



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS  
TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE LA  
PULPA DENTAL EN ANDAMIOS DE ALGINATO.

*TESINA*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**CIRUJANA DENTISTA**

P R E S E N T A:

JAZMÍN REYES RICHARDS

TUTORA: Dra. JANETH SERRANO BELLO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Gracias al **Gran Misterio** que es la vida misma, por permitirme caminar sobre esta tierra en este tiempo y espacio. Gran Espíritu, que siempre me encuentre lista para dirigirme hacia ti con las manos limpias y mirada recta, que cuando la vida se desvanezca como el atardecer, mi espíritu llegue a ti sin agravio.

Gracias infinitas a mis hermosos padres, **Federico Reyes y Mavis J. Richards**, quienes me enseñaron con el ejemplo lo que en realidad importa en esta vida y me han dado un amor que no tiene fin. A ti **Araceli** que eres mi segunda madre, gracias por tanto a lo largo de estos años. Nunca podré terminarles de agradecer todo lo que me han brindado, espero poder enorgulleclos con mis esfuerzos y logros y en algún momento regresarles al menos una fracción de lo mucho que me han dado. Siempre habrá amor en mi corazón para ustedes. Este logro es también suyo, siéntanse orgullosos por que han sido ejemplares en su trabajo como padres.

Gracias a mis **hermanos** quienes han caminado junto conmigo y compartido esta vida con altibajos, pero siempre ahí para apoyarnos, levantarnos, defendernos cuando nadie más lo haría, más que hermanos, estamos conectados con el corazón. Los amo.

Gracias a mis **amigos** y las personas que tal vez ya no están pero fueron parte de mi vida en algún momento, también a la gente de tradición que sigue luchando para que nuestras raíces sigan vivas y nos regalan cantos y flores, ustedes han embelleciendo mis días de la manera más dulce.

Muchísimas gracias, a mi tutora, la **Dra. Janeth Serrano Bello** que con paciencia y siempre una sonrisa me apoyo en la realización de esta investigación e hizo de lo difícil lo fácil, sin duda no hubiese podido completar un proyecto como éste sin su ayuda. Fue un honor poder contar con su guía e impulso al igual que con la del **Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez**. Es una fortuna encontrar personas con la calidad humana que ustedes poseen.

Gracias al proyecto **UNAM-PAPIIT-IA205818** por haber proporcionado el financiamiento y darme la oportunidad de conocer y adentrarme un poco al mundo de la investigación que sin su sustento no sería posible, su papel es de suma vitalidad al igual que el de los investigadores y todos aquellos que se encargan de engrandecer a nuestra universidad con su empeño y amor a lo que hacen.

A mi querida **Facultad de Odontología** que me dio una formación profesional tan humanitaria y a aquellos docentes que realizan su trabajo con pasión, les agradezco por que fueron muchos los que me tendieron la mano, día a día me ayudaron a construir este capítulo de mi vida y me proporcionaron las herramientas para servir a la sociedad con este conocimiento específico del cual me enorgullezco por que tuve la oportunidad de aprenderlo de personas muy capaces.

Gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi alma mater, sin duda alguna quien cambió el panorama que tenía a cerca del mundo y me dio una visión universal, ampliando mis horizontes, y por esto estaré siempre en deuda. A todas las personas que forman parte de algo tan grande como lo es la universidad, gracias, de corazón a cada uno de ellos por su trabajo y dedicación.

Por mi raza hablará el espíritu.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS</b> .....	<b>7</b>
2.2.1 Células troncales .....	13
2.2.2 Andamios .....	17
2.2.3 Biomoléculas .....	25
<b>2.2 TEJIDO ÓSEO</b> .....	<b>25</b>
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>35</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	<b>38</b>
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
6.1 Objetivo general .....	38
6.2 Objetivos específicos .....	38
<b>VII. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	<b>39</b>
<b>7.1 Recursos</b> .....	<b>39</b>
7.1.1 Humanos .....	39
7.1.2 Materiales .....	39
7.1.3 Financieros .....	40
<b>7.2 Síntesis del andamio de alginato y alginato/hidroxiapatita</b> .....	<b>40</b>
<b>7.3 Caracterización celular del andamio respuesta celular</b> .....	<b>41</b>
7.3.1 Ensayo de adhesión .....	43
7.3.2 Ensayo de proliferación .....	45
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	<b>55</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>57</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la necesidad de crear novedosas estrategias para regenerar y reparar defectos óseos en el campo de las aplicaciones biomédicas a incrementado. Nuevos enfoques incluyen el diseño de andamios bioactivos naturales que imiten al tejido óseo.

En Odontología, los defectos óseos son afecciones que oscilan desde recesiones que miden milímetros hasta la resección completa de la mandíbula, y que son tratadas, por ejemplo, con hueso liofilizado, membranas o bien prótesis metálicas, que en la mayoría de los casos devuelven la función de manera limitada. Los cambios en la anatomía de la mandíbula y maxilar son de gran interés odontológico, ya que la disminución progresiva de sustancia ósea reduce la posibilidad de una efectiva rehabilitación de la función bucal, lo cual debe considerarse durante la planificación del tratamiento odontológico.

El propósito de este estudio es para evaluar el potencial de andamios de alginato con cloruro de calcio entrecruzados con hidroxiapatita para promover la adhesión y proliferación celular de células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental. Los andamios son cruciales para la ingeniería tisular ósea, ya que desde su composición y propiedades puede significativamente afectar el comportamiento de las células.

Estos andamios bioactivos tienen que poseer propiedades biofísicas adecuadas para dirigir la respuesta biológica hacia nueva formación de tejido óseo. En particular, la porosidad y tamaño de éstos juegan un papel central en el papel de la migración celular, adhesión y proliferación, incrementando la interacción entre célula-superficie del material y signos de transmisión osteogénica.

De las diferentes superficies que cada concentración de HA proporcionó, podríamos decir que se requiere una superficie con topografía superficial intermedia (30 y 40%) para promover la proliferación y adhesión celular, ni tan lisa como aquella del andamio de ALG, ni con demasiada textura como la que presenta la de 50% HA. De

los resultados previamente mencionados se puede concluir que los andamios de alginato/HA pueden ser una alternativa futura que puede funcionar como sustrato para regeneración en ingeniería tisular ósea craneofacial, aunque por supuesto falta investigación complementaria para que eventualmente estos materiales puedan ser utilizados en la clínica.

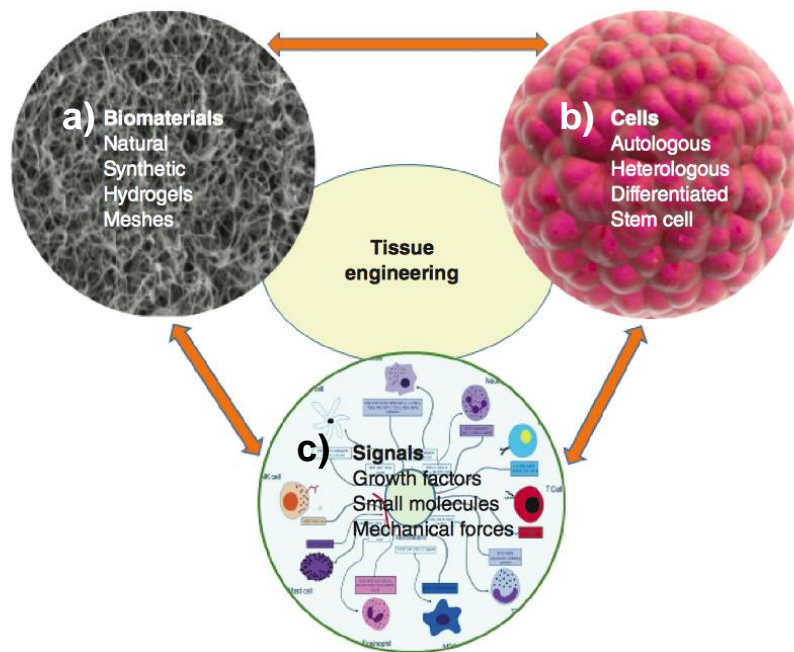
Conforme vamos utilizando enfoques de ingeniería de tejidos para aprender más sobre el comportamiento celular y fisiología, también estamos incrementando las herramientas que están disponibles para mejorar la práctica médica y quirúrgica.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS

