantadas en el sitio de la lesión del paciente (25). El control en la diferenciación de las células stem a linajes celulares específicos es vital en la regeneración de cualquier tipo de tejido; en el tejido óseo debe formarse vasos sanguíneos para que se dé el aporte de nutrientes a las células diferenciadas, al tejido regenerado que debe integrarse con el tejido adyacente del sitio de la lesión y finalmente haya una regeneración de la herida. Estos dos aspectos pueden ser un buen punto de partida para entender las diferentes facetas de las interacciones célula-material, no obstante debemos considerar que *in vivo* las células stem se encuentran en un complejo nano ambiente tridimensional, el cual envía señales controladas espaciales y temporales a las células para provocar respuestas específicas. Por esto, el objetivo de este estudio piloto fue evaluar la capacidad de regeneración ósea *in vivo* de las hDPSCs sembradas en constructos 3D de PLGA/HA en el modelo animal de conejos Nueva Zelanda sobre lesiones óseas mandibulares. La capacidad de regeneración del tejido óseo se evaluó a nivel clínico e histológico después de 30 días de implantarse los constructos en las respectivas lesiones mandibulares del modelo animal.

4.5.1 Modelo experimental *in vivo*

4.5.1.1 Preparación pre-quirúrgica

La muestra total para este estudio, corresponde a 8 conejos Nueva Zelanda machos de 3 meses de edad, con un peso aproximado de 3-4 Kg. Se marcaron los animales con un collar de nylon y un tatuaje temporal en la oreja izquierda de cada uno con su respectivo dije marcado con un número para la identificación, este procedimiento se llevó a cabo en el bioterio de la Universidad De Ciencias Aplicadas (UDCA) de la ciudad de Bogotá

La aplicación de la anestesia se realizó combinando diferentes medicamentos: Ketamina Hidroclorada 35mg/Kg/día y Xylazina (2.0%) 0.1mg/Kg. Además, se realizó traqueotomía preventiva asegurando la total permeabilidad de las vías aéreas. Lo cual dio como resultado una excelente anestesia y completa relajación del animal. El efecto anestésico duró de 45 a 60 minutos por conejo. Además se realizaron enjuagues con clorhexidina al 0.2% para tener una acción antimicrobiana en la zona.

4.5.1.2 Modelo de lesión maxilofacial ósea

Se realizó herida ósea cortico medular mandibular bilateral quirúrgicamente en los 8 conejos de raza Nueva Zelanda con previa asepsia y antisepsia del campo operatorio. Se realizó incisión en el reborde basal izquierdo y derecho, disección hasta exponer el hueso basal de la región del cuerpo mandibular derecha e izquierda. Posteriormente, se utilizó un elemento rotatorio (EX 203 Set NSK®) para crear un defecto circular de 0.8 cm de diámetro en el cuerpo mandibular derecho e izquierdo. Después del procedimiento quirúrgico, a los conejos se les aplicó 2 intervenciones de tratamiento: Lado 1) recibió una matriz de HA/PLGA cargado *in vitro* con células stem dentales humanas; Lado 2) control: Matriz de HA/PLGA sin células. Los animales fueron sacrificados a los 30 días y el porcentaje de neoformación ósea se determinó midiendo y observando las características de neo formación del tamaño de la herida mediante análisis clínico e histológico.

4.5.2 Análisis clínico

Los animales fueron sacrificados bajo sedación, posterior a anestesia general e inyección de Euthanex® (Dosis 1ml/Kg), para asegurarse el no sufrimiento y sensación de dolor del animal. Posterior a esto se elevó la región geniana y se realizó incisión en línea media, para iniciar disección de planos anatómicos y desarticulación de la mandíbula. Se retiraron todos los tejidos blandos y se depositaron en Formol al 10% en recipientes debidamente diligenciados según código de registro. Una vez obtenidos los especímenes, estos fueron fotografiados.

4.5.3 Análisis Histológico

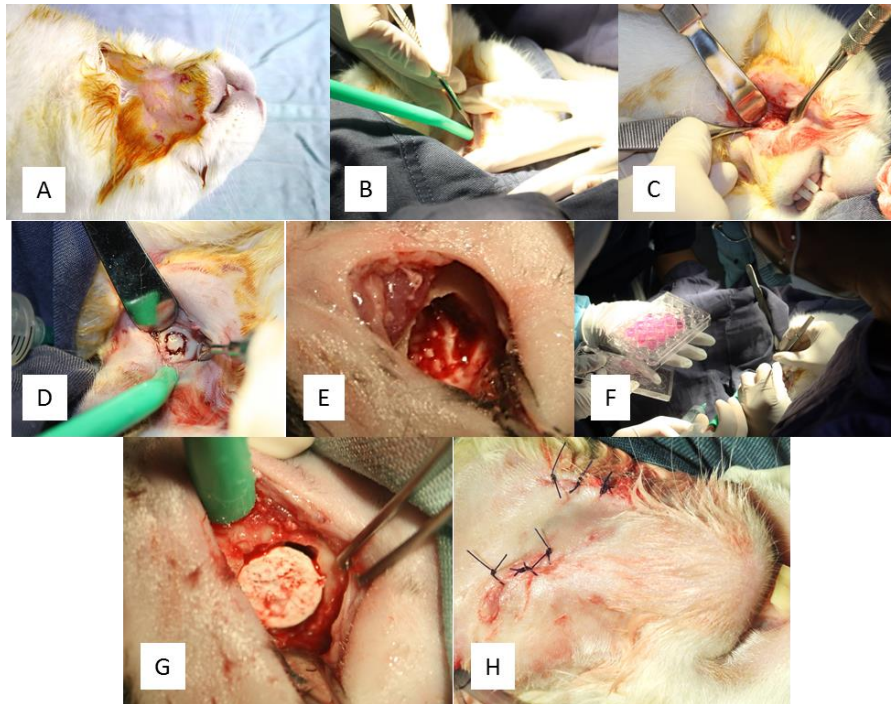
Se realizaron cortes histológicos (50- μ m) de las zonas de regeneración después de 30 días de implantación del xenoinjerto y previo sacrificio del animal. Los especímenes fueron descalcificados en ácido fórmico al 10% por una semana. Posteriormente fueron seccionados en cortes sagitales y teñidas con hematoxilina-eosina (H&E). Los análisis de rutina con Hematoxilina-eosina se realizaron con microscopía óptica y software de análisis de imágenes.

Se observó 3 campos aleatorizados por cada lamina la presencia en cantidad y calidad de; osteoblastos, osteoclastos, vasos sanguíneos, hueso cancelar, hueso laminar e infiltrado inflamatorio, estos campos fueron evaluados por diferentes patólogos calibrados para dichos conteos y evaluación de calidad de las variables mencionadas.

4.5.4 Hallazgos y evolución clínica postoperatoria de los conejos Nueva Zelanda

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo protocolo quirúrgico descrito, sin complicaciones ni accidentes durante y después del procedimiento (Figura 4-3), controlando todos los signos vitales de cada animal, siendo diligenciados por el Médico Veterinario durante la cirugía con las respectivas historias clínicas. Posteriormente se mantuvieron 24 horas en sala de recuperación los 8 conejos bajo manejo analgésico y antibiótico bajo supervisión del Médico Veterinario.

Figura 4-3. Procedimiento quirúrgico conejos Nueva Zelanda. (A) Asepsia y antisepsia. (B) Incisión bilateral de espesor total en cuerpo mandibular siguiendo referentes anatómicos. (C) Disección roma por planos hasta exponer cuerpo mandibular. (D-E) Osteotomía de 0.8cm³ bilateral con fresa 702. (G) Apósito de la matriz de HA/PLGA y HA/PLGA + hDPSCs. (H) Sutura por planos con Seda 4-0.



A las 48 horas los animales fueron trasladados a sus jaulas respectivas marcadas con el código único de cada animal. Los animales todos reaccionaron de manera positiva al anestésico general y al procedimiento quirúrgico, no presentaron signos y/o síntomas de infección durante los tiempos estipulados previos al sacrificio, sin necesidad de aislar a ningún conejo por riesgo de infección. Además, reiniciaron la ingesta de alimentos en un 100% al tercer día postquirúrgico.

5. Resultados

5.1 Caracterización de células stem mesenquimales de origen dental humano

5.1.1 Evaluación morfológica

A partir de la primera semana de cultivo se evaluó la morfología celular mediante microscopía invertida; se observaron células individuales con morfología fibroblastoide adherentes al plástico, además se observaron Unidades Formadoras de Colonias (UFC), característica del cultivo de células stem mesénquimas (Figura 5-1). A partir de la segunda y tercera semana se observó un gran número de células que forman una monocapa celular confluyente cubriendo la superficie de la caja de cultivo T-25 (Figura 5-2).

Figura 5-1. Fotografía de unidades formadoras de colonias (UFC): Fotografía de microscopio invertido de las hDPSCs a una semana de cultivo. Se observa morfología fibroblastoide y unidades formadoras de colonia (UFC) características de las células stem mesenquimales

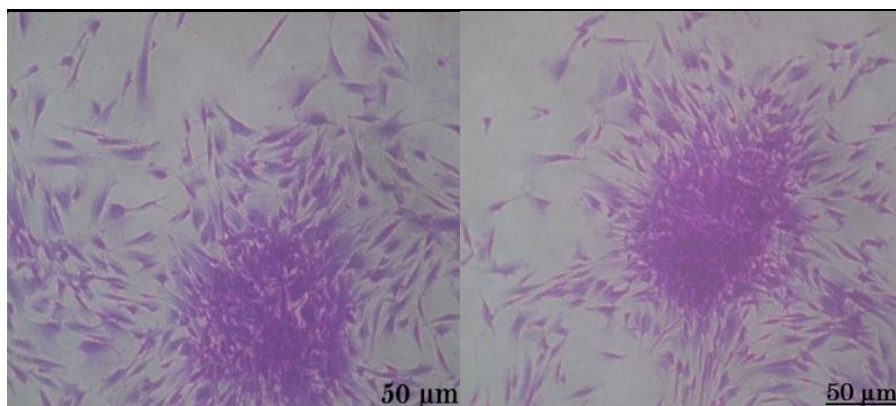
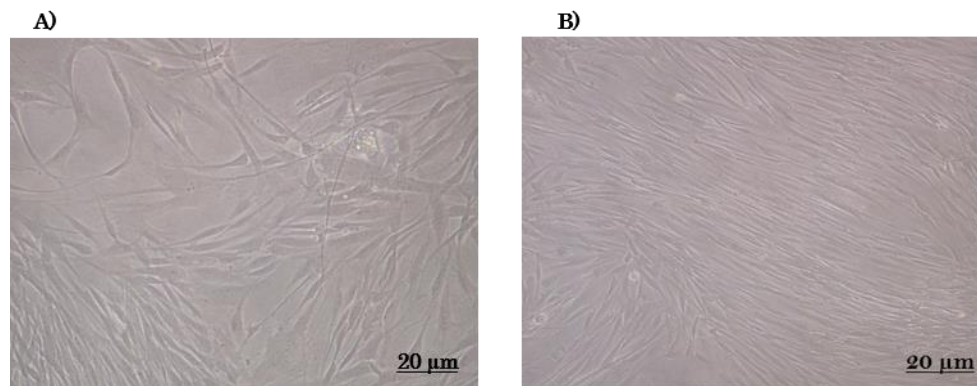


Figura 5-2. Fotografías de cultivo celular en monocapa. A) hDPSCs en la primera semana de cultivo, se observan células con morfología fibroblastoide. B) hDPSCs a la segunda semana de cultivo, se observa formación de la monocapa celular con un 95% de confluencia



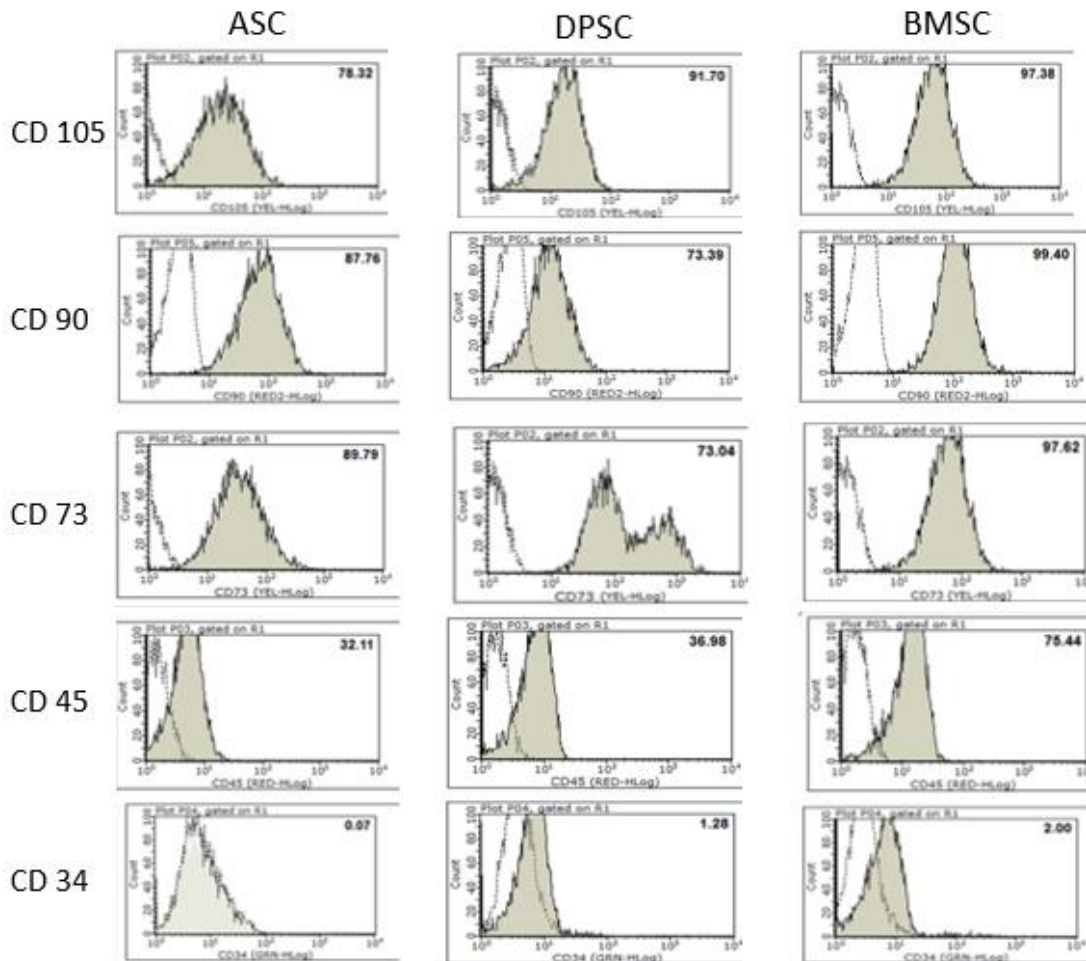
5.1.2 Inmunofenotipificación de las hDPSCs

El análisis de citometría de flujo se realizó empleando el software guavaSoft 2.6 después de adquirirse 5.000 eventos de cada uno de los tipos celulares evaluados (hDPSCs, hASCs y hBMSCs), en donde el porcentaje de células positivas fue calculado restando el porcentaje de células sin marcar del porcentaje de células fluorescentes. Se encontró que los tres tipos celulares expresan los antígenos CD105+, CD73+ y CD90+ los cuales debe expresar una célula stem mesenquimal según lo estipulado por la Sociedad Internacional de Terapia Celular en el 2006 (79). Sin embargo, observamos que las hDPSCs así como las células empleadas como control positivo hASCs y las hBMSCs presentaron diferentes porcentajes de expresión de los antígenos CD73+, CD105+ y CD90+. (Figura 5-3).

Para los antígenos hematopoyéticos, que no deben ser expresados por células stem mesénquimales encontramos que las células hBMSCs tienen un porcentaje de expresión correspondiente al 75.44% del antígeno CD45, comparado con la baja expresión de este en las células hDPSCs y hASCs. Para el antígeno CD 34 los tres tipos celulares tienen una expresión igual o inferior al 2% (Tabla 4). Estos resultados demuestran que las

células hDPSCs que fueron empleadas en este estudio son células stem mesénquimales, comparadas con los controles positivos empleados para este estudio. (Figura 5-3).

Figura 5-3. Histogramas de citometría de flujo de hDPSCs; se observan los porcentajes de expresión del fenotipo de las hASCs (células stem tejido adiposo humano), hDPSCs (células stem de pulpa dental humana), hBMSCs (células stem de medula ósea humana)



5.1.3 Evaluación de la expresión de los genes de pluripotencia

5.1.3.1 PCR-RT

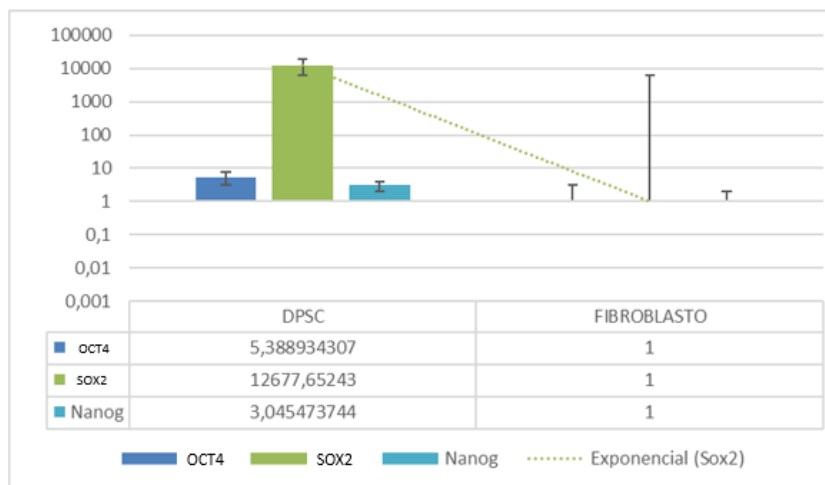
Una vez fueron electroforados los productos de la PCR-RT, se tiñeron con *Sybr Safe* (*Invitrogen*®) y se observaron en transiluminador UV. Se encontró que las células hDPSCs expresan el gen SOX2, uno de los genes que mantienen las células stem en estado indiferenciado de pluripotencia, confirmando el genotipo de células stem mesénquimales (Figura 5-4).

Figura 5-4. Electroforesis en gel de agarosa; se observa el producto de 226 pb del gen SOX2 corroborando su expresión en DPSC, una banda tenue para OCT4 y la banda de 227pb para el gen control GAPDH RT-qPCR



Sin embargo en el trasiluminador, se observó una banda tenue de expresión de OCT4, que no se observó en la foto obtenida de la electroforesis, por lo que se realizó RT-qPCR. Los resultados de la RT-qPCR demuestran que las hDPSCs empleadas en este trabajo son células stem mesenquimales, dado que expresan 26,77 veces más el gen SOX2 que las células en estado diferenciado, a su vez se observa que también expresan el gen OCT4 5,38 veces más y el gen Nanog 3,04 veces más con respecto a células en estado diferenciado. Los resultados demuestran y corroboran que son células stem mesénquimales comparando los resultados obtenidos con las células control empleadas correspondientes a fibroblastos gingivales humanos (figura 5-5).