El intercambio de tejidos es un arte ancestral, pero la bioingeniería de tejidos es un concepto nuevo. El nuevo pensamiento sobre ingeniería de tejidos está soportado por tecnologías que fueron desarrolladas durante el siglo veinte, incluyendo cultivo avanzado d células, tranferencia genética, y síntesis de materiales. <sup>1</sup>

La ingeniería tisular es una disciplina científica que comenzó aproximadamente en 1987<sup>2</sup>, cuyo objetivo es restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos, dañados o enfermos. A través de metodologías que integran conocimientos multidisciplinarios. Los elementos de los que hace uso son: los biomateriales, las biomoléculas y las células; cada uno se explicará con mayor detalle más adelante.<sup>3,2,4</sup> Fig. 1



**Figura 1** Triada en ingeniería de tejidos. La combinación de (a) biomateriales (naturales, sintéticos, hidrogeles y redes/mayas), (b) células (autólogas, heterólogas, diferenciadas y células troncales) e inductores o (c) biomoléculas (factores de crecimiento, moléculas pequeñas y fuerzas mecánicas) son utilizadas para la ingeniería de tejidos funcionales.<sup>5</sup>



La ingeniería de tejidos es un campo multi e interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida, para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido u órgano. En algunos textos, la IT es también conocida como medicina regenerativa.<sup>4</sup>

Lo que ha cambiado en la última década es lo que se espera sobre el papel que tiene y tendrá la ingeniería de tejidos en la medicina regenerativa. Esto es ilustrado por el concepto de alejarse de la investigación en regeneración de órganos completos a estructuras -y defectos- específicos “medicina regenerativa”, que incluye elementos de injertos, hueso y materiales sustitutos dentales, y dispositivos ya existentes o personalizados. Muchos, sino es que la mayoría de procedimientos de reconstrucción continúan involucrando material aloplástico o sustitutos tisulares.<sup>3</sup>

## **Implicaciones**

El proceso para la obtención de sustitutos tisulares implica: aislamiento de las células de interés, expansión en cultivo de células, la integración de las células en un biomaterial y aplicación del constructo. En la búsqueda de de la unidad mínima que garantice el mayor éxito en la regeneración, existen dos corrientes principales:

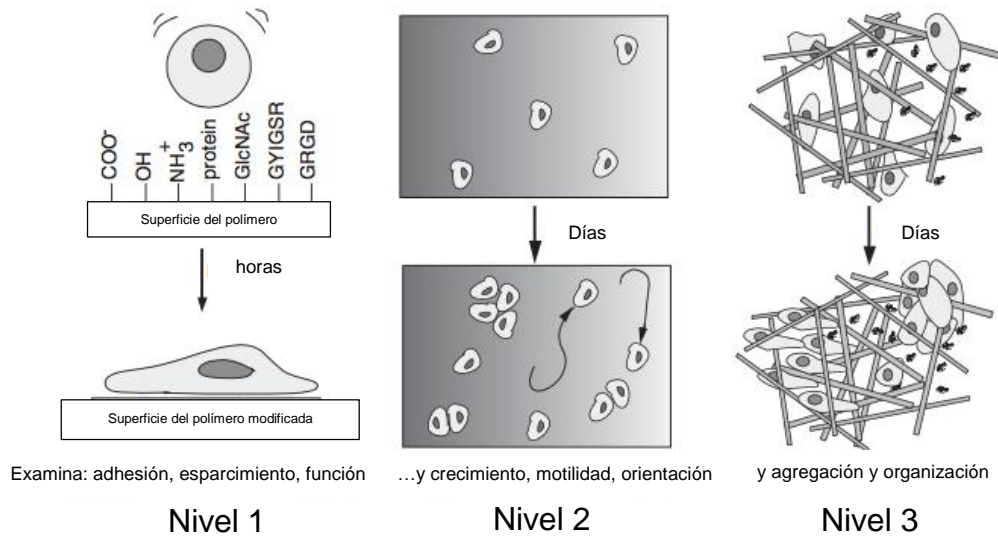
1. Sugiere la creación de tejidos artificiales en la caja de cultivo hasta que tenga las características idóneas para su inmediata aplicación al paciente
2. Propone el implante de biomateriales con células y factores o sin ellos, para que se regenere la zona dañada *in situ*.<sup>4,2</sup>

Los enfoques de la ingeniería de tejidos pueden organizarse alrededor de varios principios generales:

La ingeniería de tejidos es una extensión lógica de prácticas convencionales médicas y quirúrgicas.

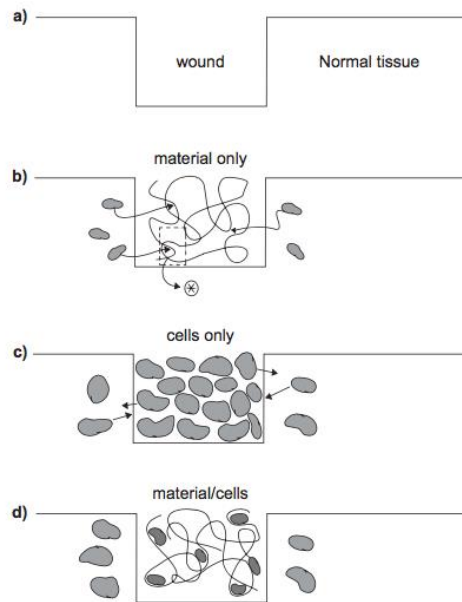
- La ingeniería de tejidos involucra control y regulación del proceso normal de curación (healing)
- La ingeniería de tejidos intenta reemplazar o suplir el componente celular de tejidos enfermos (diseased)
- La ingeniería tisular utiliza procesos celulares para controlar el suministro de fármacos
- La ingeniería de tejidos produce nuevos modelos para el estudio de la fisiología humana.<sup>1</sup>

Uno puede considerar interacciones celulares con polímeros a diferentes niveles de complejidad (fig. 2). Dentro de una dimensión, características como adhesión celular y esparcimiento celular (spreading) pueden ser examinados. En dos dimensiones, la forma y orientación de las células puede ser considerado, así como patrones de migración celular y crecimiento y respuesta de las células a gradientes superficiales. Adicionalmente, expansión hacia tres dimensiones hace disponible la observación de anisotropía estructural. Estructuras tridimensionales proveen oportunidades para la interacción celular, no disponibles en sistemas experimentales (como cultivo tradicional de células) que confinan a las células a una superficie bi-dimensional.<sup>1</sup>



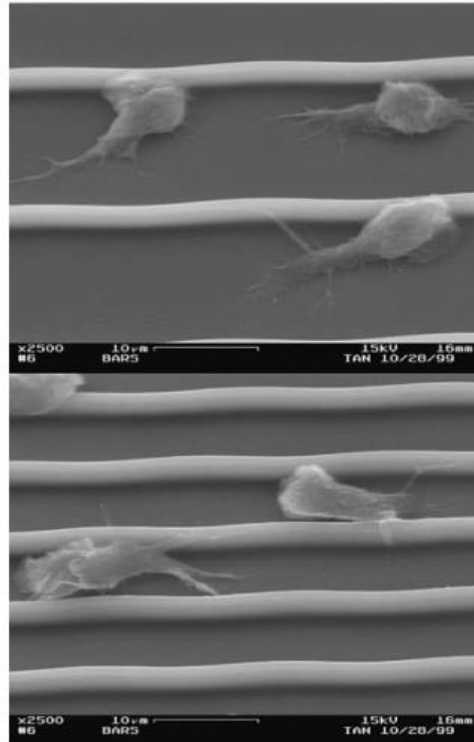
**Figura 2** Desarrollo de biomateriales poliméricos para ingeniería de tejidos. Biomateriales para la ingeniería de tejidos son caracterizados evaluando (Nivel 1) adhesión celular y dispersión celular, (Nivel 2) migración motilidad y crecimiento celular, y (Nivel 3) agregación celular y organización tisular.

Un aspecto importante de la ingeniería de tejidos es la búsqueda de métodos para controlar el proceso natural de reparación y curación de las lesiones. Ingenieros en tejidos están explorando un número de estrategias para controlar la curación; algunas de estas estrategias involucran reemplazamientos de células, algunos involucran materiales sintéticos, y otros una combinación de estos (fig. 3). Cuando solo se utilizan células, las células deben producir su propia matriz de soporte y se deben integrar al tejido existente. Cuando solo materiales son utilizados, migración de células a el área deseada es usualmente esencial para la reparación del tejido. Cuando materiales y células son utilizadas simultáneamente, haya probablemente por evolución del tejido, cultivo en construcción o una evolución de la estructura tisular in situ. Un principio básico de la ingeniería de tejidos es que el material puede proveer señales que pueden guiar el desarrollo de la estructura tisular normal. Pero, en todos los casos, procesos de curación natural son esenciales para la formación correcta de la estructura tisular.<sup>1</sup>



**Figura 3** Materiales y células para reparar el defecto tisular. Esquema del sitio de la lesión (a), mostrando la ingeniería de tejidos con solo la utilización de células (b), solo material (c), o combinación de material y células (d).

Materiales sintéticos están siendo utilizados para definir la relación entre el comportamiento celular y las propiedades del ambiente extracelular (como se encuentra ilustrado en la fig. 4. Por ejemplo, materiales sintéticos con herramientas valiosas en definir la relación entre la estructura/química de la matriz extracelular y ritmos de migración celular. Estas relaciones pueden ahora formar las bases para predecir las propiedades de materiales que serán útiles en la aplicación de ingeniería de tejidos.<sup>1</sup>



**Figura 4** Neutrófilos humanos migran a lo largo de barreras sintéticas microfabricadas. Los leucocitos humanos se orientan con respecto a características físicas que fueron producidas por técnicas de micro fabricación.

## Utilidad

El desarrollo de materiales mejorados y maneras más inteligentes de utilizar materiales existentes mejorará el cuidado de la salud humana. Nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares de la interacción de células con materiales sintéticos ha avanzado rápidamente en la última década. Este conocimiento ha llevado a un razonamiento más racional sobre el diseño de materiales y el papel de los materiales en el reemplazamiento de tejidos y la regeneración.<sup>1</sup>

Avances en un aspecto de ingeniería tisular proporcionan nuevas oportunidades en otras áreas. Conforme vamos utilizando enfoques de ingeniería de tejidos para aprender más sobre el comportamiento celular y fisiología, también estamos

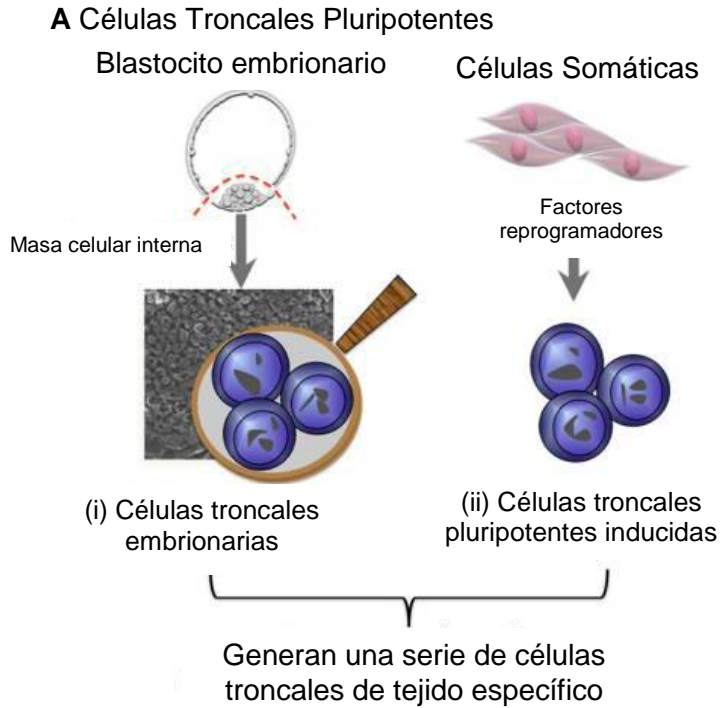
incrementando las herramientas que están disponibles para mejorar la práctica médica y quirúrgica.<sup>1</sup>

Actualmente la investigación en odontología se orienta al desarrollo de estrategias basadas en principios biológicos (ingeniería de tejidos) para la regeneración/biomineralización de estructuras dentales perdidas. El proceso de regeneración del complejo dentino-pulpar está guiado por la compleja interacción entre las células indiferenciadas de origen dental (DTSC), moléculas de señalización y biomateriales con el microambiente donde se va a restablecer.<sup>6</sup>

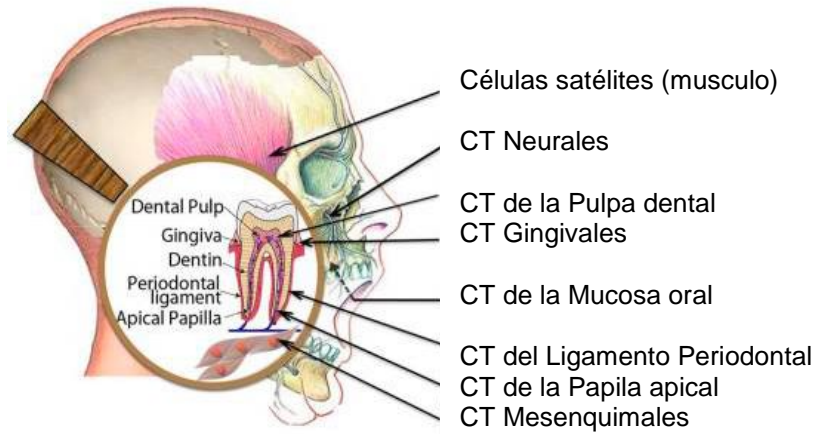
### 2.2.1 Células troncales

Las células troncales son candidatos atractivos para la ingeniería de tejidos por que tienen la capacidad de auto renovarse, dividirse constantemente y diferenciarse en células especializadas, por lo tanto, pequeñas poblaciones de células troncales pueden proliferar para proporcionar el número celular deseado dentro de un periodo de tiempo más corto. Tienen el potencial de diferenciarse en diferentes tipos de células. Células embrionarias encontradas en etapas de desarrollo tempranas son capaces de formar ilimitadamente nuevos tejidos y órganos (totipotentes). Sin embargo, debido a preocupaciones éticas y legales, su uso es controversial. Células troncales postnatales también comparten algunas de las características con las células troncales embrionarias, la principal diferencia es capacidad limitada para especializarse en diversos tipos de células (multipotentes). Como ventaja, pueden ser encontradas en algunos tejidos en cualquier etapa de la vida; por lo tanto, su uso es más accesible.<sup>6,3,7</sup> Fig. 5

Subpoblaciones de células troncales postnatales han sido encontradas en tejidos adultos, tales como médula ósea, tejido adiposo, cerebro, piel, músculo y tejidos dentales.<sup>3,6</sup>



**B Células Troncales Adultas**



**Figura 5** Tejidos especializados de los cuales los andamios regenerativos se podrían beneficiar, de cultivos y diferenciación celular, tal ves en un biorreactor.<sup>8</sup>