Figura 5-5. Expresión de los genes de pluripotencia OCT4, SOX2 y Nanog por cuantificación relativa 2-DDCT en cultivos en monocapa de células hDPSCs. Se observa sobre expresión de cada uno de los genes evaluados comparado con fibroblastos gingivales humanos.



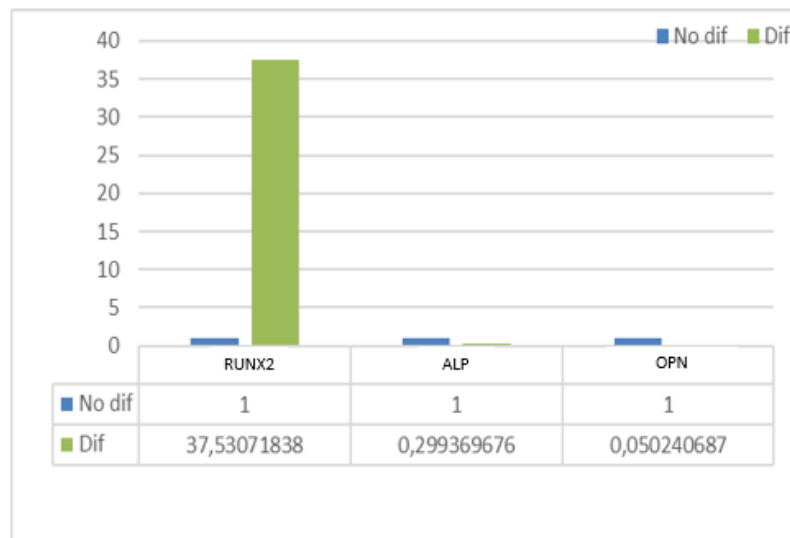
5.1.4 Doblaje poblacional (PDT) de las hDPSCs en cultivos en monocapa

La actividad clonogénica de las hDPSCs fue determinada con la fórmula de Siegel G *et al*; 2013 (87). $PDT = (\text{tiempo de cultivo} * \ln 2) / (\# \text{ células finales} / \# \text{ de células Sembradas})$, donde el tiempo de doblaje celular fue de 12.74 horas (h) durante el primer tiempo de evaluación de 24h de metabolización de la rezasurina, al tiempo de 48h el doblaje celular fue a las 20,93h, finalmente al tiempo de las 72h de metabolización del indicador de óxido reducción se encontró que el doblaje celular fue a las 28,75 h. Por lo que el promedio de doblaje celular de las hDPSCs P5 correspondió a 20.63h +/- 5.05.

5.1.5 Diferenciación osteogénica de las hDPSCs en cultivo monocapa

Con el fin de evaluar si las hDPSCs obtenidas tienen la capacidad de diferenciarse a células de linaje osteoblástico, las hDPSCs se cultivaron por 15 días utilizando medio de diferenciación osteogénica. Se confirmó la expresión de los genes RUNX2, ALP, OPN por RT-qPCR mediante el método de cuantificación relativa con la fórmula 2-DDCT utilizando hDPSCs sin diferenciar como células control. Los resultados obtenidos demuestran que las células estimuladas con el medio de diferenciación osteogénica expresan el gen RUNX2 37 veces más que las hDPSCs sin diferenciar, sin embargo aún no se evidencia aumento en la expresión de los genes ALP y OPN. Estos resultados permiten inferir que al cabo de 15 días de estimulación con el medio de cultivo de diferenciación osteogénica STEMPRO® las hDPSCs en monocapa inician el compromiso celular hacia linaje osteoblástico, dado que la expresión de este gen es la primera evidencia en el proceso de mineralización a fenotipos mineralizados y dado a la no expresión de los genes ALP y OPN, se puede inferir que estas células son pre-osteoblastos humanos. (Figura 5-6).

Figura 5-6. Expresión relativa de los genes RUNX2, ALP y OPN en hDPSCs cultivadas en monocapa y estimuladas con medio de diferenciación osteogénica por 15 días. Se observa sobre expresión del gen RUNX2.



5.2 Caracterización de las matrices extracelulares tridimensionales

5.2.1 MEB y análisis EDX de la HA bovina

En el análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB), se observan los diferentes tamaños de partículas obtenidas de HA después del proceso de sinterización y posterior proceso de molido. El tamaño obtenido de las partículas de HA fue entre 20 y 106 μm (Figura 5-7). En el análisis de EDX se observa la presencia de picos de calcio que se encuentra en mayor cantidad con respecto a los otros componentes, seguido del pico de fósforo y en menor proporción de sodio, cloro y magnesio, componentes fundamentales en la función remodeladora del hueso. La proporción Ca/P corresponde a 1.58 lo que demuestra que la muestra corresponde a hidroxiapatita natural. (Figura 5-8).

Figura 5-7. MEB; Partículas de hidroxiapatita bovina después del proceso de sinterización, se observan partículas que oscilan entre 20 y 106 μm .

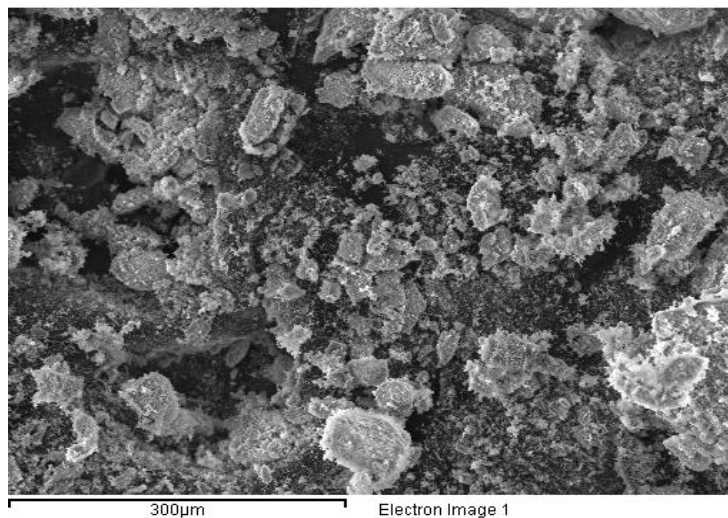
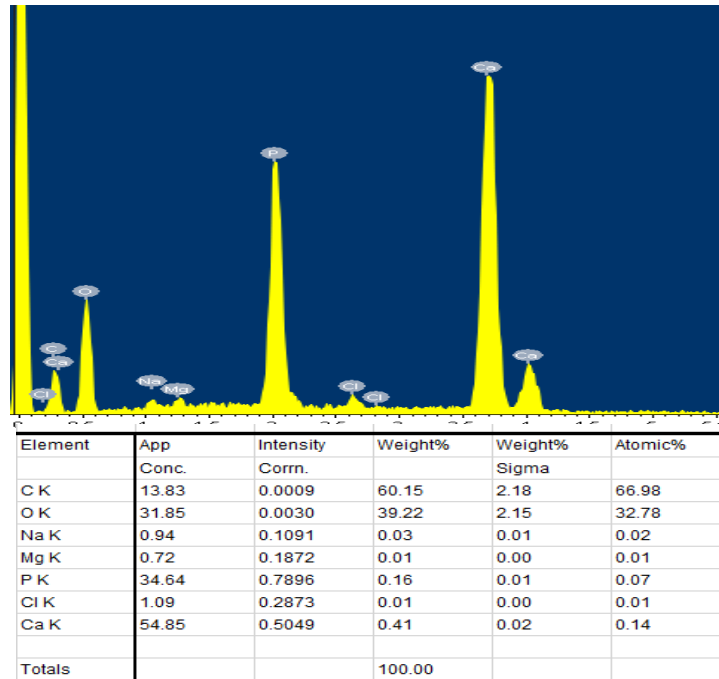


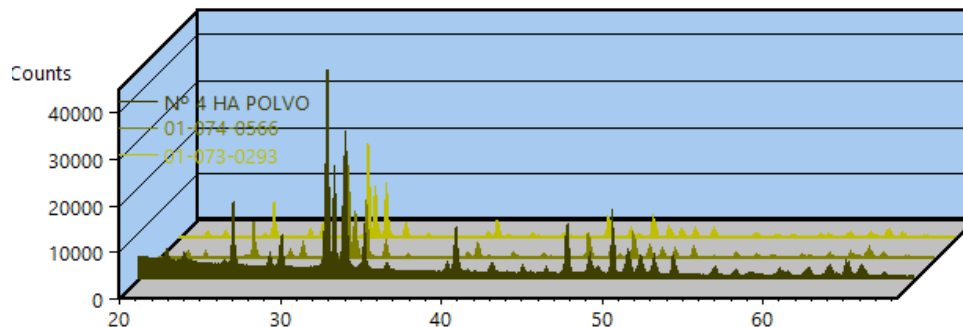
Figura 5-8. Análisis EDX de HA bovina; proporción Ca/P igual a 1.58. El análisis demuestra el alto contenido de Ca y P lo que indica que son partículas cerámicas de HA.



5.2.2 Análisis de difracción de rayos X

En el difractograma obtenido por difracción de rayos X de HA bovina, se evidencian picos estrechos y de mayor intensidad a medida que se aumentó el tiempo de permanencia, indicando buena cristalinidad. En el análisis del difractograma están presentes las reflexiones correspondientes a los compuestos identificados con base al perfil de difracción que se encuentran en la base de datos PDF-2 del International Center for Diffraction Data (ICDD). Las fases identificadas corresponden a hidroxiapatita cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con código de referencia 01-074-0566 y a hidroxiapatita con fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ con código de referencia 01-073-0293. Estos resultados demuestran que la muestra obtenida de hueso bovino por sinterización corresponde a hidroxiapatita natural (Figura 5-9).

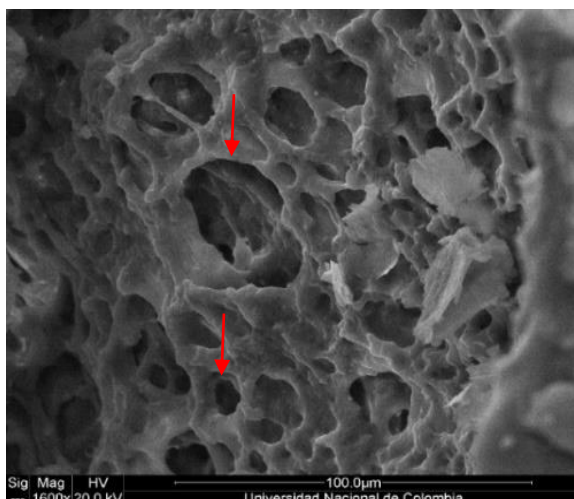
Figura 5-9. Difractograma comparativo en 3D de difracción de rayos X: Se observan las dos fases identificadas con base al perfil de difracción que se encuentran en la base de datos PDF2



5.2.3 MEB y análisis EDX de matrices tridimensionales: PLGA/HA y PLGA

Las matrices tridimensionales de PLGA/HA fueron analizadas mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), mostrando que la morfología externa de la matriz obtenida es altamente porosa con un rango en el tamaño poro de 10µm a 970 µm, cálculo realizado en el software ImageJ (figura 5-10). Estos resultados sugieren que la matriz extracelular tridimensional contiene poros de submicroescala, microescala y macroescala.

Figura 5-10. Morfología externa del material compuesto de PLGA-HA. Donde se observa su alta porosidad (10 a 978 µm). Las flechas indican los poros de diversos tamaños.



A mayor aumento se observó que las paredes internas del biocompuesto también eran porosas, con un tamaño de poro que varía entre 25 y 300 μm (Figura 5-11). Esto demuestra que la matriz tridimensional tiene una morfología interconectada lo que favorece la formación de tejido óseo, además de contribuir a la formación de redes vasculares, así como la migración, adhesión y diferenciación de las células stem mesenquimales a osteoblastos maduros. Además se pudo observar una distribución uniforme de las partículas de HA dentro de la fase polimérica, como se indica en la figura 5-12.

Figura 5-11. Magnificación de la pared de un poro de matriz PLGA/HA: Microfotografía en microscopía de barrido, donde se observan poros en la pared de un macroporo de la matriz de PLGA-HA.

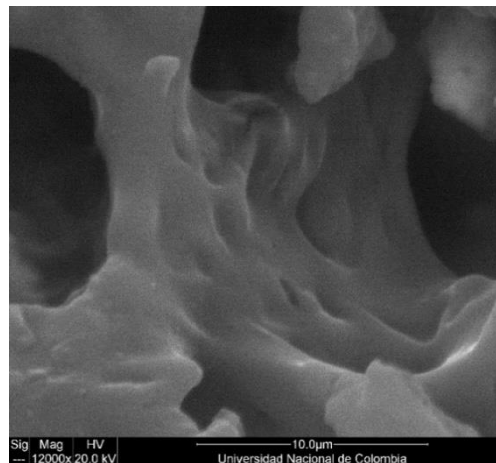
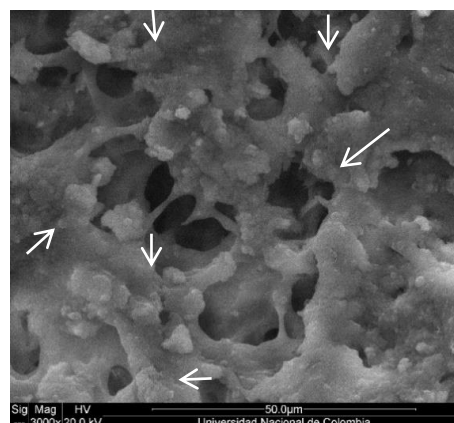
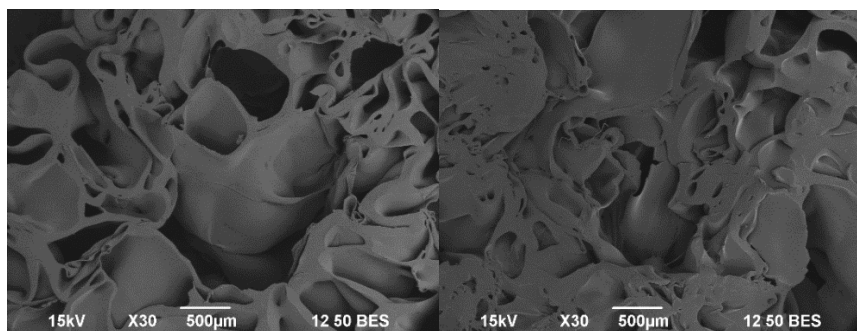


Figura 5-12. Distribución homogénea de las partículas de cerámica de HA en matriz de PLGA/HA



En las fotografías por MEB obtenidas de la matriz de PLGA, se observa que la superficie es lisa comparada con PLGA/HA además, es menos porosa y el tamaño de poro es superior a la matriz de PLGA/HA encontrándose un tamaño de poro hasta de 1.100 μm (Figura 5-13).

Figura 5-13. MEB de matriz tridimensional de PLGA: Se observa menor rugosidad y porosidad en la superficie externa. Se observan poros de tamaños superiores a 1.000 micras.



El análisis químico (EDX) de la matriz de PLGA/HA, mostró que los componentes de esta matriz son calcio, fósforo, oxígeno y carbono. La presencia de estos componentes demuestra que en su contenido no existen trazas de otros elementos contaminantes, además se observa que existe una alta concentración de oxígeno al igual que calcio, dado al componente químico de la fase polimérica y el calcio por el componente cerámico. La proporción de PLGA y HA fue de 1:3 (Figura 5-14). El análisis EDX de la composición química de la matriz de PLGA solo contiene carbono y oxígeno, dado que es un polímero orgánico (Figura 5-15), la proporción de ácido láctico y glicólico es de 50:50, no se evidencian trazas de elementos contaminantes.

Figura 5-14. Análisis EDX de matriz tridimensional de PLGA/HA: Se observa el contenido de la fase cerámica (Ca/P) y la fase orgánica(C/O). Existe una mayor concentración de O seguida por la de Ca.

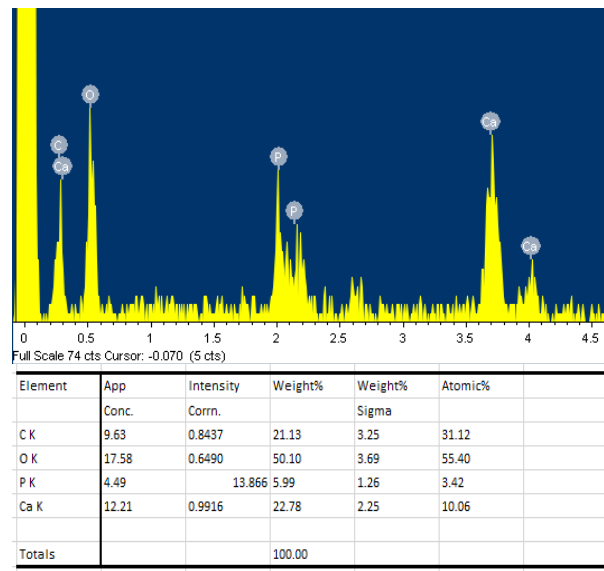
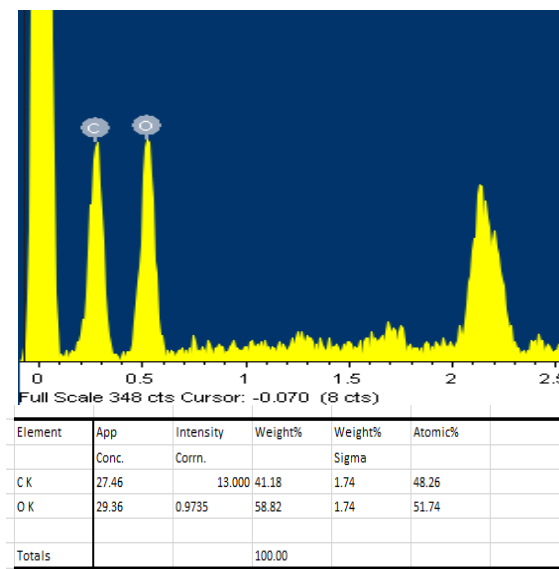


Figura 5-15. Análisis EDX de matriz tridimensional de PLGA: Se observa el contenido orgánico (Picos de C y O).