## **Células mesenquimales**

Otro tipo de células troncales ha sido encontrada en la médula ósea. Estas células, llamadas células troncales mesenquimales, fueron aisladas por primera vez de aspiraciones de médula por su habilidad para adherirse a superficies durante el cultivo (células troncales hematopoyéticas no se adhieren). Las células cultivadas, pueden ser inducidas para diferenciarse en adipocitos maduros, condrocitos y células óseas. Hay algunos reportes de que el potencial de desarrollo de estas células es aún mayor al de las neuronas, miocitos, y otras células pueden ser obtenidas bajo las condiciones apropiadas de inducción.<sup>1</sup>

Algunas de las células que han sido utilizadas para la ingeniería tisular craneofacial/dental son células troncales mesenquimales (MSCs) derivadas de médula ósea o adipocitos,<sup>9</sup> células troncales derivadas de la pulpa dental (DPSCs), osteoblastos diferenciados, células perivasculares, células troncales derivadas de la pulpa de dientes decíduos (SHEDs), células troncales de la papila apical (SCAPs), células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs) y células precursoras del folículo dental (DFPCs).<sup>10</sup>

## **Células troncales derivadas de la pulpa dental**

En el año 2000, Gronthos descubrió células troncales obtenidas de la pulpa de terceros molares (DPSCs). Songtao Shi identificó otros tipos de células troncales de la pulpa dental humana, obtenidas de dientes decíduos exfoliados (SHEDs) y células troncales de la papila apical (SCAPs) y del ligamento periodontal (PDLSCs).<sup>6,3</sup>

El descubrimiento de células troncales obtenidas de la pulpa de terceros molares (DPSCs) evoca una fuente importante y accesible de células indiferenciadas (células troncales mesenquimales), con el potencial para su uso mediante siembra o reclutamiento en varias terapias potenciales. Las DPSCs son altamente proliferativas y pueden especializarse en un gran número de tipos de células, como odontoblastos, fenotipos neurogénicos, osteoblastos, condrocitos y adipocitos, por



solo mencionar algunos.<sup>11</sup>

Células troncales mesenquimales derivadas del tejido dental es relativamente una nueva área de investigación que podría encontrar un papel mayor en la reparación craneofacial/dental.<sup>12</sup> Sin embargo, sigue sin determinarse si las células troncales mesenquimales de la médula ósea, adipocitos, o fuentes dentales serán más favorables para reparación de tejido craneofacial/dental.<sup>9</sup> Recientemente, constructos desarrollados solo por células (sin andamio) han sido estudiadas como una fuente potencial de células en la ingeniería de tejidos dental.<sup>13</sup>

Además, las DPSCs tienen una alta afinidad hacia la regeneración de tejidos de la región craneofacial, ya que comparten el mismo origen embriológico y con esto patrones genéticos de expresión similares.<sup>11</sup>

Las interacciones celulares con polímeros son usualmente estudiadas usando técnicas de cultivo celular. Mientras que los estudios in vitro no reproducen el amplio rango de respuestas celulares observadas seguidas de la implantación de los materiales, el ambiente de cultivo proporciona un nivel de control y cuantificación que no usualmente se obtiene in vivo. Células en cultivo son generalmente colocadas sobre la superficie del polímero y el grado de adhesión celular y dispersión en la superficie pueden ser medidos. Manteniendo el cultivo por mayores periodos de tiempo, la influencia del sustrato en la viabilidad, función, y motilidad también pueden ser determinados.<sup>1</sup>

La función celular es sensible a propiedades químicas, morfológicas y mecánicas de la superficie; por lo tanto, casi todos los aspectos de la preparación del material pueden inducir variables que se sabe tienen influencia en las interacciones celulares.<sup>1</sup>

### 2.2.2 Andamios

La asociación de los elementos clave previamente descritos deben desarrollarse en microambientes favorables, llamados andamios bioactivos. Estos microambientes deben proveer el armazón para la adhesión de las células troncales, diferenciación y proliferación guiados por moléculas morfogénicas. En adición, estos andamios deben ser adecuados para la difusión de nutrientes y oxígeno para desarrollar un tejido completamente funcional lo más natural posible.<sup>6</sup>

Andamios de materiales artificiales para la regeneración tisular craneofacial/dental pueden actuar como matriz extracelular del tejido deseado, soportando la adhesión celular, proliferación, y diferenciación de células cultivadas o huéspedes en presencia de señales biológicas.<sup>3</sup>

#### **Clasificación y tipos de andamios**

Estos andamios pueden ser utilizados en diferentes formas como sólidos porosos 3D,<sup>14,15</sup> nanofibras,<sup>16,17</sup> cemento/masilla<sup>15</sup>, entre otros. Diferentes tipos de andamios utilizados para regeneración tisular craneofacial/dental pueden ser divididos en tres clases principales: cerámicos, polímeros naturales/sintéticos y materiales compuestos.<sup>3</sup>

Los andamios pueden ser moldeados (rígidos y hechos para propósitos específicos) o inyectables (geles adaptables liberados al sitio para la regeneración tisular). Ambos pueden ser funcionales adaptando las condiciones para la adhesión celular y mejorados con señaladores morfogenéticos que suplementan las condiciones y guían la diferenciación de las células troncales.<sup>6</sup>

A pesar de los prometedores resultados logrados en cuanto a la regeneración de tejido fibrocartilagenoso, los polímeros sintéticos poseen algunas desventajas incluyendo adhesión celular limitada debido a su hidrofobicidad, y liberación de bioproductos tóxicos durante su biodegradación in vivo.<sup>11</sup>

Polímeros naturales, como el quitosano y alginato, han atraído la atención como andamios recientemente.<sup>18</sup>

La Hidroxiapatita (HA) se considera como una plantilla estructural para la fase mineral del hueso y también un importante componente mineral inorgánico. La HA, como biomaterial, es conocida por unirse químicamente de forma directa al hueso cuando se implanta. Aunque la HA ha recibido considerable atención como un andamio para la ingeniería de tejido óseo, sus propiedades limitan su uso clínico en diversas situaciones de defecto óseo. La unión con células osteoprogenitoras es fundamental para aumentar la formación ósea.

Se considera que el pH en la región afecta la velocidad de reabsorción del injerto. Cuando el pH disminuye (debido a infección), los componentes de HA se reabsorben.

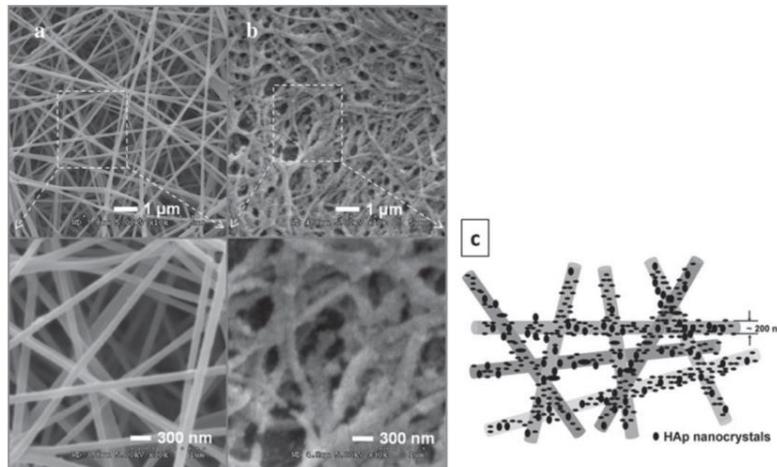
Desde hace algunos años se vienen investigando biomateriales compuestos por HA Coralina (HAP-200), carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) tipo Aragonite (proveniente de los corales marinos) y poli (acetato de vinilo). Los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de estos biomateriales indican que constituyen un buen prototipo para ser utilizado como sustituto del injerto óseo y tratar simultáneamente diferentes defectos.

Se argumenta que la HA suministra iones tales como calcio y fosfato y se fusiona con el hueso adyacente. Se utilizó ampliamente en la década de 1980, pero no indujo la remodelación ósea adecuada debido a la inflamación crónica asociada con los gránulos muy lentamente reabsorbidos, que se mantuvieron inalterables durante un período prolongado de tiempo.<sup>19</sup>

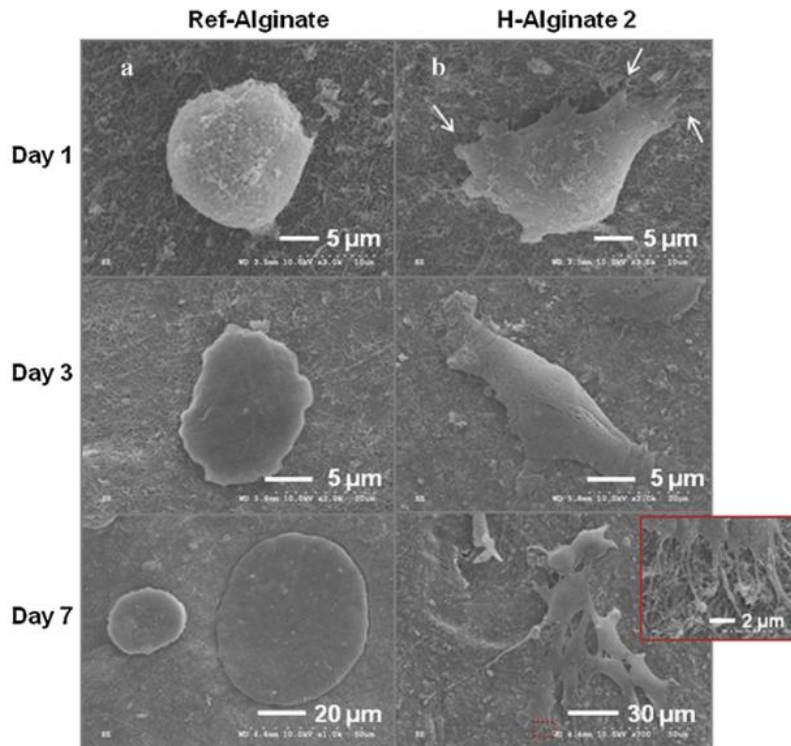
Estudios in vitro han mostrado buena adhesión de osteoblastos de rata a andamios de alginato, estando adheridas con mayor estabilidad en andamios de alginato/HA que en los de alginato.<sup>20</sup> Fig. 7

T. Chae<sup>21</sup> fabricó exitosamente andamios fibrosos nanocompuestos de alginato/HA mediante electrohilado y una síntesis in situ novedosa de HA que imita las fibras de colágeno en tejido óseo (fig. 6).<sup>20</sup>

La topografía única nano fibrilar combinada con la hibridación de la HA y el alginato puede ser ventajosa en aplicaciones médicas regenerativas de tejido óseo.<sup>21</sup>



**Figura 6** Imágenes microscópicas de a) electrohilado de alginato/HA y b) síntesis de entrecruzamiento/in situ de andamios de alginato/HA. c) ilustración de síntesis de entrecruzamiento/in situ de andamios de alginato/HA.



**Figura 7** Micrografías de cultivos de osteoblastos de rata vistas con MEB en (a) Alginato y (b) andamio entrecruzado in situ de alginato con HA por 7 día. Las flechas blancas indican células mejor adheridas que aquellas en el andamio de alginato solamente. La imagen magnificada del andamio de alginato/HA muestran múltiples filopodios (proyecciones citoplasmáticas) conectadas a la superficie en el día 7 post siembra celular.<sup>21</sup>

### Propiedades que debe tener el andamio

Los andamios son comunmente reabsorbibles y previstos para reabsorberse a un ritmo similar al de nueva formación de hueso.<sup>3</sup>

El andamio debe promover adhesión, proliferación y diferenciación celular, y debe ser biocompatible y biodegradable, y tener suficiente porosidad y resistencia mecánica para proporcionar soporte estructural.<sup>18</sup>

En este abordaje, injertos biocompatibles, porosos y tridimensionales son esenciales para imitar el microambiente nativo del tejido óseo, dándole soporte estructural y, al mismo tiempo, permitiendo transporte de nutrientes y oxígeno a las

células en crecimiento. Los injertos biomiméticos deben tener propiedades biofísicas adecuadas para promover y guiar la adhesión celular, migración, proliferación y depósito de matriz extracelular (MEC) en tres dimensiones.<sup>5</sup>

Polímeros biodegradables. Después de la implantación, los polímeros biodegradables lentamente se degradan y luego se disuelven. Esta característica puede ser importante para muchas aplicaciones en ingeniería de tejidos, ya que el polímero desaparecerá conforme el tejido funcional se regenere. Por esta razón, interacciones de células con una variedad de polímeros biodegradables han sido estudiados. Polímeros biodegradables podrían proporcionar un nivel adicional de control sobre las interacciones celulares: durante la degradación del polímero, la superficie del polímero es constantemente renovada, proporcionando un sustrato dinámico para la adhesión y crecimiento celular.<sup>1</sup>

### **Andamios de alginato**

Los alginatos son bloques lineales de co-polímeros no ramificados. Su origen natural y proceso simple de extracción de biomasa de alga marina café, asociada con sus características de biocompatibilidad y biodegradación bajo condiciones fisiológicas, hacen al alginato ideal para aplicaciones de bioingeniería de tejidos.<sup>5</sup>

El biopolímero alginato deriva de algas o es producido por bacterias. Desde su descubrimiento de 1881, ha sido altamente aplicado en la industria farmacéutica y de comida. Hidrogeles hechos de alginato son hidrofílicos, biocompatibles y no inmunogénicos.

El alginato, un polímero aniónico usualmente derivado de algas marinas, es hidrofílico, biodegradable, biocompatible y no antigénico, y ha sido aplicado extensamente a la ingeniería de tejido de cartílago, promoviendo diferenciación celular y producción de matriz extracelular (MEC). El alginato puede formar uniones/cadenas estables con otros polímeros por medio de cationes divalentes, como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ).<sup>18</sup>

Sus propiedades físico-químicas como viscosidad y rigidez son fácilmente controlables y por lo tanto lo hacen un candidato atractivo para la ingeniería de tejidos.<sup>22</sup>

### **Adhesión celular**

Estos experimentos claramente demuestran, sin embargo, que la naturaleza de la superficie de un polímero tendrá consecuencias importantes para la función celular, una observación de significancia considerable en cuanto al uso de polímeros en la ingeniería de tejidos.

La textura a microescala del material implantado puede tener un efecto significativo en el comportamiento de las células en la región implantada (figura 4). El comportamiento de las células cultivadas en superficies con orillas, ranuras, u otras texturas es diferente al del comportamiento en superficies lisas. En muchos casos, las células se orientaron y migraron a lo largo de fibras o surcos en la superficie, un fenómeno llamado contacto guiado (contact guidance). La estructura a microescala de una superficie tiene un efecto significativo en la migración celular, por lo menos para la migración de neutrófilos humanos.

- Adhesión celular, dispersión, migración, y función en un sustrato dependen de la naturaleza química, física y mecánica del sustrato.<sup>1</sup>

Los andamios son esenciales para la ingeniería de tejidos por su ambiente biomimético para la adhesión celular y apropiado soporte mecánico para el crecimiento interno celular. En adición, estos biomateriales también pueden ser aplicados para liberación controlada de sustancias.<sup>23</sup>

Ya que el crecimiento y función de muchas células derivadas de tejido requieren adhesión y migración en un sustrato sólido, los eventos que rodean la adhesión celular son fundamentalmente importantes. En adición, la fuerza de la adhesión celular es una determinante importante en el ritmo de migración celular, la cinética

de agregación célula-célula, y la magnitud de barreras tisulares para el transporte celular y molecular. Por lo tanto, la adhesión celular es una consideración mayor en el desarrollo de métodos y materiales para el suministro de células, ingeniería tisular, y regeneración tisular.