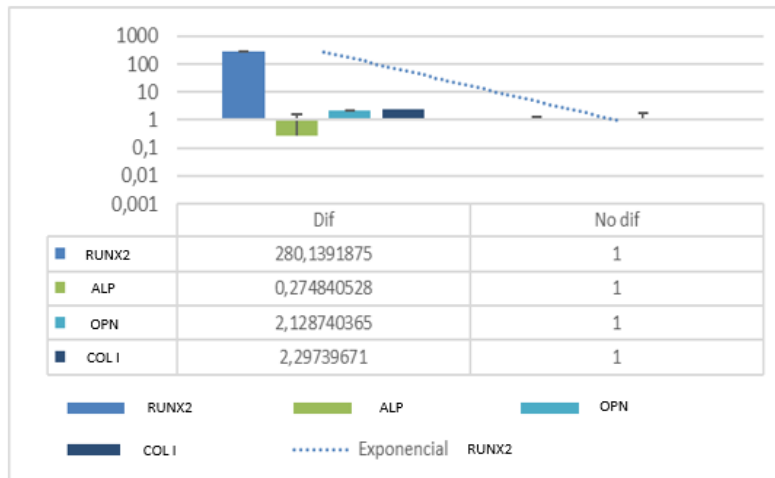


5.3 Estudio piloto: Diferenciación osteogénica de hDPSCs en matrices tridimensionales de PLGA/HA

5.3.1 PCR-RT de hDPSCs osteodiferenciadas en matriz de PLGA/HA

Al cabo de 7 días de cultivo las hDPSCs estimuladas con el medio de diferenciación osteogénica y sembradas en la matriz de PLGA/HA, se les realizó cuantificación relativa por RT-qPCR con el propósito de verificar la expresión de los genes específicos del linaje osteoblástico RUNX2, ALP, OPN, COL I, utilizando hDPSCs sembradas en la matriz PLGA/HA con medio completo de cultivo como control. Los resultados obtenidos muestran que las células estimuladas con el medio de diferenciación osteogénica y sembradas en la matriz de PLGA/HA sobreexpresan el gen RUNX2 280,13 veces más que las células sin diferenciar empleadas como control, y se observa una expresión de COL I 2,29 veces más que el grupo control, OPN 2,13 veces más que las células no estimuladas y baja expresión de ALP. Estos resultados permiten inferir que las hDPSCs después de 7 días de cultivo en la matriz, podrían comenzar el proceso de diferenciación a fenotipos mineralizantes demostrando que la osteodiferenciación de células stem ocurre más rápido en matrices tridimensionales de PLGA/HA por las propiedades osteoconductoras de los materiales comparado con el cultivo monocapa (Figura 5-16). El aumento en la expresión del gen osteopontina puede relacionarse con el proceso de adhesión de las células a la matriz, ya que este gen está relacionado con la presencia o expresión de moléculas de adhesión célula-matriz como las integrinas (105).

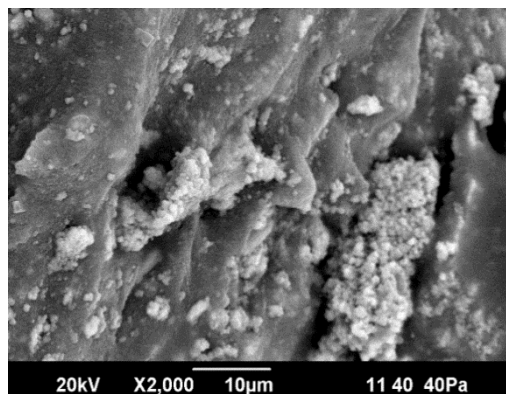
Figura 5-16. Cuantificación relativa de los genes RUNX2, ALP, COL1 y OPN en hDPSCs osteodiferenciadas en PLGA/HA por 7 días. Se observa sobre expresión del gen RUNX2



5.3.2 Morfología y adhesión de hDPSCs osteodiferenciadas en matriz de PLGA/HA

Para determinar la morfología de las hDPSCs osteodiferenciadas en las matrices de PLGA/HA al cabo de 7 días de cultivo en medio de diferenciación osteogénica, se realizaron fotografías por MEB, observando un gran número de células adheridas al material y dentro de los poros demostrando la interconectividad de la matriz, además se observaron uniones entre célula-biomaterial y célula-célula (Figura 5-17).

Figura 5-17. MEB morfología y adhesión de las hDPSCs en matriz de PLGA/HA: Se observan células adheridas a la matriz, unión célula-célula, además se evidencia como las hDPSCs penetran los poros de la matriz demostrando la interconectividad que posee el soporte tridimensional. Evaluación del comportamiento de las hDPSCs en matrices tridimensionales de PLGA y de PLGA/HA.

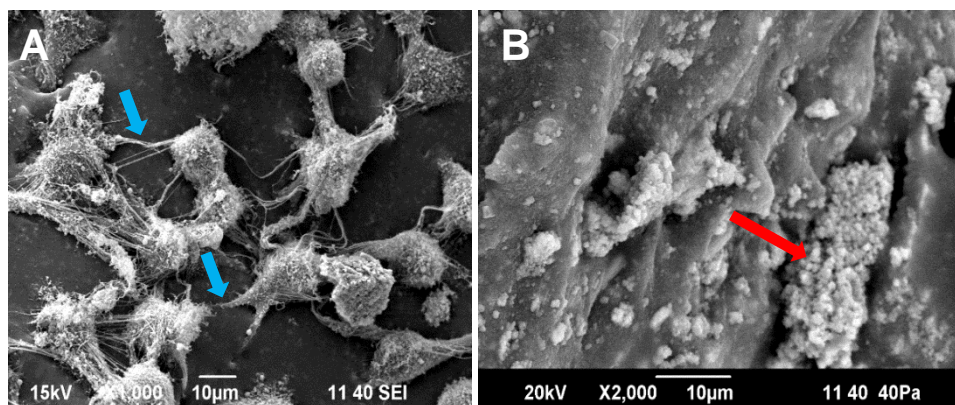


5.4 Evaluación del comportamiento de las hDPSCs en matrices 3D de PLGA y de PLGA/HA

5.4.1 Morfología y adhesión celular

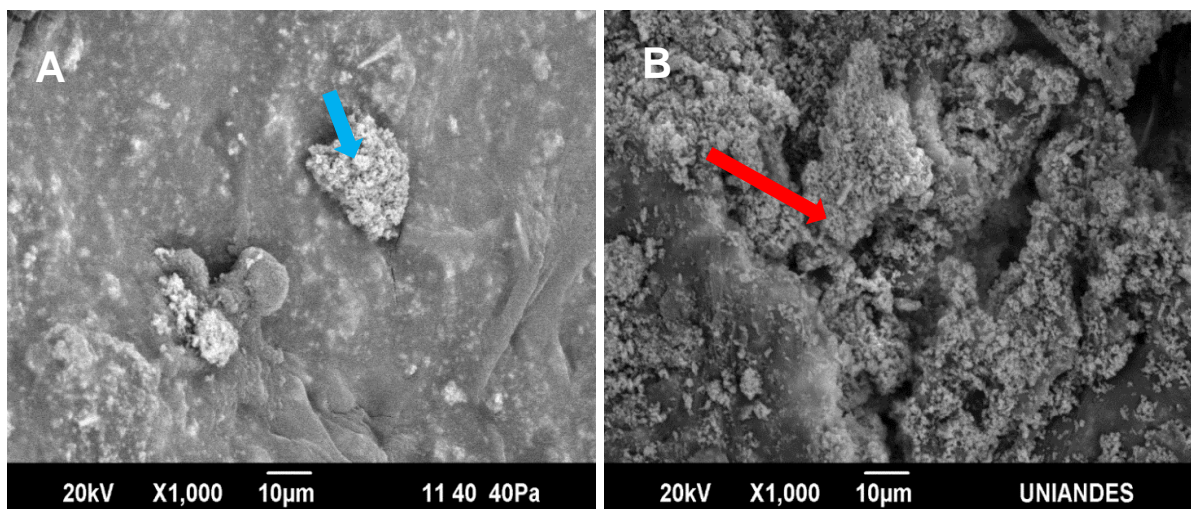
La morfología celular que adoptan las células dependen de las características topográficas de la superficie del sustrato; en este sentido, la adhesión y proliferación y los procesos de diferenciación celular están influenciados por la forma, rugosidad y porosidad del sustrato (126). A este respecto, se observó, que tanto en las matrices de PLGA (superficie plana y porosa) y las de PLGA/HA (superficie rugosa y porosa), las hDPSCs cultivadas durante 7 días en medio de diferenciación osteogénica, se adhieren a la superficie a través de proyecciones citoplasmáticas delgadas locales correspondientes a filopodios, proyecciones que se extienden a través de los poros del sustrato (lamelipodios) demostrando de esta forma la interconectividad de la matriz (Figura 5-18); además, se observan prolongaciones citoplasmáticas que se extiende entre célula-célula. En la figura 22B, se destaca la presencia de elementos vesiculares sobre la superficie celular que podrían estar relacionadas con la presencia de vesículas de la matriz que se producen por la brotación polarizada de la superficie de osteoblastos, lo que indica la posible diferenciación de las hDPSCs a este linaje (127,128).

Figura 5-18. MEB de hDPSCs osteodiferenciadas en matrices de PLGA y PLGA/HA 7 días: **A.** Matrices de PLGA; se evidencia adhesión al biomaterial y uniones célula a célula, existe penetración de lamelipodios de las células en los poros del soporte (Flecha azul), demostrando interconectividad. **B.** hDPSCs en matrices de PLGA/HA; se evidencian pequeñas vesículas sobre las células infiriendo la posible diferenciación a linaje osteoblástico, pues se asocia con posible formación de vesículas de la matriz que se producen por brotación polarizada de la superficie de osteoblastos (Fecha roja).



Después de 15 días de cultivo las hDPSCs Sembradas en matrices de PLGA con medio de diferenciación osteogénica, también presentaron pequeñas estructuras vesiculares, probablemente producidas por osteoblastos en los procesos de mineralización ósea, sugiriendo su compromiso a linaje osteoblástico de una forma más tardía que lo encontrado en las matrices de PLGA/HA, hecho que se puede atribuir a las propiedades físicas y químicas del material (Figura 5-19A). Por el contrario, las hDPSCs sembradas en la matriz de PLGA/HA tras 15 días de cultivo en medio de diferenciación osteogénica mostraron mayor cantidad de vesículas sobre la superficie celular y a mayor aumento en MEB se observan estructuras hexagonales sugiriendo una posible nucleación de hidroxiapatita (Figura 5-19B).

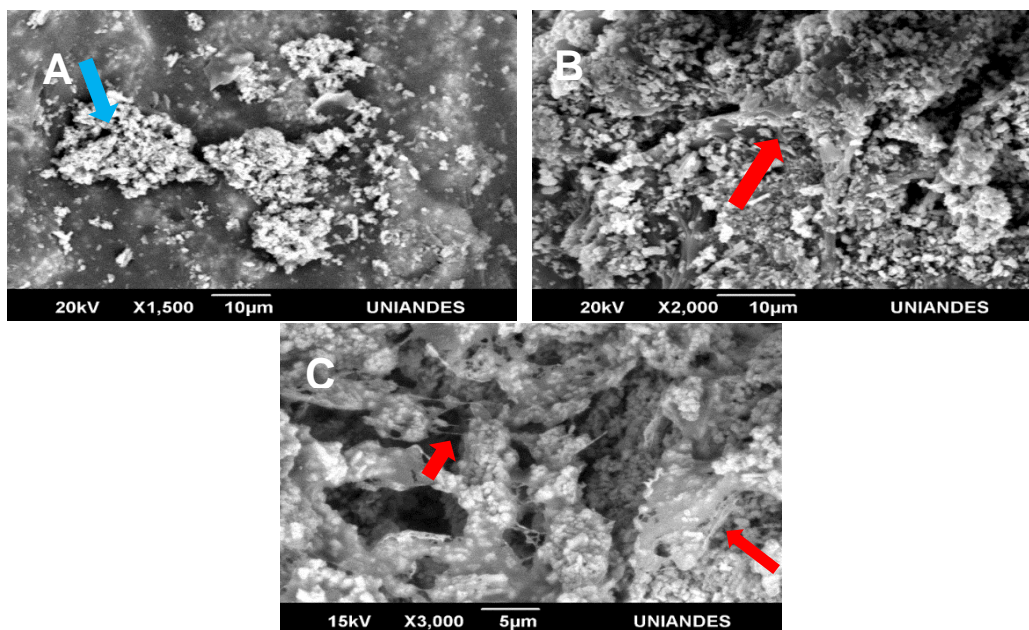
Figura 5-19. hDPSCs osteodiferenciadas en matrices de PLGA y PLGA/HA 15 DÍAS: **A.** MEB de las hDPSCs sembradas en matrices de PLGA, se observan posibles vesículas de la matriz sobre la superficie celular (Flecha azul). **B.** MEB de las hDPSCs Sembradas en PLGA/HA, se observa mayor cantidad de posibles vesículas de la matriz y posible nucleación de hidroxiapatita sobre la superficie celular, coincidiendo con la primera etapa de mineralización (Flecha roja).



A los 30 días de cultivo de las hDPSCs diferenciadas en las matrices de PLGA se observó un incremento considerable de las estructuras vesiculares sobre la superficie celular y además se observan estructuras hexagonales compatibles con cristales de hidroxiapatita, por lo que probablemente se dio la fase inicial de la mineralización

compatible con la nucleación, fenómeno similar al ocurrido en las hDPSCs sembradas en la matriz de PLGA/HA a los 15 días (Figura 5-20A). Tras los 30 días de cultivo las hDPSCs en matrices de PLGA/HA, presentan estructuras hexagonales sobre la superficie celular y sobre la superficie del material, indicando la probable mineralización de la matriz, resultado que se puede atribuir a la presencia de hidroxiapatita sobre la fase polimérica que favorece la mineralización por la alta concentración de calcio y fosfato a nivel extracelular (128) (Figura 5-20B). Además se observa la persistencia de las uniones célula-célula y la posible mineralización de la matriz extracelular por la presencia de fibrillas de colágeno (Figura 5-20C).

Figura 5-20. hDPSCs osteodiferenciadas en matrices de PLGA y PLGA/HA 30 DÍAS: **A.** MEB de las hDPSCs sembradas en matrices de PLGA, se observa mayor cantidad de posibles vesículas de la matriz y posible nucleación de hidroxiapatita sobre la superficie celular, coincidiendo con la primera etapa de mineralización (Flecha azul). **B.** MEB de hDPSCs MEB sembradas en matrices de PLGA/HA, se observa posible mineralización de la matriz atribuida a la presencia de la HA sobre la fase polimérica (Flecha roja). **C.** MEB de hDPSCs sembradas en matrices de PLGA/HA, se observa contacto intercelular mediante prolongaciones citoplasmáticas y la posible mineralización de la MEC y adhesión (Flechas rojas).



Terminados los 30 días de cultivo celular, se evaluó el cambio morfológico de las hDPSCs diferenciadas realizando una comparación entre osteoblastos humanos sembrados en los dos tipos de soportes tridimensionales empleados como control positivo y entre las hDPSCs sembradas en los dos tipos de soportes, con medio completo de cultivo empleadas como control negativo mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) (Figura 5-21 y 5-22). Se observó que las hDPSCs sembradas en las matrices de PLGA/HA con medio completo de cultivo se encuentran adheridas al sustrato mediante prolongaciones citoplasmáticas correspondientes a filopodios y lamelipodios que trascurren por los poros del soporte, además se observó que existe una posible formación de vesículas de la matriz pero en menor cantidad comparadas con las hDPSCs diferenciadas tras 30 días de cultivo en medio de diferenciación osteogénica, lo que indica la posible bioactividad del biocompuesto, por otra parte, los osteoblastos humanos sembrados en PLGA/HA tras los 30 días de cultivo han mineralizado la matriz (Figura 5-21).

Por otra parte, las hDPSCs sembradas en la matriz de PLGA en medio completo de cultivo presentan adhesión al sustrato sin variación morfológica, por el contrario, las hDPSCs osteodiferenciadas en la matriz de PLGA tienen sobre la superficie de la membrana estructuras hexagonales compatibles con cristales de hidroxiapatita, lo que indica mineralización de la matriz. Los osteoblastos humanos sembrados en la matriz de PLGA con medio completo de cultivo, presentan sobre la superficie polimérica y celular aparentes nódulos de mineralización y se observa como estos se mimetizan con la matriz, hallazgo similar al de las hDPSCs sembradas en la matriz de PLGA/HA y a los osteoblastos sembrados en PLGA/HA (Figura 5-22).

Figura 5-21. Comparación morfológica de hDPSCs en medio completo de cultivo (MC), hDPSCs diferenciadas y osteoblastos humanos en matrices de PLGA/HA, 30 días de cultivo: **A.** hDPSCs en MC, se observa que no tiene significantes cambios morfológicos, hay presencia de filopodios y lamelipodios que permiten la adhesión a la matriz, tienen en la superficie celular estructuras similares a vesículas de la matriz (Flecha azul). **B.** hDPSCs diferenciadas: Se observa prolongaciones citoplasmáticas entre célula-célula, célula-material, estructuras similares a nódulos de mineralización tras 30 días de cultivo (Flechas rojas). **C.** Osteoblasto humanos: Se observa densa mineralización y como estas células se mimetizan en el material formando una monocapa (Fecha amarilla).

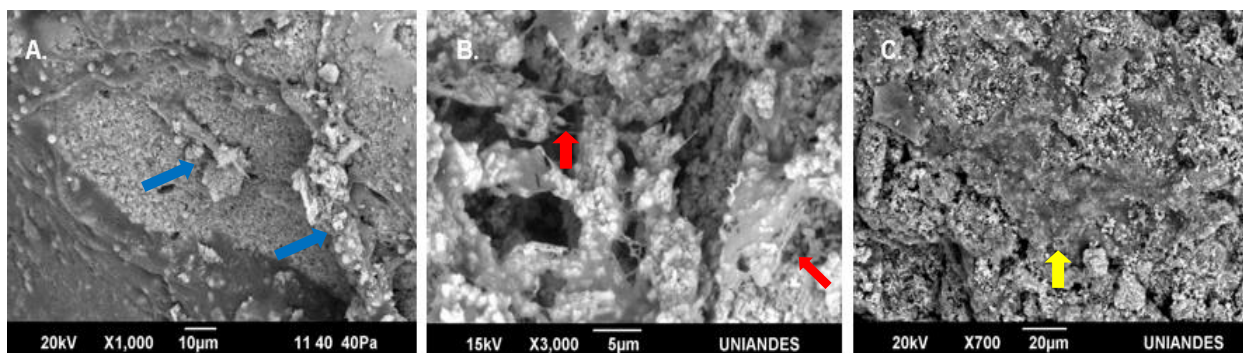
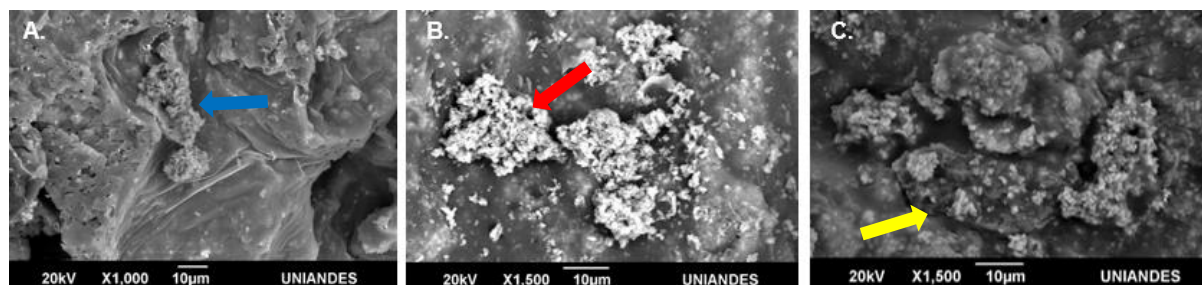


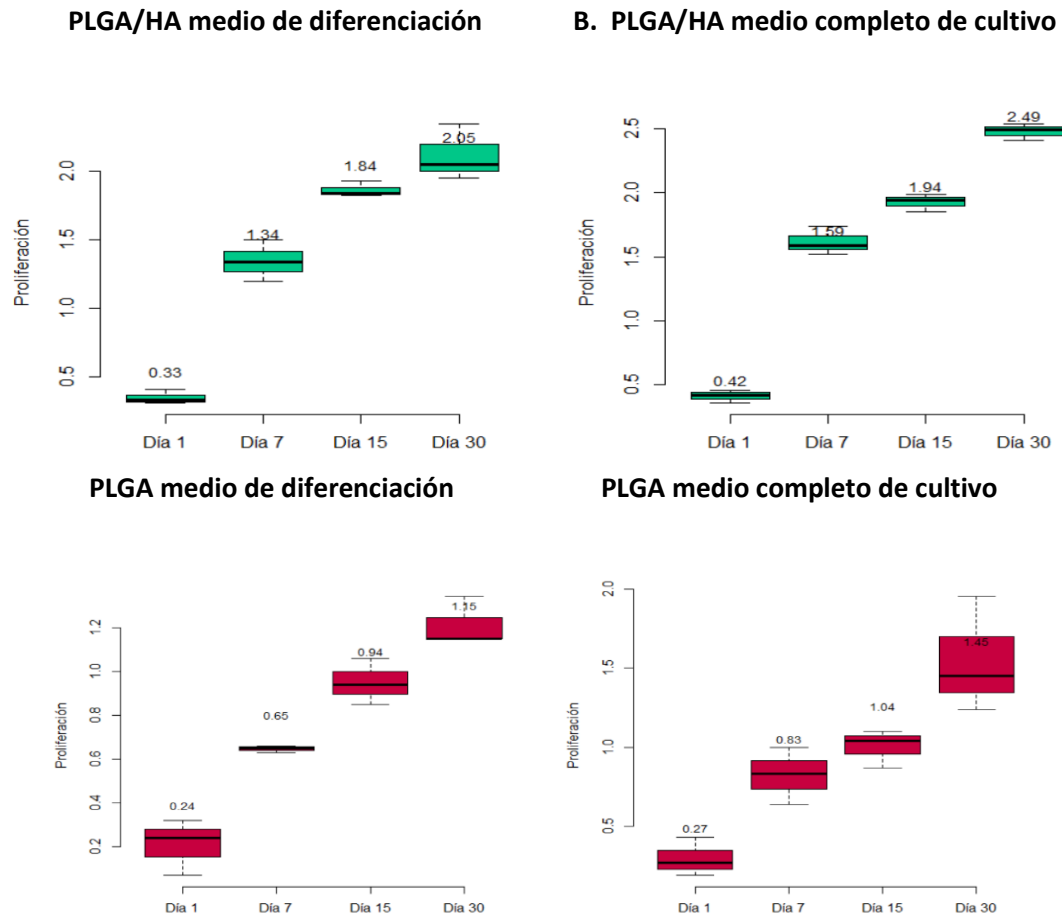
Figura 5-22. Comparación morfológica de hDPSCs en medio completo de cultivo (MC), hDPSCs diferenciadas y osteoblastos humanos en matrices de PLGA 30 días de cultivo: **A.** hDPSCs en MC, se observa que no tiene significantes cambios morfológicos, hay presencia de filopodios y lamelipodios (Flecha azul). **B.** hDPSCs diferenciadas: Se observa adhesión celular a la matriz, estructuras similares a vesículas de la matriz tras 30 días de cultivo (Flechas rojas). **C.** Osteoblasto humanos: Se observan aparentes nódulos de mineralización y como estas células se mimetizan en el material formando una monocapa (Fecha amarilla).



5.4.2 Determinación de proliferación celular

Después realizar el ensayo de proliferación a través de la reducción de la resazurina, se evidencia a nivel general que la proliferación celular aumenta a través del tiempo bajo cualquier condición experimental, bien sea por el tipo de constructo o medio de cultivo; sin embargo de manera más puntual se destaca que en el soporte de PLGA/HA en el que se encuentran sembradas las hDPSCs en medio completo de cultivo, se presentan los valores medianos de proliferación más altos y de menor dispersión, a través del tiempo. Por otro lado se puede afirmar que en cuanto al tipo de soporte siempre la proliferación es mayor en los constructos de PLGA/HA, así se varíe el medio de cultivo (medio completo de cultivo o medio de diferenciación osteogénica). (Figura 5-23).

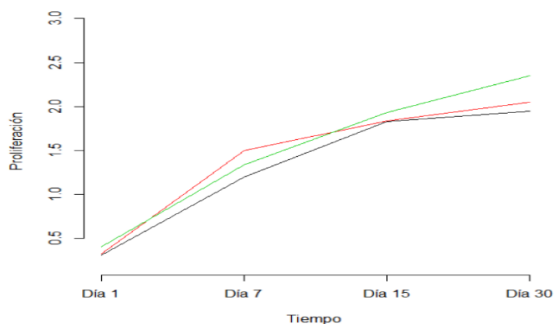
Figura 5-23. Diagramas de caja y bigotes por tipo de soporte (PLGA/HA y PGA) en cada uno de los tiempos (7,15 Y 30 días).



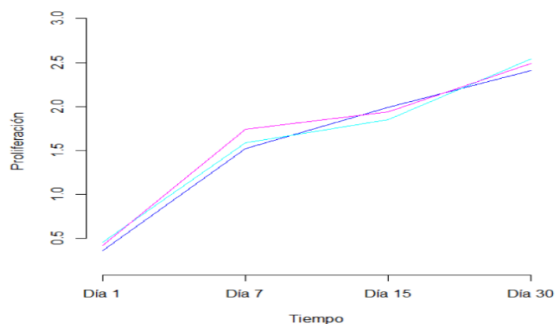
Para hacer un enfoque más cercano sobre las unidades experimentales correspondientes a el tipo de matriz tridimensional en el que se sembraron las hDPSCs y al medio de cultivo (medio de diferenciación osteogénica y al medio completo de cultivo como control), se muestra la gráfica de los perfiles de cada una de las réplicas para las cuatro condiciones experimentales (Figura 28), se destaca que las unidades experimentales asociadas al material PLGA/HA presentan valores de proliferación mayores a los que presentan las asociadas al material PLGA, esta diferencia es de aproximadamente una unidad para los dos tipos de medio de cultivo. De esta grafica se puede intuir que hay paralelismo entre los perfiles; es decir, que las unidades experimentales se comportan de manera paralela a través del tiempo. Vale la pena destacar que hubo una sola unidad experimental en la cual la proliferación disminuyo de un tiempo a otro; esta unidad experimental se ubica en la gráfica PLGA medio completo de cultivo (MC) y se ilustra con color verde (Grafica 5-24).

Figura 5-24. Perfiles de cada una de las réplicas por tipo de material y medio de cultivo en cada uno de los tiempo en que fue leída la absorbancia de la reducción de la resazurina.

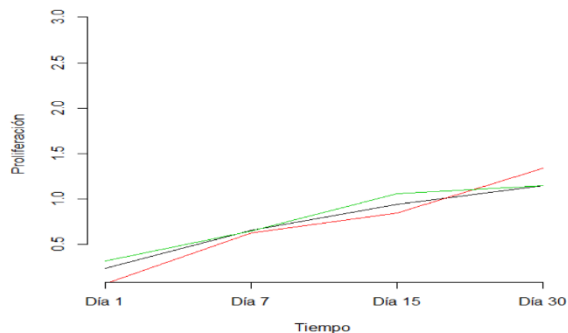
hDPSCs en PLGA/HA con medio de diferenciación



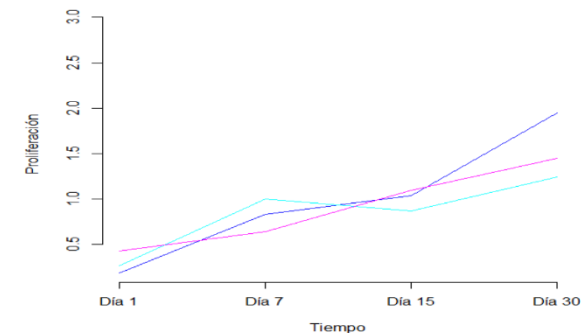
hDPSCs en PLGA/HA con medio completo



hDPSCs en PLGA con medio de diferenciación

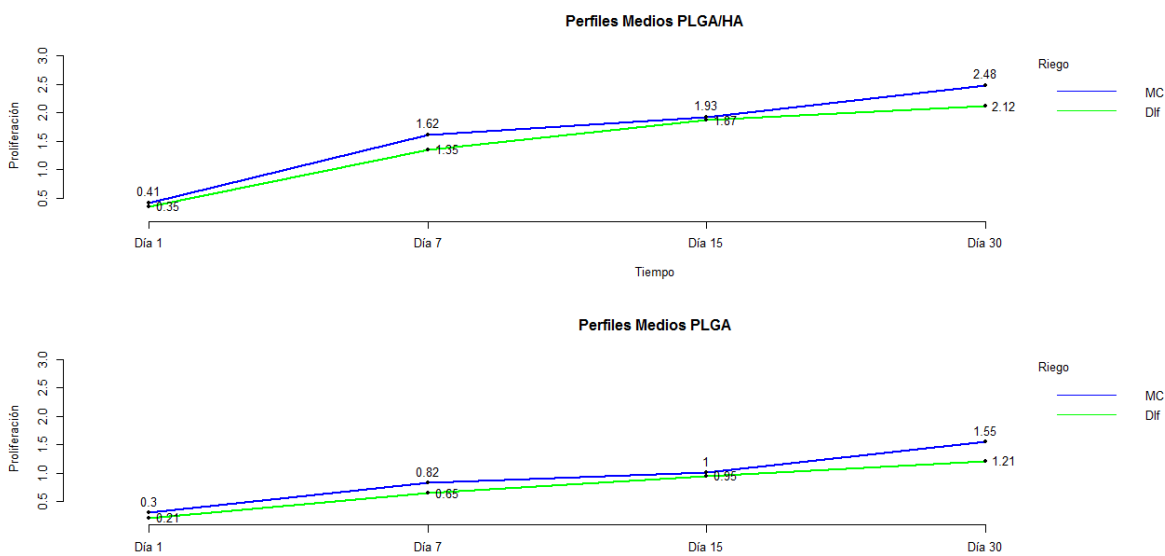


hDPSCs en PLGA con medio completo



Se realizó un promedio de los perfiles que se muestran en cada una de las gráficas de la Figura 28, obteniendo así 4 perfiles promedio: PLGA/HA-MC, PLGA/HA-Medio de diferenciación, PLGA- MC y PLGA- Medio de diferenciación. Los cuales se muestran en la Figura 5-25.

Figura 5-25. Perfiles medios de cada medio de cultivo en cada uno de los materiales.



Entonces es claro que el perfil medio que reporta mayor proliferación durante los 30 días de cultivo de las hDPSCs es el asociado al medio completo de cultivo en el soporte de PLGA/HA, seguido por el perfil con medio de diferenciación osteogénica y material PLGA/HA. Los perfiles que reportan menor proliferación a lo largo de los 30 días son los asociados al material PLGA con ambos tipos de medio de cultivo. Se puede inferir una tendencia de paralelismo entre los perfiles.

En la siguiente etapa del análisis estadístico (Modelamiento) se verificaron las hipótesis para ver si hay diferencias significativas entre la proliferación debidas al tipo de material, pues se cree que al incluir la hidroxiapatita a la fase polimérica (PLGA) la proliferación celular puede incrementar comparada con la proliferación celular en matrices de PLGA y si durante la estimulación con medio de diferenciación osteogénica la proliferación se puede disminuir por la posible diferenciación de las hDPSCs hacia linaje osteoblástico.

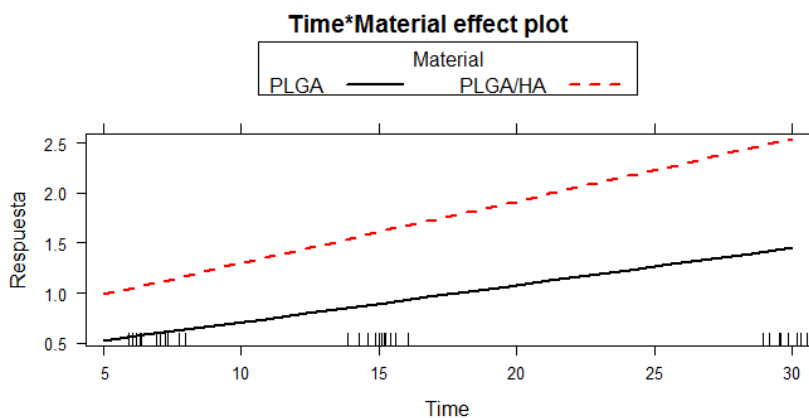
Después del análisis estadístico mediante el modelo de sub-parcelas divididas en bloque realizado en el software R, se estimó el coeficiente con su respectivo valor P (Tabla 5-1).

Tabla 5-1. Estimación de los coeficientes con su respectivo P valor.

Coefficients:	Value	Std.Error	t-value	p-value
(Intercept)	0.2977281	0.04819246	6.177899	0.0000
Time	0.0340216	0.00418271	8.133853	0.0000
MaterialPLGA/HA	0.3245782	0.06162573	5.266926	0.0000
RiegoMC	0.0845927	0.06162573	1.372684	0.1773
Time:MaterialPLGA/HA	0.0249447	0.00482978	5.164764	0.0000
Time:RiegoMC	0.0061031	0.00482978	1.263640	0.2135
MaterialPLGA/HA:RiegoMC	0.0265327	0.06485579	0.409103	0.6846

La única interacción que resulto ser significativa fue la del tiempo con el material PLGA/HA y su respectivo coeficiente fue 0.0249447. Este valor indica un cambio en la pendiente de la curva de crecimiento de la proliferación cuando las células son cultivadas en el soporte de PLGA/HA. Por lo cual dado un p-valor=0 demuestra que existe suficiente evidencia estadística para afirmar que la diferencia entre las pendientes de las curvas de crecimiento, de la proliferación, asociadas a los dos tipos de material es significativa a lo largo del tiempo. De igual manera ocurre con el intercepto. Para ver con total claridad, la afirmación anterior se muestra en la figura 5-26, que hace referencia la interacción significativa.

Figura 5-26. Plot del efecto del material sobre la proliferación celular a través del tiempo: p-valor=0, diferencia significativa que demuestra mayor proliferación en matrices de PLGA/HA con respecto a la de PLGA durante los 3 tiempos evaluados.



5.4.3 Perfil de expresión génica

Los niveles de expresión del RNAm de los genes asociados con la diferenciación osteogénica RUNX2, ALP, OPN y COL I se evaluó por RT-qPCR a 7, 15 y 30 días en las hDPSCs sembradas en las matrices de PLGA y PLGA/HA estimuladas con medio de diferenciación osteogénica, como control positivo se emplearon osteoblastos humanos sembrados en los dos tipos de matrices, con el objetivo de identificar el grado de diferenciación alcanzado de las hDPSCs en cada uno de los constructos.

Una vez obtenidos los datos de la expresión relativa de cada gen, se realizó un análisis estadístico descriptivo de los perfiles de cada una de las réplicas experimentales por tipo de material a través del tiempo, comparando los niveles de expresión de las hDPSCs diferenciadas con el control positivo correspondiente a osteoblastos humanos (Figura 5-27).

Tras 7 días de cultivo de las hDPSCs en la matriz de PLGA/HA con medio de diferenciación osteogénica, se observa un mayor nivel de expresión del gen Runx2 con respecto a los osteoblastos humanos bajo esta misma condición. A través del tiempo la expresión de RUNX2 en las hDPSCs va disminuyendo hasta alcanzar casi los mismos niveles de expresión de este gen en osteoblastos humanos al cabo de los 30 días de cultivo. Este fenómeno es completamente opuesto bajo la condición experimental correspondiente a la siembra de las hDPSCs en matrices de PLGA a través del tiempo (Figura 5-27 A).

Para el gen ALP, se observó que el nivel de expresión de este gen en las hDPSCs diferenciadas en las matriz de PLGA/HA incrementa a través del tiempo, sin embargo estos niveles de expresión son más bajos comparados con los expresados por los osteoblastos humanos en este tipo de matriz, además se evidencia que las hDPSCs en la matriz de PLGA tienen los niveles más bajos de expresión de este gen a través del tiempo (Figura 5-27 B).

Los niveles de expresión de OPN de las hDPSCs en las matrices de PLGA y PLGA/HA fueron incrementando a través del tiempo, sin embargo, los niveles de expresión de este gen fueron superiores en los osteoblastos a los 7 y 15 días en ambas condiciones (tipo de células y material), no obstante, se debe resaltar que los niveles de expresión de este gen para todas las condiciones al tiempo 30 son similares (Figura 5-27 C).

Los niveles de expresión de COL I en las hDPSCs en la matriz de PLGA/HA con medio de diferenciación osteogénica son más bajos con respecto a los expresados por los osteoblastos a los 7 y 15 días en esta misma condición, sin embargo, a los 30 días de cultivo, los niveles de expresión de este gen son muy similares entre las hDPSCs y los osteoblastos humanos. Por el contrario, los niveles de expresión de OPN en las hDPSCs en la matriz de PLGA, son más bajos con respecto a los osteoblastos humanos en los 3 diferentes tiempos (Figura 5-27 D).

Con el objetivo de realizar una correlación entre los 4 tipos de genes para cada una de las condiciones experimentales (tiempo, tipo de matriz y tipo de célula), se realizó una agrupación jerarca de los datos en clúster; que es una forma de disponer los elementos en una jerarquía según la distancia o la similitud entre ellos establecida mediante coeficiente de correlación de Pearson, ilustrado en un mapa de calor, donde en este caso las filas representan cada condición experimental y las columnas los genes. Cada nivel de expresión génica se representa con un rectángulo de color en la posición correspondiente a su gen y a su condición experimental. El color verde representa una baja expresión, seguido del color negro expresión media y por último el color rojo expresión alta.