La mayoría de las células derivadas de tejidos requieren adherencia a superficies sólidas para viabilidad y crecimiento. Por esta razón, los eventos iniciales que ocurren cuando una célula contacta una superficie son de interés fundamental. En ingeniería de tejidos, la adhesión celular a una superficie es crítica porque la adhesión antecede otros eventos como la dispersión, migración y, con frecuencia, función celular diferenciada. Un número de técnicas para cuantificar la magnitud y fuerza de la adhesión celular han sido desarrolladas. Muchas técnicas son utilizadas, lo cual dificulta la comparación de estudios realizados por diferentes investigadores. La situación se complica más por el hecho de que la adhesión celular depende de un gran número de parámetros experimentales, muchos de los cuales son difíciles de controlar.<sup>1</sup>

El mecanismo más estable y versátil para la adhesión celular involucra la asociación específica de glicoproteínas de la superficie celular, llamados receptores, y moléculas complementarias en el espacio extracelular, llamados ligandos. Los ligandos pueden existir libremente en el espacio extracelular, pueden estar asociados con la matriz extracelular, o adheridos a la superficie de otra célula. La adhesión célula-célula puede ocurrir por unión homofílica de receptores idénticos en diferentes células, por unión heterofílica de un receptor a un ligando expresado en la superficie de una célula diferente, o por asociación de dos receptores con un enlazador intermediario. La adhesión célula-matriz usualmente ocurre por unión heterofílica de un receptor a un ligando adherido a un elemento insoluble de la matriz extracelular.<sup>1</sup>



## **Proliferación celular**

El crecimiento celular ocurre continuamente durante la vida adulta en algunos tejidos como la médula ósea, piel e intestino. Otros tejidos tienen la capacidad de regenerar masa celular perdida por medio de proliferación celular.<sup>1</sup>

Las señales que controlan los ritmos de proliferación celular en el cuerpo son completamente comprendidas, aunque la regulación de la proliferación por medio de factores de crecimiento es sin duda importante. Otros mecanismos para el control de la proliferación celular (como inhibición por contacto o limitación nutricional) han sido sugeridos por experimentos en células que han sido removidas de tejidos y mantenidas en cultivo.<sup>1</sup>

Células que son cultivadas fuera del cuerpo se dividen y proliferan, pero solo bajo las condiciones adecuadas. Extrañamente, la facilidad con la que las células pueden crecer in vitro no siempre coincide con su potencial proliferativo en el tejido. Nuestra habilidad de controlar la replicación y proliferación celular es esencial para desarrollar nuestras habilidades en la ingeniería de tejidos.<sup>1</sup>

Poblaciones celulares que son concebidas y expandidas in vitro pueden potencialmente ser trasplantadas para producir una proteína que es continuamente liberada en el cuerpo. La cantidad celular aumenta a una densidad máxima y disminuye con el agotamiento de un nutriente limitado (como la glucosa).<sup>1</sup>

La mayoría de células tiene requerimientos complejos del medio: una variedad de diferentes vitaminas, amino ácidos esenciales, glucosa, y sales deben estar presentes en el medio de cultivo para que las células puedan sobrevivir y proliferar.<sup>1</sup>

En particular, la porosidad y tamaño del poro son factores importantes, ya que la interconexión de los poros permite la migración y proliferación celular.<sup>5</sup>

### 2.2.3 Biomoléculas

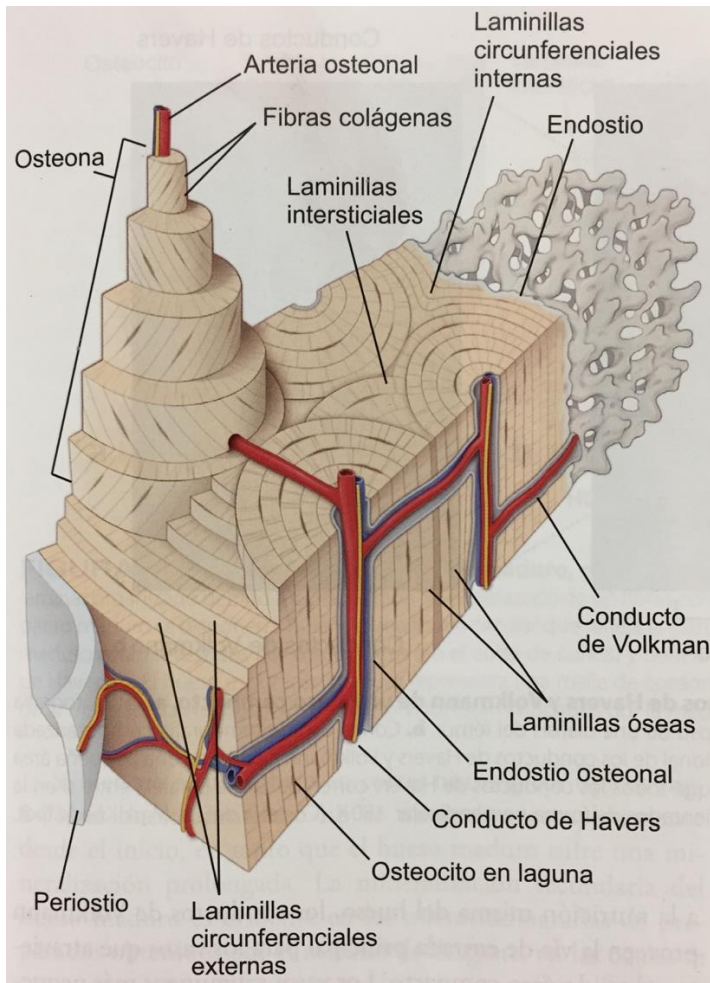
La célula responde al medioambiente extracelular detectando señales químicas o estímulos físicos que desencadenan la apropiada respuesta de las mismas mediante la activación de distintos mecanismos moleculares y biológicos que conducen a división, migración, diferenciación, mantenimiento del fenotipo o apoptosis. La actividad coordinada de estos procesos por parte de las células que forman un tejido conducen a la definición estructural y funcional de un tejido en un momento temporal determinado.

La mayor parte de la información que sobre señales moleculares se utiliza hoy en Ingeniería Tisular procede de estudios realizados con poblaciones aisladas en cultivos sobre las que se han aplicado distintos factores solubles. Se trata de los denominados factores de crecimiento. La participación de estas sustancias en la construcción de nuevos tejidos es fundamental pues contribuyen a su crecimiento y desarrollo al igual que ocurre en condiciones ortotópicas.<sup>2</sup>

Mucho se necesita investigar aún en cuanto al papel que juegan los factores de crecimiento y las citoquinas en los tejidos normales y los tejidos remodelados. Lo más importante hasta el momento es que estas moléculas juegan un importante rol en el proceso normal que transcurre desde la lesión o daño hasta la reparación de los tejidos.<sup>4</sup>

## 2.2 TEJIDO ÓSEO

El hueso es un órgano dinámico y complejo, que abarca una variedad de tejidos como tejido óseo mineralizado, cartílago, endostio, periostio, médula, nervios y vasos sanguíneos.<sup>24</sup> Fig. 8

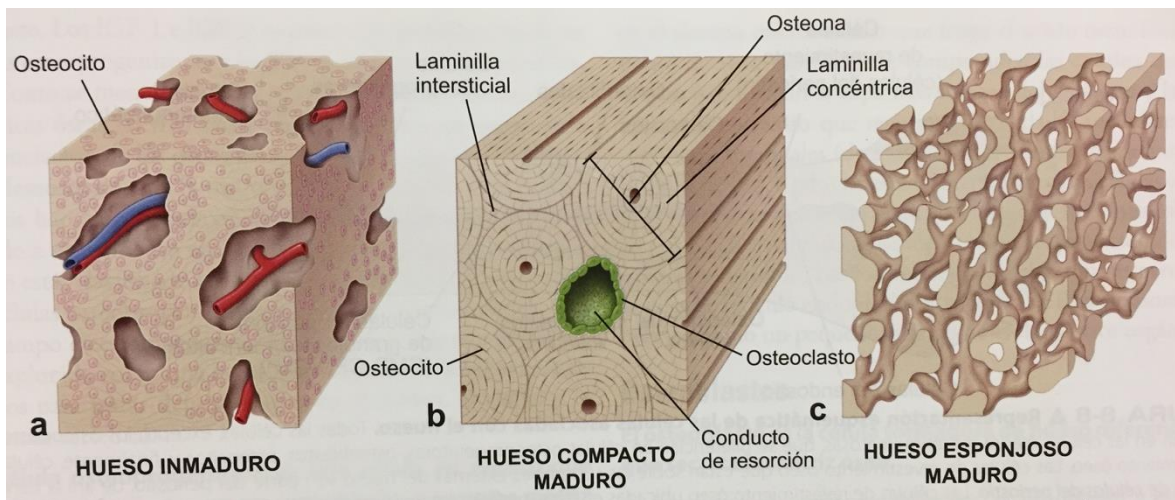


**Figura 8** Diagrama de un bloque de hueso compacto extraído de la diáfisis de un hueso largo.<sup>25</sup>

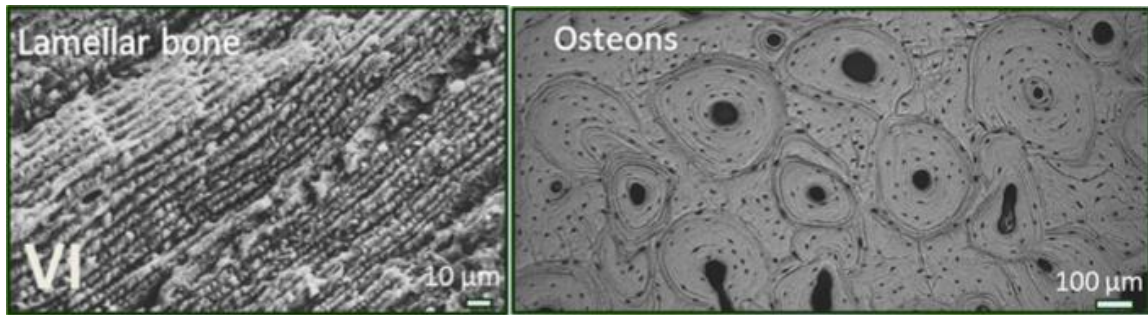
La MEC del hueso es en esencia un material compuesto por apatita carbonatada (~69% de la MEC), principalmente cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), atrapadas en una matriz orgánica (~22% de la MEC) principalmente colágeno tipo I, y agua (~9% de la MEC).<sup>26,27</sup>

El esqueleto craneofacial emerge de la osificación intramembranosa, mientras que los huesos largos de osificación endocondral. Los huesos del esqueleto craneofacial están compuestos por una cortical y una región interna trabecular. La cortical está compuesta de capas laminares concéntricas de alrededor de  $5\mu\text{m}$  de grosor,

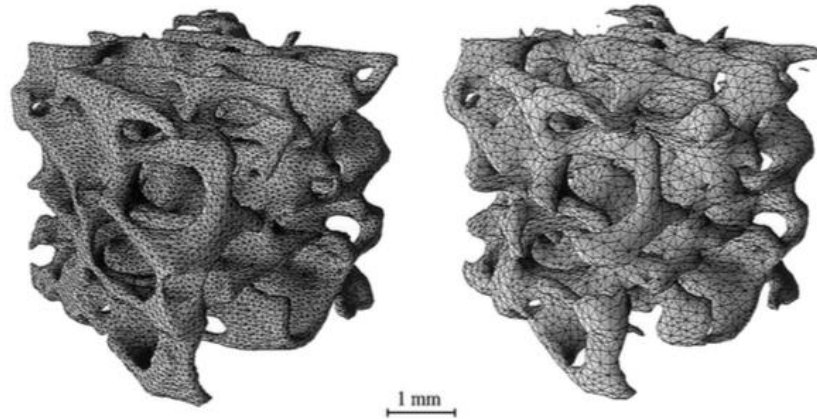
mientras que la red trabecular que se encuentra dentro está hecha de trabéculas de alrededor  $150\mu\text{m}$  de diámetro y poros de alrededor  $500\mu\text{m}$  de diámetro. La ultraestructura trabecular se asemeja a la de las osteonas; compuesto de láminas concéntricas, pero sin los canales centrales de Havers que se encuentran en hueso cortical. Se piensa que la microarquitectura es resultado de un mecanismo en el que hojas laminares son depositadas secuencialmente durante un tiempo.<sup>3</sup> Fig. 9,10 y 11.



**Figura 9** Diagrama de hueso inmaduro, maduro y esponjoso. a. Los huesos (entretejido) inmaduros no tienen un aspecto laminar organizado debido a la disposición de entrelazado de las fibras colágenas. Las células tienden a distribuirse al azar. b. Las células del hueso compacto maduro se disponen siguiendo una forma circular que refleja la estructura laminar del sistema de Havers. c. El hueso compacto maduro representa una malla de cordones (espículas de anastomosis delgadas de tejido óseo). Los espacios dentro de la malla son continuos y, en un hueso vivo, están ocupados por la médula ósea.<sup>25</sup>



**Figura 10** Estructuras de hueso cortical observadas con MEB. Hueso laminar de un hueso largo de rata (izquierda) y osteonas (derecha).<sup>28</sup>



**Figura 11** Modelos de hueso trabecular (especimen de la cabeza de un femoral) creados con técnicas de elemento micro-fino a una resolución voxel de 84 µm (izquierda) and 168 µm (derecha).<sup>29</sup>

## Función

El papel principal del complejo óseo es proporcionar el soporte mecánico necesario, movimiento y protección, junto con otros roles que van desde producción sanguínea, a almacén de materiales minerales, regulación de pH, y alojamiento de múltiples células progenitoras.<sup>26</sup>

## **Necesidad de crear sustitutos de hueso**

El hueso es un tejido altamente vascularizado y dinámico con una reabsorción única y capacidad reformacional que permite a la mayoría de las lesiones óseas repararse sin complicaciones.<sup>5</sup>

Sin embargo, la constante tasa de crecimiento de desordenes ortopédicos causados por retrasos o problemas de consolidación en el proceso de recuperación esta convirtiéndose en un problema público crítico, incluyendo una carga financiera en el sector salud.<sup>5,3</sup> Algunas de las causas de estos desordenes son: defectos y deformidades de la región craneofacial surgen de enfermedades dentales, trauma, envejecimiento, cáncer y malformaciones congénitas.<sup>3</sup> El actual estándar de oro para la reparación de defectos óseos grandes o desafiantes es el uso de injertos de hueso autólogo o aloinjerto; sin embargo, este abordaje sufre de diversas limitaciones críticas incluyendo volumen de hueso insuficiente para recolección, morbilidad del sitio donante, y mayor riesgo de complicaciones debido a la cirugía adicional.<sup>5</sup>