De este modo se observó que existe correlación o un alto grado de similitud entre las condiciones experimentales de las hDPSCs diferenciadas en PLGA/HA y PLGA a los 7 días con respecto al grado de expresión de los 4 genes evaluados, sin embargo, al comparar el grado de expresión en los controles (Osteoblastos a los 7 días de cultivo en PLGA/HA y PLGA) no se correlacionó, considerando la gran distancia entre los clústers ($Rho=0,2989$). Por otra parte, se evidenció que existe un alto grado de correlación entre las hDPSCs sembradas en matrices de PLGA/HA a los 15 días con los osteoblastos sembrados en PLGA/HA a los 7 días, sugiriendo una posible diferenciación de las

hDPSCs hacia linaje osteoblástico. Se observó similitud entre las hDPSCs en matrices de PLGA a los 15 días de cultivo con las hDPSCs en PLGA/HA y PLGA a los 7 días, lo que hace inferir que el grado de diferenciación a linaje osteoblástico es más tardío, con respecto a las hDPSCs-PLGA/HA a los 15 días de cultivo, pues no se evidencia correlación alguna con osteoblastos humanos (Figura 5-28)

En el mapa de calor, la correlación más relevante corresponde a las hDPSCs en PLGA/HA durante 30 días de cultivo con los osteoblastos humanos en PLGA/HA, pues se observan los mismos niveles de expresión génica, lo que permite suponer que las hDPSCs han alcanzado un nivel de diferenciación a osteoblastos maduros. En las hDPSCs-PLGA durante 30 días de cultivo se evidencia un alto grado de expresión de los 4 genes evaluados (RUNX2, ALP, OPN y COL I), sin embargo es menor la correlación con su respectivo control (osteoblastos -PLGA tras 30 días de cultivo) comparada con las hDPSCs en matriz de PLGA/HA, lo que permite suponer que es más rápida la diferenciación de las hDPSCs en este tipo de matriz (Figura 5-28). No obstante, es fundamental aclarar que las células osteodiferenciadas en matrices de PLGA alcanzan una diferenciación osteoblástica aunque más tardíamente comparada con la matriz de PLGA/HA.

Figura 5-27. Análisis estadístico descriptivo de los genes RUNX2, ALP, OPN y COL I: **A.** Grafica comparativa de perfiles de expresión de RUNX2 entre osteoblastos y hDPSCs diferenciadas en las matrices de PLGA/HA y PLGA. **B.** Grafica comparativa de perfiles de expresión de ALP entre osteoblastos y hDPSCs diferenciadas en las matrices de PLGA/HA y PLGA. **C.** Grafica comparativa de perfiles de expresión de OPN entre osteoblastos y hDPSCs diferenciadas en las matrices de PLGA/HA y PLGA. **D.** Grafica comparativa de perfiles de expresión de COL I entre osteoblastos y hDPSCs diferenciadas en las matrices de PLGA/HA y PLGA.

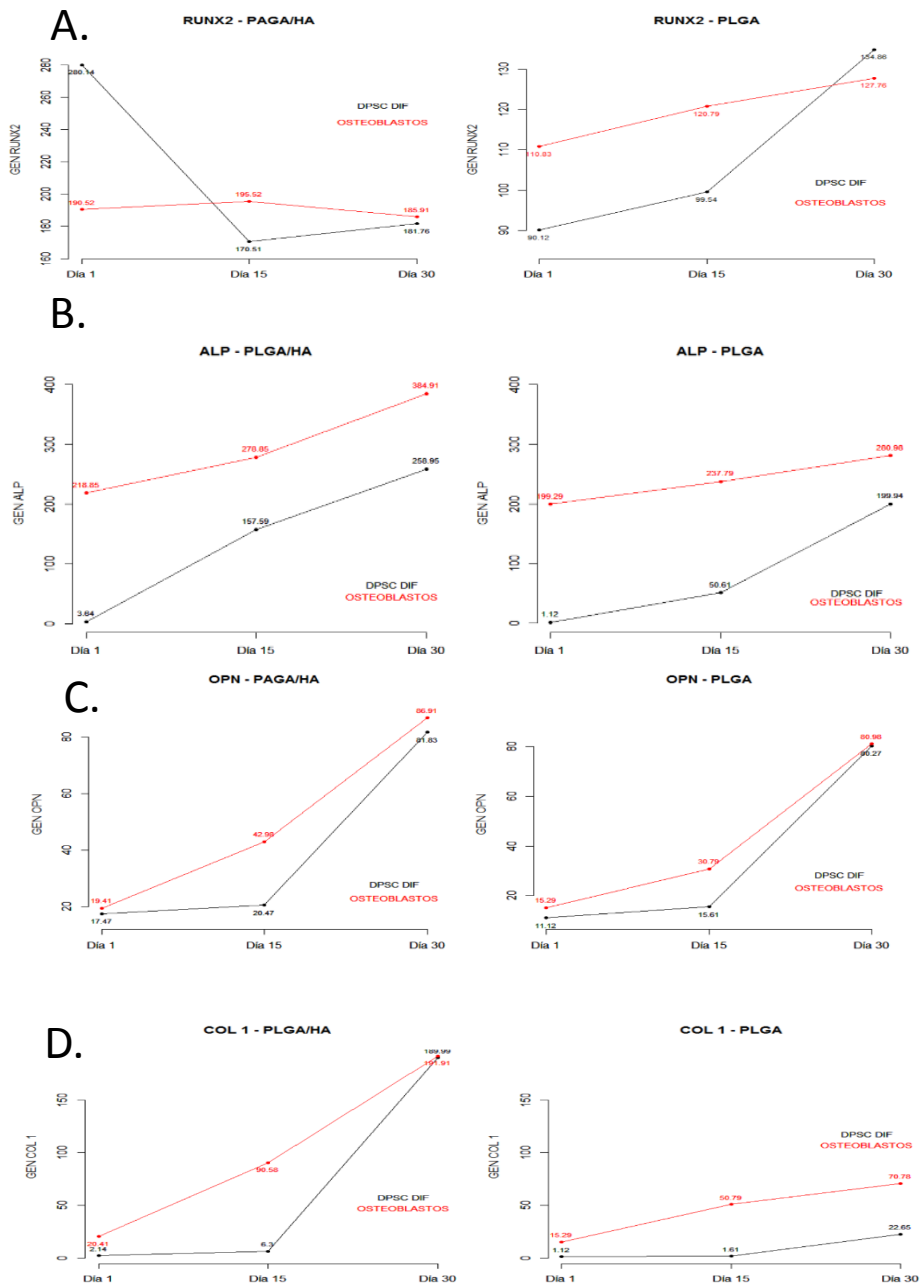
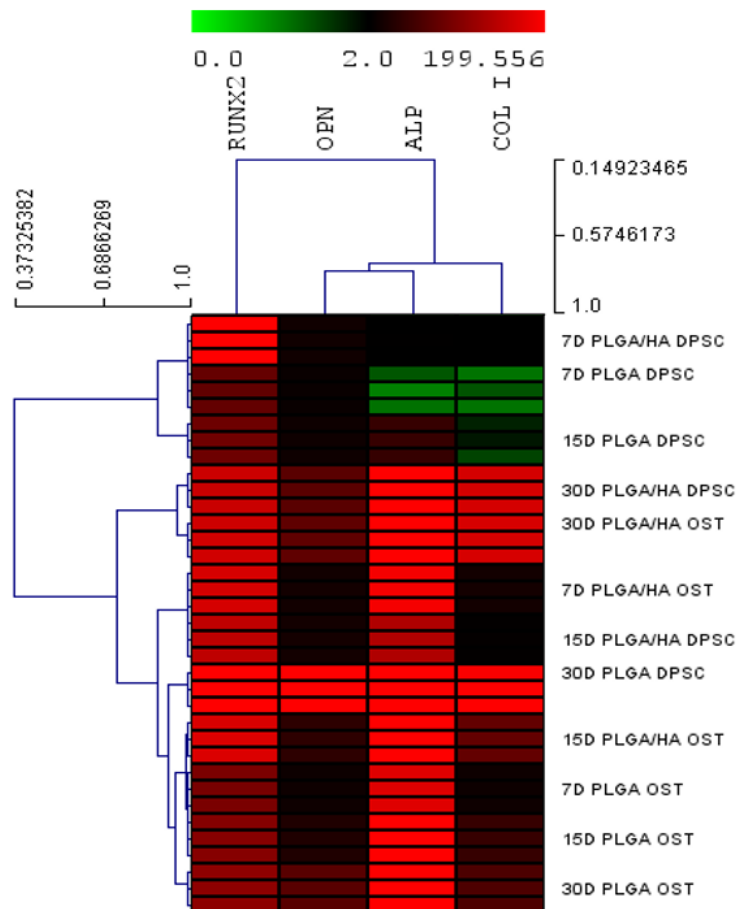


Figura 5-28. Mapa de calor: Organización jerárquica de los datos en clusters para determinar la correlación entre los 4 tipos de genes con cada una de las condiciones experimentales (tiempo, tipo de matriz y tipo de célula), es una forma de disponer los elementos en una jerarquía según la distancia o la similitud entre ellos establecida mediante coeficiente de correlación de Pearson, alto grado de similitud cuando los valores son cercanos a 1. Rojo representa altos niveles de expresión y verde bajos niveles de expresión.



Para determinar si estos resultados tienen una validez estadística y la significancia de las covariables, se realizó un análisis de varianza multivariado paramétrico, que utiliza las distancias entre cada par de observaciones en Y para obtener una matriz de distancia ($N \times N$) en la que se calcula la significancia de las variables explicativas con simulaciones de Monte Carlo.

Con el paquete Vegan del software estadístico R, se ajustó el modelo Manova semi-paramétrico con la función adonis que particiona las disimilitudes de las fuentes de variación y usa un test de permutaciones para inspeccionar la significancia de dichas particiones (Tabla 5-2)

Tabla 5-2. Salida en el software R del modelo Manova: Muestra los coeficientes estimados asociados a los componentes del modelo para los 4 genes evaluados. Bio.Material1 en la tabla hace referencia al biomaterial PLGA/HA en cual es contrastado con PLGA

```
> manova2<-adonis(GENES~Bio.Material+celula+Tiempo.días.+Bio.Material*celula
+ +Bio.Material*Tiempo.días.+celula*Tiempo.días.,data=datos)
> manova2$coefficients
```

	RUNX2	OPN	ALP	COL.I
(Intercept)	163.0718559	-9.98189093	59.2833181	-28.41114258
Bio.Material1	-72.6105503	-3.71936119	-4.0610976	27.15483500
celula1	11.5420805	-5.36879476	-115.0510935	-18.17302563
Tiempo.días.	-0.3276989	2.99728201	7.5056284	4.83054124
Bio.Material1:celula1	-7.8991472	0.78566389	-0.3167889	-0.57098333
Bio.Material1:Tiempo.días.	1.6820393	0.04583478	-1.3671489	-3.19710811
celula1:Tiempo.días.	-0.5418497	0.07182133	2.1720753	0.01089026

Posteriormente se identifican las interacciones entre las covariables para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas del grupo de genes evaluados entre las matrices en el tiempo (Tabla 5-3).

Tabla 5-3. Interacción obtenidas de las covariables con el modelo estadístico Manova semi-paramétrico en función adonis: Obsérvese los respectivos valor-p.

```
Call:
adonis(formula = GENES ~ Bio.Material + celula + Tiempo.días. + Bio.Material * celula
+ Bio.Material * Tiempo.días. + celula * Tiempo.días., data = datos)

Permutation: free
Number of permutations: 999

Terms added sequentially (first to last)
```

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Bio.Material	1	0.62286	0.62286	99.385	0.21583	0.001 ***
celula	1	0.71920	0.71920	114.757	0.24922	0.001 ***
Tiempo.días.	1	0.92308	0.92308	147.289	0.31986	0.001 ***
Bio.Material:celula	1	0.02368	0.02368	3.778	0.00821	0.038 *
Bio.Material:Tiempo.días.	1	0.10325	0.10325	16.475	0.03578	0.001 ***
celula:Tiempo.días.	1	0.31203	0.31203	49.789	0.10813	0.001 ***
Residuals	29	0.18175	0.00627		0.06298	
Total	35	2.88585			1.00000	

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

En la tabla se evidencia que todas las interacciones entre las covariables resultaron ser estadísticamente significativas. Puntualmente se evidencia que dado a un p-valor=0.001 existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de los genes RUNX2, ALP, OPN y COLI de los osteoblastos con respecto a los niveles de expresión de estos genes en las hDPSCs, esto en cuanto a la interacción células y tiempo*** (Tabla 7). Esta evidencia estadística puede relacionarse con la evidencia biológica, pues los osteoblastos humanos expresan normalmente estos genes, mientras que las hDPSCs en estado indiferenciado no los expresan, sin embargo, al ser sometidas a un proceso de osteodiferenciación, los niveles de expresión de estos genes pueden verse en este tipo celular a medida que se van comprometiendo hacia el linaje osteoblástico.

Entre la interacción material y tiempo***, se evidencia que los niveles de expresión de los 4 genes en su conjunto son mayores en el biomaterial PLGA/HA a lo largo del tiempo con respecto a los niveles de expresión de estos 4 genes en el material PLGA, independientemente del tipo de células sembrado en el biomaterial, dado a un p-valor=0.001; es decir, los niveles de expresión de los genes RUNX2, ALP, OPN y COL I en las hDPSCs y en osteoblastos son mayores cuando son sembrados en las matrices de PLGA/HA con respecto a los niveles de expresión de estos genes en las hDPSCs y osteoblastos sembrados en la matriz de PLGA. Por otra parte, se observó que dado a un p-valor=0.038 existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión génica entre las hDPSCs sembradas en PLGA/HA y las hDPSCs sembradas en PLGA. Estos resultados en su conjunto, demuestran que la diferenciación osteogénica de las hDPSCs es más eficiente en la matriz de PLGA/HA respecto a PLGA.

5.5 Estudio piloto: Comportamiento *in vivo* de hDPSCs en matrices de PLGA/HA.

5.5.1 Análisis clínico

Clínicamente durante y después de la necropsia de los conejos, no se observó ningún signo de infección y/o rechazo al injerto en ninguno de los lados intervenidos (tanto izquierdo como derecho en los ocho conejos). No se observó desplazamiento clínico de las matrices, como se demuestra en la figura 5-29 A; donde se observa clínicamente la total integración de los bordes de la matriz al hueso huésped, demostrando de este modo una osteointegración óptima de la matriz. Esta imagen fue convertida a filtro negativo con Adobe Photoshop Elements 2.0[®] para resaltar los bordes de la matriz y el hueso huésped para hacer evidente macroscópicamente la osteointegración (Figura 5-29 B).

Figura 5-29. Corte transversal de espécimen mandibular derecha. (A) Osteointegración de la matriz HA/PLGA a hueso huésped. (B) Imagen con filtro negativo procesada con Adobe Photoshop Elements 2.0[®].



Macroscópicamente la calidad ósea de los márgenes donde hubo regeneración fue mayor en el lado mandibular donde se aplicó el tratamiento (HA/PLGA + hDPSC) asemejándose a la transición de hueso inmaduro a hueso maduro en comparación del lado mandibular donde se aplicó el control (PLGA/HA) donde se observó una formación de cayo óseo (Figura 5-30).

Figura 5-30. Visualización clínica *ex vivo*. (A) HA/PLGA+hDPSC; Se aprecia disminución del diámetro del lecho quirúrgico y una transición en calidad del hueso neo formado entre hueso inmaduro y hueso maduro. (B) HA/PLGA sin células.

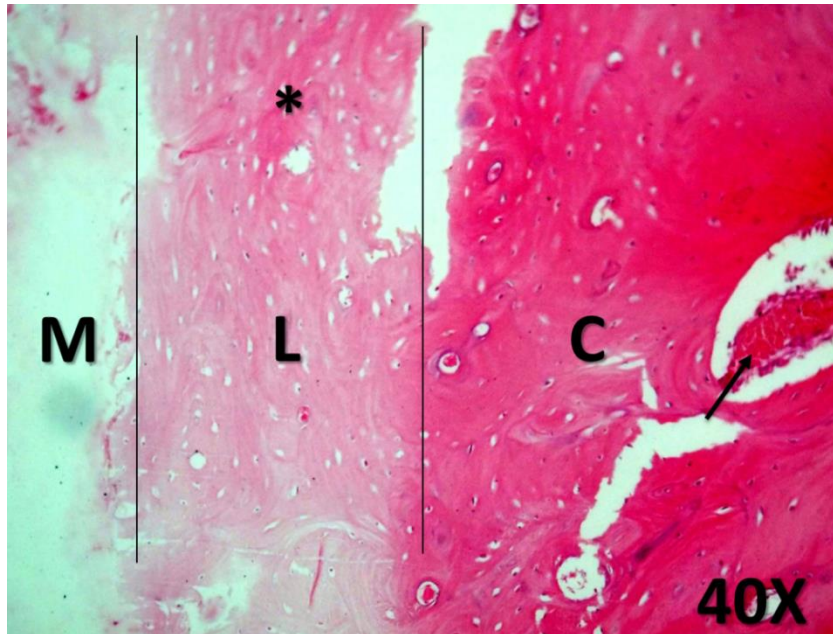


5.5.2 Análisis histológico

El análisis de los cortes teñidos con H&E se realizó bajo un aumento de 20X y 40X, los cuales en general presentaron mejor regeneración ósea en los casos que fueron tratados con HA/PLGA+hDPSC en comparación con los casos control de HA/PLGA ($p=0.002$ por prueba de Chi-Square). En ambos casos se observó una integración de transición entre el hueso regenerado a partir de la matriz y el hueso proximal huésped, observándose un tipo de hueso más laminar maduro que cancelar, en el lado tratado con matrices de HA/PLGA+hDPSCs ($p=0,001$ por prueba de Chi-Square).

No se evidenció generación de tejido cartilaginoso en ninguno de los grupos evaluados y la relación de formación de hueso estuvo concentrada en sentido proximal a medial de la matriz, por lo tanto la regeneración ósea fue centrífuga, de decir, se formó hueso de la parte más proximal de la matriz hacia la periferia, observándose la transición de hueso laminar a hueso cancelar, siendo diferentes las proporciones dependiendo del sitio quirúrgico (Figura 5-31). Tampoco, se evidenció algún tipo de calcificación en los tejidos blandos circundantes.

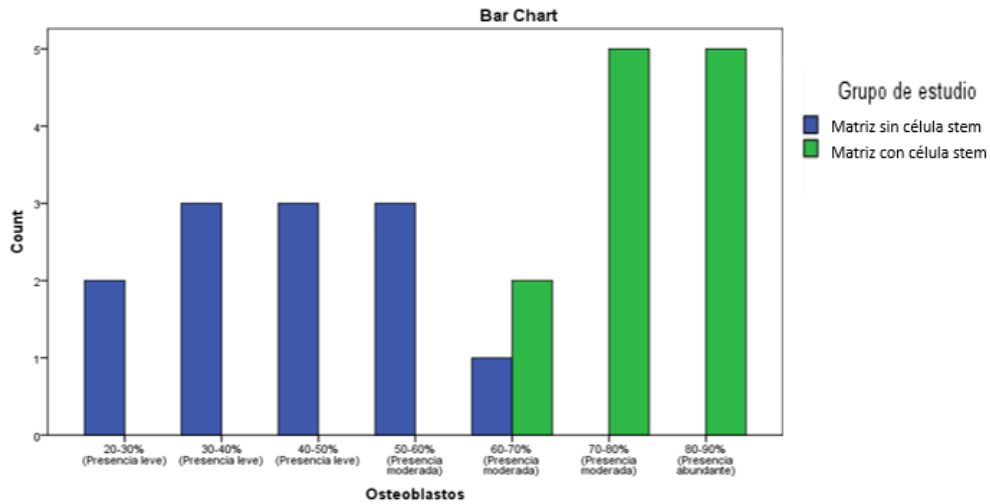
Figura 5-31. Transición de tejidos en tinción con H&E de HA/PLGA+hDPSCs a 30 días post implantada. M: Matriz de HA/PLGA+hDPSCs. L: Hueso Laminar. C: Hueso Cancelar. Flecha: Vasos sanguíneos neo formados. *Zona intermedia.



Los grupos de evaluación mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a presencia, cantidad y calidad celular de linaje óseo.

Los osteoblastos tuvieron mayor presencia en las zonas de regeneración en el lado que fue tratado con matrices de HA/PLGA+hDPSCs en comparación al lado control con matrices de HA/PLGA ($p=0,002$ por prueba de Chi-Square), los osteoblastos presentes en el zona tratada con la matriz de PLGA/HA sin células puede relacionarse con la migración celular de osteoblastos del huésped al sitio de la lesión para contribuir al proceso de reparación del tejido. Figura 5-32.

Figura 5-32. Gráfico de barras porcentaje de osteoblastos: Diferencias estadísticamente significativas en presencia de osteoblastos entre grupos a 4 semanas post tratamiento $p=0,002$ por prueba de Chi-Square.



También, se observaron procesos de angiogénesis tras las formaciones de diferentes capilares y vasos sanguíneos en todas las láminas evaluadas, sin embargo, fue mayor la presencia de estos procesos angiogénicos en el grupo tratado con matrices de HA/PLA+hDPSCs en comparación con el grupo tratado con matrices de HA/PLGA sin células ($p=0,001$ por prueba de Chi-Square) (Figuras 5-33 y 5-34).

Figura 5-33. Gráfico de barras Vasos Sanguíneos. Diferencias estadísticamente significativas en presencia de vasos sanguíneos entre grupos a 4 semanas post tratamiento $p=0,001$ por prueba de Chi-Square.

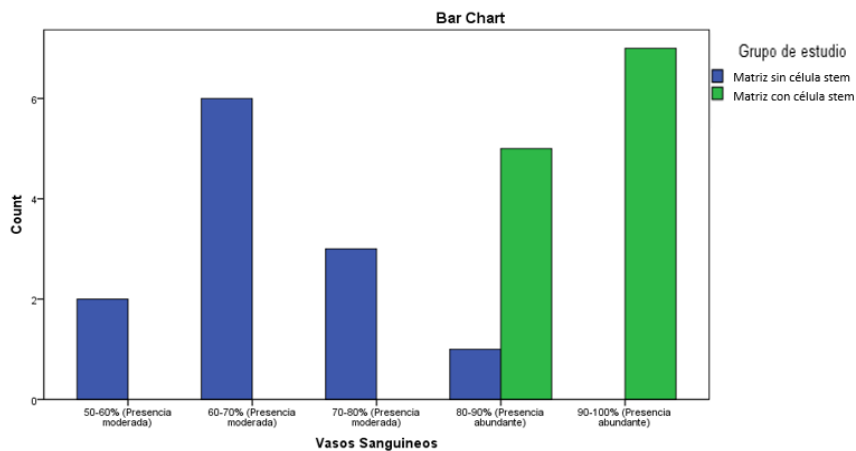
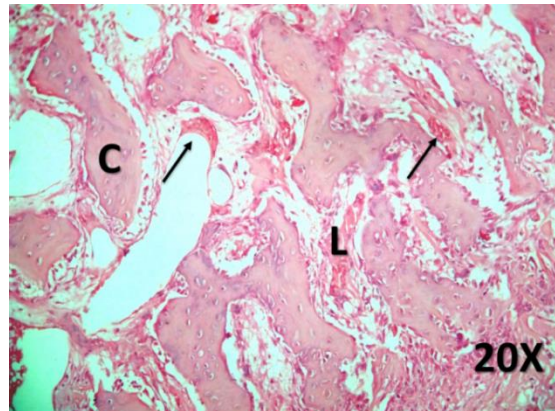
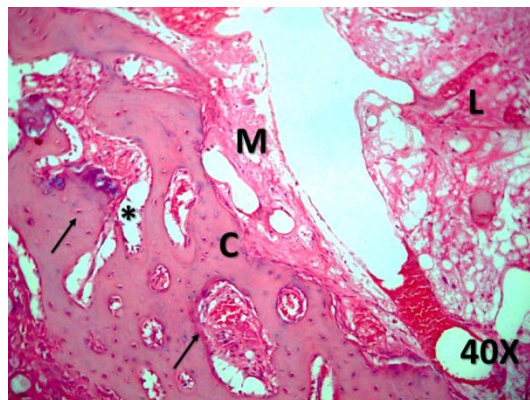


Figura 5-34. Tinción con H&E del constructo HA/PLGA a 30 días post implantada a 20X. L: Hueso laminar. C: Hueso Cancellar. Flecha: Vasos sanguíneos neo formados.



A nivel de osteoclastos no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, esto posiblemente debido a que en ambos grupos la presencia no superaba el 40%, niveles que reflejan el papel de los osteoclastos en el proceso de remodelado óseo o resorción del biomaterial de HA/PLGA en las zonas que fueron injertadas. En ambos casos se observó una leve presencia de tejido inflamatorio ($p=1,00$ por prueba exacta de Fisher), en donde no hubo diferencias estadísticamente significativas, esto debido al proceso de cicatrización que se estaba generando en ambos grupos del estudio, Figura 5-35.

Figura 5-35. Tinción con H&EHA/PLGA+hDPSCs a 30 días post implantada a 40X. M: Matriz de HA/PLGA+hDPSCs. L: Hueso laminar. C: Hueso Cancellar. Flech



6. Discusión

Enfoques terapéuticos actuales para la sustitución de tejido óseo, han incluido el uso de injertos (autólogo, homólogos, heterólogos) y biomateriales pero aún no han mostrado resultados completamente satisfactorios (129). Por lo tanto la ingeniería de tejidos principalmente en relación con defectos óseos de tamaño crítico, es una estrategia prometedora que implica: el uso de células osteogénicas sembradas en soportes tridimensionales que mimeticen la matriz extracelular ósea y una investigación progresiva en el diseño de estos soportes para la regeneración tisular. Considerando los principios básicos de la ingeniería de tejidos, es indispensable lograr una precisión y coordinación entre las respuestas de las células con el biomaterial y con las moléculas de señalización biológica, para que coincida con el proceso de la regeneración dinámica del tejido; esto es esencial, dado que las células responden de una manera heterogénea a la superficie de diferentes biomateriales.

La importancia de los constructos tridimensionales que mimetizan la matriz extracelular puede ser disertada desde dos diferentes aspectos que son a su vez relacionados entre sí. En primer lugar, existen estudios que han tratado de comprender los mecanismos de adhesión, proliferación, migración y diferenciación de las células en constructos tridimensionales (20–24); estas y otras multitudinarias respuestas celulares se rigen de las complejas señales físicas y químicas del entorno circundante que abarcan diferentes escalas de longitud, de lo macro a lo nano, mecanismos que actualmente son poco conocidos. Comprender estas interacciones puede tener profundas implicaciones en el eventual control y programación de diversas funciones celulares. Esto nos lleva al segundo aspecto; correspondiente al resultado del comportamiento de las células sembradas en los constructos tridimensionales una vez han sido implantadas en el sitio

de la lesión del paciente (25). En este contexto, este estudio realizó una comparación del comportamiento *in vitro* de células stem mesenquimales de pulpa dental humana en dos tipos de constructos tridimensionales (PLGA y PLGA/HA). En ellas se evaluó la capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación hacia linaje osteogénico en 3 diferentes tiempos; 7, 15 y 30 días, con el objetivo de evaluar como las características químicas y físicas de cada uno de estos constructos influye de manera directa sobre el comportamiento celular, puntualmente como ocurren los mecanismo de adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica de células stem mesenquimales de origen dental en constructos de una sola fase polimérica y un biocompuesto de fase polimérica y cerámica, por otra parte; se implantó constructos con células stem mesenquimales de pulpa dental humana en lesiones óseas mandibulares de tamaño crítico en el modelo animal de conejos Nueva Zelanda, para evaluar el comportamiento de estas células una vez implantadas en el sitios de la lesión.

Teniendo en cuenta los conceptos básicos de la ingeniería de tejidos ósea, es fundamental la elección del material, considerando las propiedades del hueso. Anteriores estudios *in vitro* han destacado que la porosidad y el alto peso molecular del PLGA ofrecen tanto características de compatibilidad biomecánica como celular, haciéndolo un sustituto osteogénico potencial para el uso en esta disciplina (130,131). Tayton *et al* 2012 demostró en su estudio el potencial de los polímeros sintéticos como sustitutos alogénicos en la ingeniería de tejidos ósea, empleando constructos tridimensionales de PLGA con células stem mesenquimales humanas (130). Sin embargo, autores como Lichte *et al* 2011 han reportado que este polímero puede llegar a presentar una desventaja; ser propenso a deformación por un mecanismo denominado arrastre porque tiende a tener un módulo de elasticidad bajo, por esto se ha creído necesario reforzar los soportes de PLGA con una fase cerámica y se emplee como biocompuesto en la ingeniería de tejidos ósea. Diferentes estudios como los de Niemeyer 2004, Ayala R *et al* 2011, Shor 2007, han reportado tener mejoras en la capacidad de compresión de cargas, mayor bioactividad y una mejor interacción entre huésped e implante (74–77). Estos hallazgos reportados, crearon la necesidad de comparar el comportamiento de células potencialmente osteogénicas sembradas en dos tipos de constructos (PLGA y PLGA/HA). En este estudio, los dos tipos de soportes fueron sintetizados con el mismo método de congelado/liofilizado, método que ha demostrado satisfacer la porosidad, el

tamaño de poro ideal y la interconectividad que debe tener un soporte para la infiltración celular, viabilidad y función (Figuras 5-10, 5-11, 5-12, 5-13) como lo reportó Raman *et al* 2005 (68).

Las células potencialmente osteogénicas que fueron sembradas en los dos tipos de constructos de este estudio fueron células stem adultas mesenquimales humanas. En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios para definir las células stem mesénquimas humanas (hMSC); 1) éstas células deben ser adherentes en cultivo; 2) expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45; 3) deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condición estándar de cultivo (79–81).

En este estudio las células stem mesenquimales fueron de origen dental, obtenidas de pulpa dental humana. Tras el proceso de caracterización, se observó que estas células son adherentes en cultivo, presentan morfología fibroblastoide y tienen la capacidad de formar unidades formadoras de colonia. En la inmunofenotipificación expresaron los antígenos CD 73+ en un 73,04,32%, CD105+ en un 98.32%, CD90+ en un 73,39,79% del total del número de eventos adquiridos, además no expresaron el antígeno CD34 y presentaron una muy baja expresión de CD45 comparada con la expresión de este marcador en los controles. Además exhiben un tiempo de doblaje poblacional similar a células stem mesenquimales de médula ósea (87). En la diferenciación *in vitro* en cultivo monocapa, tras la estimulación con el medio de diferenciación osteogénica, después de 15 días de cultivo, expresaron RUNX2, lo que demuestra que estas células posiblemente se comprometieron a un linaje osteoblástico, ya que este gen regula el proceso de diferenciación (49,105). Estos hallazgos en conjunto demuestran, que las células obtenidas del tejido pulpar son células stem mesenquimales, pues cumplen los criterios mínimos es establecidos por la ISCT (79).

Las hDPSCs fueron empleadas en este estudio por su fácil obtención y además, según lo reportado por Huang *et al* 2009, Gronthos *et al* 2000, Park *et al* 2012, Struys *et al* 2013 y Graziano 2008 (15,16,132–134) tienen un alto potencial de diferenciación *in vitro* e *in vivo* a linaje osteoblástico. Davies OG *et al* 2014 y Lee SH *et al* 2010 han reportado que las hDPSCs tienen mayor capacidad de mineralización ósea comparadas con otras fuentes

de células stem mesenquimales como medula ósea y tejido adiposo, demostrando de este modo que las hDPSCs son células prometedoras para regeneración de tejido óseo.

Posterior a la caracterización de los dos tipos de constructos (PLGA y PLGA/HA) y de las hDPSCs, estas fueron sembradas en los dos tipos de biomateriales y se evaluó la adhesión, proliferación y la capacidad de diferenciación a linaje osteoblástico en tres diferentes tiempos; 7, 15 y 30 días. Para evaluar cada una de estas variables se realizaron tres replicas experimentales independientes y se emplearon como control negativo hDPSCs sembradas en los dos tipos de constructos (PLGA y PLGA/HA) con medio completo de cultivo y osteoblastos humanos sembrados en los dos tipos de constructos (PLGA y PLGA/HA) como control positivo.

Para la evaluación de proliferación celular se sembraron hDPSCs en cada uno de los constructos de PLGA y de PLGA/HA bajo dos condiciones; 12 matrices de PLGA+hDPSCs estimuladas con medio de diferenciación osteogénicas y 12 matrices de PLGA/HA+hDPSCs con medio completo de cultivo. Por cada tiempo de lectura de absorbancia para medir la reducción del colorante (1, 7, 15, 30 días) se hicieron triplicados, protocolo empleado por D'Antò *et al* 2013 (24). En los resultados se encontró que los valores de reducción de resazurina aumentaron a través del tiempo, lo que indica que hay viabilidad y proliferación celular en ambos tipos de matrices, sin embargo se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ellas (p -valor=0), en donde se observó mayor proliferación de las hDPSCs en las matrices de PLGA/HA en medio completo de cultivo y con medio de diferenciación osteogénica, estos resultados permiten inferir que los soportes de PLGA/HA permiten una mejor proliferación que los soportes de PLGA. Estos resultados son compatibles con los reportados por Karadzic I *et al* 2015, donde evaluaron la proliferación de células stem de dientes deciduos (SHEDs) en matrices de hidroxiapatita natural, PLGA/HA, alginato/HA, acetato de vinilileno/HA y Bio-oss y se demostró que la proliferación celular fue mayor en las matrices de PLGA/HA al cabo de 30 días (135). Por otra parte, se evidenció que las células que se encontraban en proceso de osteodiferenciación exhibieron valores de proliferación más bajos con respecto a las células en medio completo de cultivo, este evento concuerda con lo reportado en la literatura, donde durante la diferenciación los genes que potencian la

proliferación se encuentra reprimidos y de este modo la proliferación disminuya durante el proceso de diferenciación (107,136).

La morfología y la adhesión de las hDPSCs sembradas en los dos tipos de biomateriales a los 3 diferentes tiempos con y sin medio de diferenciación osteogénica y los osteoblastos sembrados en las mismas condiciones, fueron evaluadas a través de microscopia electrónica de barrido (MEB); se observó que las hDPSCs en matrices de PLGA y PLGA/HA con y sin medio de diferenciación osteogénica se adhirieron a los constructos en los 3 tiempos, sin embargo estas células experimentaron un cambio morfológico evidente en las microfotografías. Las hDPSCs presentaron prolongaciones citoplasmáticas correspondientes a filopodios y estructuras vesiculares sobre la superficie celular compatibles con vesículas de la matriz; estas estructuras y la morfología celular son típicas en células stem que se someten a procesos de diferenciación osteogénica e indican el comienzo de la formación de la matriz extracelular ósea (137).

El fenómeno inicial de la mineralización se visualizó a los 7 días de cultivo con medio de diferenciación osteogénica en las hDPSCs sembradas en matrices de PLGA/HA y a los 15 y 30 días fue incrementando la cantidad de vesículas de la matriz, además se observó una posible mineralización de la matriz extracelular comparadas con las hDPSCs sembradas en PLGA, en la que a los 30 días de cultivo se observaron estas estructuras vesiculares, pero la matriz no parece ser mineralizada. Esto sugiere que las hDPSCs en las matrices de PLGA/HA posiblemente se diferenciaron a osteoblastos más rápidamente que las hDPSCs sembradas en PLGA.

Estos hallazgos son similares a los reportados por Arahira T y Todo M en el 2014, en el que evaluaron el efecto de la proliferación y diferenciación de células stem mesenquimales en matrices tridimensionales de colágeno/fosfato tricálcico β , ellos observaron por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) a 14 días de cultivo de células stem mesenquimales con medio de cultivo osteogénico la aparición de estructuras esféricas sobre las células compatibles con vesículas de la matriz y nódulos de mineralización producidos por los osteoblastos diferenciados a partir de hMSCs. A los 21 días de cultivo se observó una capa sobre la estructura de la matriz extracelular consistente con fibrillas de colágeno (136). Las estructuras esféricas, se asociaron a

vesículas de la matriz por tener un diámetro de 40 a 200nm y porque se ha considerado que desempeñan un rol fundamental en el proceso de la calcificación ósea (127,128,136).

Los resultados encontrados en la RT-qPCR mostraron que todos los niveles de expresión de los marcadores osteoblásticos evaluados RUNX2, ALP, OPN y COL I eran más altos en las hDPSCs osteodiferenciadas en matrices de PLGA/HA comparados con los de las hDPSCs sembradas y osteodiferenciadas en matrices de PLGA, resultados que sugieren que el proceso de diferenciación de estas células en biocompuestos de PLGA/HA es más rápido en comparación con PLGA (p -valor=0,038), no obstante, según lo encontrado en el mapa de calor y en las gráficas de perfiles de cada gen, hubo una alta correlación entre los niveles de expresión de los marcadores osteoblástico evaluados entre hDPSCs osteodiferenciadas en PLGA/HA con los osteoblastos sembrados en matrices de PLGA/HA al cabo de 30 días de cultivo.

Se conoce, que el proceso de diferenciación de células stem mesenquimales a osteoblastos maduros ocurre en diferentes etapas; en donde primero se da una proliferación de las células stem mesenquimales, luego estas se diferencian a pre-osteoblastos hasta ser osteoblastos maduros. Debemos considerar que todas las células que se encuentra en estado pre-osteoblástico abarcan todas las células que se encuentran en transición de progenitoras a osteoblastos maduros y por definición son heterogéneas. Sin embargo, cuando estas células expresan RUNX2, se considera como la primera evidencia en el proceso de diferenciación a fenotipos mineralizados (48,49,105,108). En este estudio, en los resultados de RT-qPCR se encontró expresión de RUNX2 por parte de las hDPSCs sembradas en las matrices de PLGA/HA y PLGA con medio de diferenciación osteogénica a los 7 días de cultivo, por este hallazgo podemos considerar que estas células son pre-osteoblastos. No obstante, cuando las células proliferan e inician un aumento en la síntesis de proteínas asociadas a la organización y maduración de la matriz extracelular, expresan colágeno tipo I y fosfatasa alcalina. El colágeno tipo I es considerado el marcador más temprano que expresan los osteoblastos maduros y la fosfatasa alcalina es una proteína que participa y regula la proliferación, migración y diferenciación (33,48,49,108,138). Estos resultados son evidentes 7 días después de cultivar las hDPSCs en matrices de PLGA/HA con medio de

diferenciación osteogénica, lo que sugiere que estas células podrían ser osteoblastos maduros pues expresan RUNX2, COLI, ALP y OPN a diferencia de las hDPSCs en matrices de PLGA que posiblemente se encuentran en etapa pre-osteoblástica a 7 días de cultivo, debido a que solo expresan RUNX2 y OPN proteína que asocia con procesos de adhesión ente célula y substrato.

Durante la diferenciación osteoblástica, una vez sintetizada la matriz extracelular, esta debe ser mineralizada, esta tercera etapa se encuentra caracterizada por la expresión del factores de transcripción como osterix (OSX) que se ve comprometido en la vía de señalización para la expresión de proteínas involucradas en la deposición del mineral óseo entre las que se encuentran implicadas la osteopontina, osteocalcina, sialoproteína ósea y la fosfatasa alcalina (97,107,108). Este fenómeno es confirmado mediante la sobre expresión de ALP, COL I, OPN y RUNX2 en las hDPSCs sembradas en la matriz de PLGA/HA a los 15 y 30 días de cultivo con medio de diferenciación osteogénica. No obstante, estos resultados obtenidos por RT-qPCR concuerdan con los hallazgos encontrados en las microfotografías por MEB, con la visualización de nódulos de mineralización, fibrillas de colágeno y vesículas de la matriz.

Las vesículas de la matriz se refieren a pequeños cuerpos esféricos de 20 a 200nm que se observan en la matriz pre-mineralizada de hueso, cartílago y dentina. Estos parecen estar sobre la bicapa lipídica de la célula y a menudo se encuentran asociados con pequeños cristales de fosfato de calcio (127,128). Diferentes análisis de estas estructuras han reportado que estas derivan de las membranas citoplasmáticas de células que mineralizan tejidos como los osteoblastos, condroblastos, odontoblastos y ameloblastos, pero la membrana de estas estructuras tienen una composición diferente de la que derivan, son ricas en varios fosfolípidos, especialmente fosfatidilcolina (lípidos con alta afinidad al calcio), en anexinas, fosfatasa alcalina, colágeno, pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP1), calbindina D9K. (127,128,139,140), fundamentales en el proceso de mineralización.

La mineralización se da en dos etapas: primero se da la formación de cristales de hidroxiapatita en el interior de las vesículas de la matriz, en donde lípidos como la fosfatidilcolina y proteínas como la sialoproteína y la calbindina D9K, promueven la

acumulación de calcio dentro de las vesículas de la matriz y por medio de las anexinas que funcionan como canales transportadores de calcio. El fosfato inorgánico es provisto por el cotrasportador Na/Pi III, que se encuentra en la membrana de las vesículas de la matriz y por la fosfatasa citosólica. Cuando la acumulación de calcio y fosforo excede el punto de solubilidad para el fosfato de calcio, éste se deposita en forma de hidroxiapatita en el interior de las vesículas. En la segunda etapa, el cristal de hidroxiapatita penetra la pared de la membrana de la vesícula y se elonga dentro del espacio extracelular de la matriz. El fluido extracelular, en este caso el medio de diferenciación osteogénico contiene suficiente calcio y fosforo inorgánico para soportar la continua formación de cristales de hidroxiapatita, función que lleva a cabo el β glicerofosfato (111). Los cristales de hidroxiapatita se propagan en acúmulos alrededor de las vesículas de la matriz rellenando el espacio entre las fibrillas de colágeno presentes en la matriz ((23,111,127,128,139). En este estudio, estos eventos se evidencia en las microfotografías obtenidas por MEB a los 15 y 30 días de cultivo de las hDPSCs en matrices de PLGA/HA con medio de diferenciación osteogénica y con las de hDPSCs en matrices de PLGA en donde inicia este proceso más tardío después de 30 días de cultivo.

Se puede concluir que el comportamiento *in vitro* de las hDPSCs en matrices de PLGA y PLGA/HA en cuanto a la adhesión, morfología, proliferación y diferenciación osteogénica discrepan entre sí, según la evidencia estadística y experimental estos procesos son más eficaces en la matriz de PLGA/HA. Las características de la superficie de una fase polimérica y del biocompuesto como; el nivel de hidratación, la tensión superficial, la carga superficial y la topografía tienen una gran influencia sobre la adhesión y proliferación celular (22,26,136). Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que los andamios empleados fueron diseñados adecuadamente, con morfología de superficie, lo que permite la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Por otra parte, la aparición de estructuras similares a vesículas de la matriz en las hDPSCs sembradas en matrices de PLGA/HA con medio completo de cultivo, puede sugerir que este biocompuesto es bio-activo y posee un efecto osteinductor por la presencia de hidroxiapatita.

Durante mucho tiempo se ha demostrado que la hidroxiapatita tiene un potencial osteoconductor, es decir, que tiene la capacidad de soportar la proliferación y la adhesión celular, pero no induce a las células stem mesenquimales a diferenciarse como lo reporta Zhou J *et al* 2011 (141). Sin embargo, algunos estudios *in vitro* e *in vivo* afirman que la hidroxiapatita también es osteoinductiva (32,120,142), Lin *et al* 2009 señala el potencial de la hidroxiapatita para inducir la expresión de genes como fosfatasa alcalina, osteocalcina y colágeno tipo I en células stem pluripotentes de ratón (32).

En el tejido óseo humano, la ALP es un producto de la actividad de los osteoblastos y en estudios *in vitro* se libera en el medio durante su maduración. Esta enzima es un marcador bioquímico para la caracterización fenotípica de los osteoblastos, mineralización ósea y diferenciación. Karadzic *et al* 2015, reportó un estudio en el que evalúa la adhesión, proliferación y diferenciación celular de células stem mesenquimales de dientes deciduos en exfoliación (SHEDs) en constructos tridimensionales de hidroxiapatita (HA), PLGA/HA, Alginato/HA, acetato de vinilileno/HA y Bio-oss. Los resultados encontrados fueron que la adhesión, proliferación y la actividad fosfatasa alcalina fue mejor en los constructos de PLGA/HA, sin embargo, los resultados en la matrices de alginato/HA incluso en hidroxiapatita sola demostraron adhesión celular, proliferación y diferenciación.

Por lo tanto, hay muchos constructos, incluidos los de nuestro estudio, que presentan buena biocompatibilidad y podrían reemplazar los materiales utilizados actualmente en la ingeniería de tejidos. En resumen, los materiales demostraron ser capaces de brindar las características necesarias para la diferenciación, adhesión y proliferación celular, sin embargo, se necesitan investigaciones *in vivo* que puedan servir de base para la obtención de nuevos tejidos sintetizados *in vitro* mediante ingeniería de tejidos ósea.

Dado los resultados reportados por este estudio y por otros estudios realizados recientemente (120,135), se realizó un estudio piloto *in vivo* de lesiones mandibulares de tamaño crítico en el modelo animal conejos Nueva Zelanda, en el que se tomaron 8 conejos realizándoles lesiones bilaterales, en donde en un lado se puso el constructo sin células y en el otro lado el constructo con hDPSCs, en los resultados clínicos después de 30 días de haber realizado la cirugía se encontró en la lesión que contenía las hDPSCs

en la matriz de PLGA/HA una notoria regeneración ósea comparada con el lado contrario con el constructo de PLGA/HA sin células. En los resultados histológicos se encontró la formación de nuevos vasos sanguíneos, se observó un tejido de transición entre el hueso regenerado a partir de la matriz y el hueso proximal del huésped, observándose un tipo de hueso más cancelado maduro que laminar en el lado tratado con matrices de HA/PLGA+hDPSCs ($p=0,001$).

No se evidenció generación de tejido cartilaginoso en ninguno de los grupos evaluados y la relación de formación de hueso estuvo concentrada en sentido proximal a medial de la matriz, observándose la transición de hueso laminar a hueso cancelado, siendo diferentes las proporciones dependiendo del sitio quirúrgico (Figura 5-31). Tampoco, se evidenció algún tipo de calcificación en los tejidos blandos circundantes. Los osteoblastos tuvieron mayor presencia en las zonas de regeneración en el lado tratado con matrices de HA/PLGA+hDPSCs en comparación al lado control con matrices de HA/PLGA ($p=0,002$). Estos resultados demuestran que el biocompuesto de PLGA/HA es biocompatible a mediano plazo, con capacidad osteogénica, osteoinductiva y potencializa la vascularización del tejido regenerado. Estos resultados coinciden con los reportados por Tayton *et al* 2013, en el que evaluó el comportamiento *in vivo* de células stem de médula ósea en matrices de PLGA/HA (90% PLGA/ 10%HA) (143). Sin embargo, hacen falta más estudios en los que se evalué con más detalle el comportamiento de las hDPSCs *in vivo* en este tipo de biocompuesto, pues los resultados obtenidos hasta ahora son prometedores para hacer uso de este biocompuesto en la medicina y odontología regenerativas.

7. Conclusiones

- En este estudio se demostró la capacidad de diferenciación a linaje osteoblástico de células stem de pulpa dental humana, se observó un tiempo de doblaje poblacional rápido según nuestros resultados y lo reportado en la literatura, además son células que expresan genes de pluripotencia como SOX2, OCT4 y Nanog. Estas características demuestran que este tipo de células stem mesenquimales son una excelente fuente de obtención para emplearlas en regeneración ósea.
- El comportamiento *in vitro* de las hDPSCs en los dos tipos de constructos fue significativamente diferente, siendo el constructo de PLGA/HA el que proporcionó mejores señales físicas y químicas por su composición y características topográficas, lo que permitió una mejor adhesión, proliferación y diferenciación de linaje osteoblástico.
- El constructo de PLGA/HA cargado con células, después de ser implantado en lesiones óseas de tamaño crítico demostró una excelente capacidad de regeneración, pues se observó formación de vasos sanguíneos, hueso medular y hueso cancelar en el sitio de la lesión. Estos resultados sugieren que las hDPSCs y los constructos de PLGA/HA son una alternativa promisorio para la regeneración de lesiones óseas de tamaño crítico en mandíbula.
- Es necesario realizar más estudios alrededor de estos tipos de materiales tanto *in vitro* como *in vivo*, pues existen variables que aún no se han estudiado como pruebas mecánicas y físicas del material con y sin células.

A. Anexo: Consentimiento informado

Documento de Consentimiento Informado para pacientes a quienes se invita a participar en la investigación:

Comportamiento *in vitro* de células stem mesenquimales de origen dental humano en matrices extracelulares tridimensionales para regeneración ósea

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- **Información sobre el estudio**
- **Formulario de Consentimiento para firmar si está de acuerdo en participar**

PARTE I: Información

Introducción

Como Odontóloga estudiante de maestría en odontología e investigadora del proyecto, le invito a participar en el estudio que está realizando la Universidad Nacional de Colombia. Para decidir si desea colaborar con la investigación usted recibirá una explicación detallada por parte mía. Si no entiende alguna palabra o procedimiento que se va a realizar con gusto estaré atenta a resolver cualquier duda, o puede tomarse su tiempo para averiguar y ampliar la información hasta que quede satisfecho con la explicación.

Tipo de Intervención de Investigación

Esta investigación incluirá la recolección de dientes deciduos o dientes permanentes con indicación de extracción por razones de tratamiento ortodoncia ya sean premolares o terceros molares erupcionados o incluidos.

Participación Voluntaria

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no como donante de sus dientes extraídos. Usted puede cambiar de opinión cuando lo desee y dejar de participar aun cuando haya aceptado participar antes del procedimiento en el proyecto.

Riesgos

No existe ningún riesgo, efecto secundario o molestia asociada a la investigación, ya que todo se realizará sobre el o los dientes ya extraídos.

Beneficios

Puede que por participar como donante no haya beneficio para usted, pero es probable que su participación nos ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación. Puede que no haya beneficio para la sociedad en el presente estado de la investigación, pero es probable que generaciones futuras se beneficien.

Incentivos

Participar como donante de sus dientes no le representará ninguna retribución económica

A quién Contactar

Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio.

Para inquietudes comunicarse a los siguientes números de teléfono o cuentas de correo:

JUAN CARLOS MUNEVAR
munevarjuan@gmail.com
tel 6489000 ext: 1158

JOSE MANUEL GONZALEZ
josmgonzalezc@unal.edu.co
tel 3165000 ext: 16015

NURY TATIANA JIMENEZ
ntjimenezo@unal.edu.co
Cel: 3118186910

Parte II: Formulario de consentimiento

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE DIENTES HUMANOS

(Otorgado en cumplimiento de la ley 35 de 1989)

NOMBRE DEL PACIENTE _____

FECHA _____ CIUDAD _____

1. Yo, _____ identificado como aparece al pie de mi firma, en mi calidad de paciente (u otra calidad informada) _____ por medio del presente documento, y en pleno uso de mis facultades mentales, otorgo en forma libre mi consentimiento a los Doctores: JUAN CARLOS

MUNEVAR Y JOSE MANUEL GONZALEZ , para que por su intermedio y por el concurso de su estudiante a cargo TATIANA JIMENEZ ORTEGON hagan uso de él (los) diente(s) _____ para practicar pruebas de laboratorio con fines académicos.

2. Autorizo que a condición que no se mencione el nombre del paciente, los resultados del estudio puedan ser utilizados con fines de enseñanza, investigación y divulgación científica.
3. Certifico que se me ha informado que la participación en este estudio es voluntaria, respetándose la voluntad de aceptación a rehusar la donación de mis dientes y el retiro de los mismos en cualquier momento del estudio.
4. Certifico que he leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como donante.

FIRMA DEL PACIENTE
(Representante legal)
C.C.

FIRMA DEL ODONTOLOGO
C.C.

Si el paciente no tiene la capacidad de hacer lectura y/o firma del documento, debe hacerlo un testigo elegido por el paciente.

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

FIRMA DEL TESTIGO
C.C.

B. Anexo: Acuerdo de confidencialidad

Yo, Nury Tatiana Jiménez Ortegón mayor de edad y vecina de Bogotá, identificada con cédula de ciudadanía No. 53.067.988 expedida en Bogotá, en mi condición de candidata a maestría en odontología, he aceptado formalmente trabajar en el proyecto **“Comportamiento *in vitro* de células stem mesenquimales de origen dental humano en matrices extracelulares tridimensionales de ácido poliláctico/poliglicólico con y sin hidroxiapatita”** dentro del “Grupo de Investigación “GERONDONTOLOGÍA” de la Universidad Nacional de Colombia. Por tal razón, consciente de que en el desarrollo de mi trabajo podré usar información privilegiada previamente lograda, propiedad de la Universidad y con características y usos potenciales promisorios, y que igualmente, es posible que en mi trabajo se alcancen resultados e informaciones de interés para el futuro del proyecto de investigación, me comprometo a manejar de manera confidencial los resultados y demás información relativa a mi trabajo de grado, atendiendo especialmente lo consignado en las siguientes cláusulas:

1. Aplicar el manejo de confidencial a toda la información que se me suministre con esas características como insumo para el desarrollo del trabajo y extender ese tratamiento a los resultados alcanzados, reportándolos solamente al director del trabajo.
2. No emplear la información relacionada con mi trabajo, o cualquiera otra referida al proyecto de investigación, en beneficio propio o de terceros mientras conserve sus características de confidencialidad o mientras sea manejada como un secreto empresarial.
3. Informar clara y lealmente si en cualquier momento en el desarrollo del trabajo surgen intereses de mi parte que riñan con el interés de la Universidad. Se entiende por tal cualquiera intención más allá del ámbito académico que entre en conflicto con los intereses económicos o sociales que pudieren derivarse de la aplicación de los resultados de investigación. El acatamiento de este punto no

implica necesariamente rompimiento del acuerdo si no reordenamiento de la relación.

4. Aceptar que cualquier publicación relacionada con el trabajo de investigación requiere autorización que deberá tramitar ante el director del trabajo, presentando el texto a publicar con un mes de antelación a la fecha en que se desea enviar a edición. Las anotaciones o correcciones del director y/o del comité revisor deberán ser atendidas sin objeciones y se relacionarán exclusivamente con información confidencial o susceptible de protección. Esta previsión deberá aplicarse igualmente al texto que constituirá el trabajo o tesis de grado.
5. Informar inmediatamente al director sobre cualquiera hallazgo o innovación alcanzada en el desarrollo de mi trabajo, y a colaborar con mi mayor diligencia en la documentación y declaración de lo hallado y a mantener sobre todo ello los compromisos de confidencialidad requeridos y necesarios.
6. Fijar como vigencia del presente acuerdo el tiempo de ejecución del trabajo y cinco años más después de concluido. No obstante, si la Universidad requiriese ampliar ese plazo sobre alguna de la información que llegue a conocer, aceptaré una ampliación por el mismo término con tan sólo se me notifique por correo electrónico.

Los compromisos y derechos aquí previstos se encuentran regulados por la legislación, los reglamentos y la doctrina vigente en Colombia, como es posible confrontar en: la Ley 23 de 1982, Decisión 351 CAN, Circular 06 de 2002 DNDA, artículo 308, Ley 599 de 2000, Ley 256 de 1996, Decisión 486 de la CAN, Tit. XVI, Acuerdo 035 de 2003 C.A.

En constancia y refrendación de lo declarado suscribo libremente el presente acuerdo, a los 16 días del mes de Noviembre de 2012, en la ciudad de Bogotá.



Nombre: Nury Tatiana Jiménez Ortegón

Cédula: 53.067.988 de Bogotá

C. Anexo: Aprobación comité de ética



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

CIE-0208-12

Bogotá D.C., viernes, 07 de diciembre de 2012

Doctor
DIEGO BETANCOURT
Facultad de Odontología
Universidad Nacional de Colombia
Sede Bogotá

Apreciado Doctor:

Cordialmente le informo que el Comité de Ética en Investigación Odontológica, de la Facultad de Odontología, en su sesión del 03 de Diciembre de 2012, Acta 0-20, luego de revisar el proyecto titulado "COMPORTAMIENTO IN VITRO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE ORIGEN DENTAL HUMANO EN MATRICES EXTRACELULARES TRIDIMENSIONALES DE ÁCIDO POLILÁCTICO/POLIGLICÓLICO CON Y SIN HIDROXIAPATITA" que será realizado por la estudiante Nury Tatiana Jimenez Ortegón, emitió el concepto de **APROBADO**, dado que el proyecto cumple con todos los requerimientos éticos y metodológicos.

Cordialmente,

PAULA ALEJANDRA BALDIÓN ELORZA
Directora del Centro de Investigación y Extensión
Facultad de Odontología

8. Bibliografía

1. Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Compos Sci Technol*. 2005 Dec;65(15-16):2385–406.
2. Olmarker K. The bone and joint decade 2000-2010. *European Spine Journal*. 1998;7(4):269.
3. Boskey a L. Musculoskeletal disorders and orthopedic conditions. *JAMA*. 2001 Mar 7;285(5):619–23.
4. Arango J, Uribe J. Análisis retrospectivo de historias clínicas de pacientes intervenidos por cirugía maxilofacial en el Hospital General de Medellín. *CES* 2012;20(2):17–21.
5. Dequil E. Avances en el manejo de heridos en combate en el hospital militar central de bogotá, colombia. Experiencia del Hospital Militar Central. *Rev Med*. 2006;14(49):116–21.
6. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2004 Dec 15;362(1825):2821–50.
7. Wu S, Liu X, Yeung KWK, Liu C, Yang X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng R Reports*. 2014 Jun;80:1–36.
8. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006 Jan;(174):249–82.
9. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007 Jun;25(6):1384–92.

10. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294–301.
11. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211–28.
12. Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Nishikawa S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Dev Growth Differ*. 2013 Apr;55(3):309–18.
13. Jurgens WJFM, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res*. 2008 Jun;332(3):415–26.
14. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004 Jan;22(4):625–34.
15. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625–30.
16. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009 Sep;88(9):792–806.
17. Karaöz E, Demircan PC, Sağlam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol*. 2011 Oct;136(4):455–73.
18. Shi S, Robey PG, GS. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone Res*. 2001;29:532–9.
19. Tanner KE. Bioactive ceramic-reinforced composites for bone augmentation. *J R Soc Interface*. 2010 Oct 6;7 Suppl 5(June):S541–57.
20. Sujatha G, Sinha A, Singh S. Cells behaviour in presence of nano-scaffolds. *J Biomed Nanotechnol*. 2011 Feb;7(1):43–4.
21. Ayala R, Zhang C, Yang D, Hwang Y, Aung A, Shroff SS, et al. Engineering the cell-material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation. *Biomaterials*. 2011 May;32(15):3700–11.

22. Wang W, Ma N, Kratz K, Xu X, Li Z, Roch T, et al. The influence of polymer scaffolds on cellular behaviour of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012 Jan;52(2-4):357–73.
23. Arahira T, Todo M. Effects of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on compressive mechanical behavior of collagen/ β -TCP composite scaffold. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Nov;39:218–30.
24. D'Antò V, Raucci MG, Guarino V, Martina S, Valletta R, Ambrosio L. Behaviour of human mesenchymal stem cells on chemically synthesized HA-PCL scaffolds for hard tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 May 31;52(2-4):357–73.
25. Huebsch N, Mooney DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009 Nov 26;462(7272):426–32.
26. Das RK, Zouani OF. A review of the effects of the cell environment physicochemical nanoarchitecture on stem cell commitment. *Biomaterials*. 2014 Jul;35(20):5278–93.
27. Rose FRAJ, Oreffo ROC. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(1):1–7.
28. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(24):4353–64.
29. Mistry AS, Mikos AG. Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2005 Jan;94:1–22.
30. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(23):2405–12.
31. Boccaccini AR, Blaker JJ. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2005 May;2(3):303–17.
32. Lin L, Chow KL, Leng Y. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2009 May; 89(2):326–35.
33. Polini A, Pisignano D, Parodi M, Quarto R, Scaglione S. Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PLoS One*. 2011 Jan;6(10):e26211.
34. Gemini-Piperni S, Takamori ER, Sartoretto SC, Paiva KBS, Granjeiro JM, de Oliveira RC, et al. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: A closer look at cell-biomaterial interface. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Jun 27; 2(3):303–17

35. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* 2009 Jul;15(7):757–65.
36. Schmidmaier G, Capanna R, Wildemann B, Beque T, Lowenberg D. Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options? *Injury.* 2009 Dec;40 Suppl 3:S39–43.
37. Elsalanty ME, Genecov DG. Bone grafts in craniofacial surgery. *Craniofacial Trauma Reconstr.* 2009 Oct;2(3):125–34.
38. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2:S96–101.
39. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res.* 2014 Jan;9(1):18.
40. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010 Dec;224(12):1329–43.
41. Athanasiou VT, Papachristou DJ, Panagopoulos A, Saridis A, Scopa CD, Megas P. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. *Med Sci Monit.* 2010 Jan;16(1):24–31.
42. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discov Today.* 2014 Jun;19(6):781–6.
43. Das RK, Zouani OF. A review of the effects of the cell environment physicochemical nanoarchitecture on stem cell commitment. *Biomaterials.* 2014 Jul;35(20):5278–93.
44. Hoggatt J, Scadden DT. The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2012 Sep 4;122(9):3029–34.
45. Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2010 Feb 5;6(2):103–15.
46. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Dev Cell.* Elsevier; 2004 Apr 4;6(4):483–95.
47. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):349–55.

48. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Jan;13(1):27–38.
49. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol.* 2000 Dec;20(23):8783–92.
50. Marie PJ. Signaling pathways affecting skeletal health. *Curr Osteoporos Rep.* 2012 Sep;10(3):190–8.
51. Wang C, Meng G, Zhang L, Xiong Z, Liu J. Physical properties and biocompatibility of a core-sheath structure composite scaffold for bone tissue engineering in vitro. *J Biomed Biotechnol.* 2012 Jan;2012:579141.
52. Zouani OF, Chanseau C, Brouillaud B, Bareille R, Deliane F, Foulc M-P, et al. Altered nanofeature size dictates stem cell differentiation. *J Cell Sci* 2012 Mar 1125(Pt 5):1217–24.
53. Romagnoli C, D'Asta F, Brandi ML. Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2013 Sep;10(3):155–61.
54. Liu Y, Lim J, Teoh SH. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology Advances.* 2013. p. 688–705.
55. Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett.* 2011 Jun;33(6):1257–64.
56. Li Z, Gong Y, Sun S, Du Y, Lü D, Liu X, et al. Differential regulation of stiffness, topography, and dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2013 Oct;34(31):7616–25.
57. Asti A, Gioglio L. Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *Int J Artif Organs.* 2014 Mar;37(3):187–205.
58. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2000 Dec;21(23):2347–59.
59. Liu Y, Lim J, Teoh S-H. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv. Elsevier Inc.;* 2013;31(5):688–705.

60. Puska M, Aho AJ, Vallittu PK. [Biomaterials in bone repair]. *Duodecim*. 2013 Jan;129(5):489–96.
61. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*. 2004. p. 743–65.
62. Lin L, Gao H, Dong Y. Bone regeneration using a freeze-dried 3D gradient-structured scaffold incorporating OIC-A006-loaded PLGA microspheres based on β -TCP/PLGA. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Jan;26(1):5327.
63. Doğan A, Demirci S, Bayir Y, Halici Z, Karakus E, Aydin A, et al. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Nov 1;44:246–53.
64. Lao L, Wang Y, Zhu Y, Zhang Y, Gao C. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Aug;22(8):1873–84.
65. Kim S-S, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim B-S. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(8):1399–409.
66. Penk A, Förster Y, Scheidt HA, Nimptsch A, Hacker MC, Schulz-Siegmund M, et al. The pore size of PLGA bone implants determines the de novo formation of bone tissue in tibial head defects in rats. *Magn Reson Med*. 2013 Oct [;70(4):925–35.
67. Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury*. 2011 Jun [cited 2015 Jan 5];42(6):569–73.
68. Raman H. An organic bovine hydroxyapatite- plga composites for bone tissue. 2005; .University of Kentucky Master's Theses.Paper 201
69. Wang P, Zhao L, Liu J, Weir MD, Zhou X, Xu HHK. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone Res*. Nature Publishing Group; 2014 Sep 30;2:14017.
70. Willmann G. Ceramic femoral head retrieval data. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Oct;(379):22–8.
71. Walter WL, Kurtz SM, Esposito C, Hozack W, Holley KG, Garino JP, et al. Retrieval analysis of squeaking alumina ceramic-on-ceramic bearings. *J Bone Joint Surg Br*. 2011 Dec;93(12):1597–601.
72. Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomater*. 2008 May;4(3):638–45.

-
73. Tanner KE. Bioactive ceramic-reinforced composites for bone augmentation. *J R Soc Interface*. 2010 Oct 6;7 Suppl 5(Suppl_5):S541–57.
 74. Niemeyer P, Krause U, Fellenberg J, Kasten P, Seckinger A, Ho AD, et al. Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2004 Jan;177(2):68–78.
 75. Ayala R, Zhang C, Yang D, Hwang Y, Aung A, Shoff SS et al. Engineering the cell-material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation. *Biomaterials*. 2011;32:3700–11.
 76. Shor L, Güçeri S, Wen X, Gandhi M, Sun W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions *in vitro*. *Biomaterials* . 2007 Dec;28(35):5291–7.
 77. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(18):3413–31.
 78. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014 Jan;9(1):18.
 79. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Jan;8(4):315–7.
 80. Gonçalves R, Lobato da Silva C, Cabral JMS, Zanjani ED, Almeida-Porada G. A Stro-1(+) human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system. *Exp Hematol*. 2006 Oct;34(10):1353–9.
 81. Tan S-L, Ahmad TS, Selvaratnam L, Kamarul T. Isolation, characterization and the multi-lineage differentiation potential of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*. 2013 Apr;222(4):437–50.
 82. Chatzinikolaidou M, Rekstyte S, Danilevicius P, Pontikoglou C, Papadaki H, Farsari M, et al. Adhesion and growth of human bone marrow mesenchymal stem cells on precise-geometry 3D organic–inorganic composite scaffolds for bone repair. *Mater Sci Eng C*. 2015 Mar;48:301–9.
 83. Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimble JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Jan 68(4):315–7.

84. Cuenca-López MD, Andrades JA, Gómez S, Zamora-Navas P, Guerado E, Rubio N, et al. Evaluation of posterolateral lumbar fusion in sheep using mineral scaffolds seeded with cultured bone marrow cells. *Int J Mol Sci.* 2014 Jan;15(12):23359–76.
85. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807–12.
86. Estrela C, Alencar AHG de, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J.* 2011 Jan;22(2):91–8.
87. Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schäfer R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* 2013 Jan;11:146.
88. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent.* 2009 Jan;33(4):289–94.
89. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* Jan;364(9429):149–55.
90. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005 Aug;8(3):191–9.
91. Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, et al. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;60 Suppl 7:167–75.
92. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, et al. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng Part A.* 2011 Apr;17(7-8):1015–26.
93. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006 Jan;1:e79.
94. Mouli C, Kumar M. Stem Cells in Dentistry- A Review . 2012;4(3):1872–6.
95. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008 Mar; 34(2):166–71.

-
96. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528–34.
 97. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*. 1994 Jan 15;8(2):133–46.
 98. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*. 1994 Jan;8(2):133–46.
 99. Weng S, Fu J. Synergistic regulation of cell function by matrix rigidity and adhesive pattern. *Biomaterials*. 2011 Dec;32(36):9584–93.
 100. Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, Khademhosseini A. Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. *Biomaterials*. 2012 Jul;33(21):5230–46.
 101. Lam J, Segura T. The modulation of MSC integrin expression by RGD presentation. *Biomaterials*. 2013 May;34(16):3938–47.
 102. Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*. 2008 Sep 1;135(17):2969–79.
 103. Wang X, Harris RE, Bayston LJ, Ashe HL. Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature*. 2008 Sep 4;455(7209):72–7.
 104. Zouani OF, Chanseau C, Brouillaud B, Bareille R, Deliane F, Foulc MP et al. Altered nanofeature size dictates stem cell differentiation. *J Cell Sci*. 2012;125:1217–24.
 105. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, et al. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp*. 2004 Jan;14(1-2):1–41.
 106. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*. 2000 Aug;21(4):393–411.
 107. Yang X, Tare RS, Partridge K a, Roach HI, Clarke NMP, Howdle SM, et al. Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J Bone Miner Res*. 2003 Jan;18(1):47–57.

108. Kim J, Jeong SY, Ju YM, Yoo JJ, Smith TL, Khang G, et al. In vitro osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells on a poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)-bladder submucosa matrix (BSM) composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater*. 2013 Mar;8(1):014107.
109. Phillips JE, Gersbach C a, Wojtowicz AM, García AJ. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci*. 2006 Mar 1;119(Pt 3):581–91.
110. Mikami Y, Takahashi T, Kato S, Takagi M. Dexamethasone promotes DMP1 mRNA expression by inhibiting negative regulation of Runx2 in multipotential mesenchymal progenitor, ROB-C26. *Cell Biol Int*. 2008 Feb;32(2):239–46.
111. Hamade E, Azzar G, Radisson J, Buchet R, Roux B. Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro. *Eur J Biochem*. 2003 May;270(9):2082–90.
112. Xiao G, Cui Y, Ducy P, Karsenty G, Franceschi RT. Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Mol Endocrinol*. 1997 Jul;11(8):1103–13.
113. Caplan MR, Shah MM. Translating biomaterial properties to intracellular signaling. *Cell Biochem Biophys*. 2009 Jan;54(1-3):1–10.
114. Kam LC, Shen K, Dustin ML. Micro- and nanoscale engineering of cell signaling. *Annu Rev Biomed Eng*. Annual Reviews; 2013 Jan 17;15:305–26.
115. Rahmany MB, Van Dyke M. Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. *Acta Biomater*. 2013 Mar;9(3):5431–7.
116. De la Rica R, Matsui H. Applications of peptide and protein-based materials in bionanotechnology. *Chem Soc Rev*. The Royal Society of Chemistry; 2010 Sep 18;39(9):3499–509.
117. Filareto A, Parker S, Darabi R, Borges L, Iacovino M, Schaaf T, et al. An ex vivo gene therapy approach to treat muscular dystrophy using inducible pluripotent stem cells. *Nat Commun*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2013 Jan 5;4:1549.
118. Zambuzzi WF, Bruni-Cardoso A, Granjeiro JM, Peppelenbosch MP, de Carvalho HF, Aoyama H, et al. On the road to understanding of the osteoblast adhesion: cytoskeleton organization is rearranged by distinct signaling pathways. *J Cell Biochem*. 2009 Sep 1;108(1):134–44.
119. López ME, Echavarría A, Suárez R, Herrera N. Hidroxiapatita macroporosa obtenida en la Universidad de Antioquia: síntesis, caracterización y comparación

- con el hueso esponjoso y calcinado de bovino. Rev Fac Ing Univ Antioquia. Universidad de Antioquia; 2003;(30):109–24.
120. Danoux CB, Barbieri D, Yuan H, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Habibovic P. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. *Biomatter*. 2014 Jan;4:e27664.
 121. Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, Martínez S, Planell JA, Ginebra MP. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alpha-TCP paste. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3671–80.
 122. Saito E, Kang H, Taboas JM, Diggs A, Flanagan CL, Hollister SJ. Experimental and computational characterization of designed and fabricated 50:50 PLGA porous scaffolds for human trabecular bone applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Aug;21(8):2371–83.
 123. Martínez B, Muñoz L, Pellejero L, Gil T. Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados Bone composition study for an appropriate regeneration with implanted materials. 2006;4(3):202–7.
 124. Zeng XB, Hu H, Xie LQ, Lan F, Jiang W, Wu Y, et al. Magnetic responsive hydroxyapatite composite scaffolds construction for bone defect repair. *Int J Nanomedicine*. 2012 Jan;7:3365–78.
 125. Vohra S, Hennessy KM, Sawyer A a, Zhuo Y, Bellis SL. Comparison of mesenchymal stem cell and osteosarcoma cell adhesion to hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Dec;19(12):3567–74.
 126. You R, Li X, Liu Y, Liu G, Lu S, Li M. Response of filopodia and lamellipodia to surface topography on micropatterned silk fibroin films. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Dec;102(12):4206–12.
 127. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*. 1995 May;(314):266–80
 128. Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci*. 2005 Jan 1;10:822–37.
 129. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*. 2007 Oct;28(29):4240–50.
 130. Tayton E, Fahmy S, Purcell M, Aarvold A, Smith JO, Kalra S, et al. An analysis of polymer type and chain length for use as a biological composite graft extender in impaction bone grafting: a mechanical and biocompatibility study. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Dec;100(12):3211–9.

131. Tayton E, Purcell M, Aarvold A, Smith JO, Kalra S, Briscoe A, et al. Supercritical CO₂ fluid-foaming of polymers to increase porosity: a method to improve the mechanical and biocompatibility characteristics for use as a potential alternative to allografts in impaction bone grafting? *Acta Biomater.* 2012 May;8(5):1918–27.
132. Park B-W, Kang E-J, Byun J-H, Son M-G, Kim H-J, Hah Y-S, et al. In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. *Differentiation.* Elsevier; 2012 Jun;83(5):249–59.
133. Struys T, Ketkar-Atre a, Gervois P, Leten C, Hilkens P, Martens W, et al. Magnetic resonance imaging of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *Cell Transplant.* 2013 Jan;22(10):1813–29.
134. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008 Jan;4(1):21–6.
135. Karadzic I, Vucic V, Jokanovic V, Debeljak-Martacic J, Markovic D, Petrovic S, et al. Effects of novel hydroxyapatite-based 3D biomaterials on proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2015 Jan;103(1):350–7.
136. Arahira T, Todo M. Effects of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on compressive mechanical behavior of collagen/ β -TCP composite scaffold. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014 Nov;39:218–30.
137. Bjerre L, Bünger CE, Kassem M, Mygind T. Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds. *Biomaterials.* 2008 Jun;29(17):2616–27.
138. Petit A, Yao G, Rowas S Al, Gawri R, Epure L, Antoniou J, et al. Effect of synthetic link N peptide on the expression of type I and type II collagens in human intervertebral disc cells. *Tissue Eng Part A.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2011 Apr 22;17(7-8):899–904.
139. Garcés-Ortíz M, Ledesma-Montes C, Reyes-Gasga J. Presence of matrix vesicles in the body of odontoblasts and in the inner third of dentinal tissue: a scanning electron microscopic study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013 May;18(3):e537–41.
140. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Metab.* 2014 Jul 6; 29(17):2616–27
141. Zhou J, Xu C, Wu G, Cao X, Zhang L, Zhai Z, et al. In vitro generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen-hydroxyapatite layered scaffolds. *Acta Biomater.* 2011 Nov;7(11):3999–4006.

142. Balaji Raghavendran HR, Puvaneswary S, Talebian S, Raman Murali M, Vasudevaraj Naveen S, Krishnamurthy G, et al. A comparative study on in vitro osteogenic priming potential of electron spun scaffold PLLA/HA/Col, PLLA/HA, and PLLA/Col for tissue engineering application. PLoS One. 2014 Jan;9(8):e104389.
143. Tayton E, Purcell M, Aarvold A, Smith JO, Briscoe A, Kanczler JM, et al. A comparison of polymer and polymer-hydroxyapatite composite tissue engineered scaffolds for use in bone regeneration. An in vitro and in vivo study. J Biomed Mater Res A. 2014 Aug;102(8):2613–24.