El tratamiento convencional actual para trauma óseo es el reemplazar completa o parcialmente el área afectada con injerto de tejido, o con prótesis artificiales para restaurar funciones cerca de lo normal. La actual vanguardia de la colocación de implantes protésicos fracasa en satisfacer los requerimientos estructurales y funcionales que los convertiría en soluciones permanentes. Como resultado, miles de pacientes se someten a subsecuentes cirugías dolorosas y costosas para reemplazo de implantes o reajustes.<sup>3</sup> Soluciones con injerto de tejido o a base de células han demostrado mejorar la calidad de vida de pacientes, pero son limitados en cuanto a tamaño y forma anatómica del defecto, así como la disponibilidad de tejido donador sano y morbilidad del sitio donador. Hay una necesidad urgente de estrategias más exitosas de reconstrucción de hueso que toman en consideración, factores bioquímicos, morfológicos y anatómicos. Una estrategia se enfoca en la manufactura de sustitutos de hueso biocompatibles/bioreabsorbibles con

arquitectura externa e interna compleja, y señales bioquímicas apropiadas que puedan mejorar o reemplazar el área afectada, gradualmente madurar, e integrarse impecablemente con el tejido nativo.<sup>3</sup> El sustituto de hueso serviría de molde biocompatible que estimularía la migración celular, proliferación y diferenciación, actuando idealmente como un soporte temporal poroso bioreabsorbible hasta que se regenere la matriz ósea.<sup>30</sup> Una gran cantidad de trabajo ha sido realizado en investigación de materiales y manufactura de metodologías en esta área, específicamente en la construcción de sustitutos de hueso para aplicaciones de soporte de carga; sin embargo, todavía existe una brecha en el entendimiento de la relación entre la morfología del andamio (tamaño del poro, forma, e interconectividad), interacciones bioquímicas transitorias y propiedades mecánicas.<sup>30,31</sup>

Existen desventajas obvias-el tejido autólogo óseo tiene un suministro limitado y morbilidad del sitio donante es inevitable. Es aún más evidente que los segmentos de hueso autólogo no coinciden bien con la geometría compleja encontrada en el esqueleto craneofacial; debido a esto, el hueso reconstruido utilizando éste método resulta con apariencia visible deformada.<sup>3</sup>

### **Requerimientos del sustituto de hueso**

La nueva generación de injerto de hueso autólogo comenzando con células troncales es una de las estrategias más prometedoras de ingeniería de tejido óseo, el cual reduce el riesgo de reacciones adversas.<sup>5</sup>

Debido a la naturaleza compleja del hueso como sistema biológico, en el contexto de fabricación de implantes sustitutos de hueso, el enfoque es generalmente el entender la composición estructural y bioquímica de la matriz extracelular (MEC) del hueso, así como la interacción de la MEC con las células y el entorno en el que residen.<sup>26</sup>

## **Dificultades en alcanzar un sustituto ideal de hueso**

Manufacturar sustitutos de hueso optimos desde un punto de vista bioquímico, estructural, y con propiedades mecánicas es altamente complejo debido a una serie de factores. Desde una perspectiva arquitectónica, el sustituto de hueso soporta funciones mecánicas y biológicas, que pueden estar en conflicto.<sup>31</sup> Por ejemplo, para incrementar las propiedades de capacidad de carga del material, un material más denso es necesario, lo cual entra en conflicto con el requerimiento de tener una matriz altamente porosa para estimular el crecimiento del hueso y permeabilidad del fluido.<sup>3</sup> Lo que generalmente es definido como una optimización de las propiedades del andamio es modificar un solo parámetro con impacto mínimo a como las propiedades del otro andamio son modificadas. Asimismo, caracterización, digitalización, y confección de la arquitectura de los andamios son tareas difíciles. Usando métodos de caracterización para revelar porosidad en la superficie, tamaño del poro, forma del poro, interconectividad, y volumen de porosidad en tejidos óseos, y además traducir esa información en formato digital que pueda ser interpretado en métodos de fabricación de forma continua y específica puede ser un desafío.<sup>3</sup>

En cuanto al material, las dificultades se presentan en el diseño de estructuras que sean bioreabsorbibles in vivo a un ritmo apropiado igualando el de la remodelación ósea. El camino de la biodegradación tendrá un efecto en las propiedades mecánicas, estructurales y bioquímicas de el andamio, y necesita ser totalmente comprendido. Algunos de los parámetros que pueden afectar el ritmo de degradación es el tamaño del poro, interconectividad de los poros, permeabilidad, forma del andamio, y volumen, así como sitio de implantación. Además, la respuesta a largo plazo del tejido nativo a la degradación de productos también debe ser considerada.<sup>30,3</sup> Agregando a la dificultad de producir un implante ideal, las propiedades generales de bioquímicas, estructurales, y mecánicas del sustituto de hueso deberían coincidir las necesidades específicas del paciente, como lo son edad, género, estado de salud, metabolismo, sitio de implantación, y condiciones de carga.<sup>30</sup>



Desde un punto de vista composicional(estructural), el sustituto de matriz del hueso debe ser al menos biocompatible con la MEC, el ambiente celular y químico, osteoconductor para fomentar el crecimiento hacia en interior a partir de tejido adyacente sano, así como no tóxico, no mutágeno, no carcinogénico y no teratogénico. Idealmente el material debe ser osteoconductor para promover formación de nuevo hueso en el sitio.<sup>3</sup>

Las fuerzas mayores que actúan en el esqueleto craneofacial resultan de la masticación y son inducidos por la acción de cuatro músculos- pterigoideos medial y lateral, temporal y masetero- insertándose en lugares específicos en la mandíbula.<sup>32</sup> La forma de estos huesos y las conexiones entre ellos afectan bastante en la forma en que distribuyen el estrés mecánico. Por lo tanto, para la función adecuada del esqueleto craneofacial, es crucial que los andamios utilizados como injertos craneofaciales recapitulen las geometrías nativas del hueso. En consecuencia, injertos ajenos difícilmente pueden transducir las fuerzas apropiadamente a través de el cráneo. A parte de afectar la mecánica del movimiento mandibular, ambientes mecánicos alterados afectan el comportamiento celular, ya que los osteocitos que componen la mayoría del hueso son altamente sensibles a su ambiente mecánico.<sup>33</sup> Andamios que recapitulan las geometrías anatómicas apropiadas también ayudaran a proporcionar ambientes adecuados para las células en los tejidos.<sup>3</sup>

Generalmente, los andamios en ingeniería de tejidos para la regeneración de hueso imitan la porosidad heredada del hueso trabecular. Impresoras modernas pueden lograr tamaños de porosidad muy finamente controlados, imitando el diámetro de 500 $\mu\text{m}$  de los poros encontrados en el hueso trabecular.<sup>3</sup>

Usualmente, la macroporosidad interconectada debería ser de  $>5\mu\text{m}$ <sup>31,27</sup>, con una orientación específica que coincida con las condiciones de estrés de carga y mecanismos de transporte de fluido y nutrientes.<sup>30</sup> También, lo que es definido como

microporosidad, con un diámetro que va de entre 0.1-10 $\mu$ m ha mostrado un efecto en la reacción biológica de los andamios, de este modo los poros a esta escala deben ser caracterizados e integrados al diseño final.<sup>27</sup> Desde una postura estructural también necesario implementar un gradiente en la porosidad y propiedades mecánicas, desde una configuración densa externa igualando las características del hueso esponjoso. Metodologías de fabricación que puedan incorporar la interpretación e implementación de información digital a escalas de micro y macro porosidad son de interés.<sup>34</sup>

Otro problema relacionado a la manufactura de arquitectura apropiada del sustituto de hueso yase en el desarrollo de estrategias de diseño de un software de interpretación que puedan convertir la morfología estructural de porosidad y propiedades mecánicas deseadas del hueso a ser restaurado.<sup>3</sup>

### **Ingeniería de tejidos en hueso**

Estrategias basadas en bioingeniería de tejidos tienen el potencial de aumentar métodos tradicionales regenerativos que utilizan tejidos trasplantados y materiales sustitutos de hueso. Algunas consideraciones clave en el desarrollo de estrategias de ingeniería de tejidos para tejido craneofacial/dental son las siguientes: (1) hay células troncales que puedan ser utilizadas; (2) Las demandas estéticas pueden ser cumplidas(alcanzadas); (3) Pueden las construcciones de ingeniería de tejidos ser utilizadas como parte de una estrategia combinada/mixta; (4) Pueden las demandas de vascularización ser alcanzadas; y (5) El alto riesgo de infección en las cavidades orales y nasales pueden ser manejadas. Estrategias de ingeniería de tejidos craneofaciales serán probablemente requeridas para regenerar más de un fenotipo de tejido al mismo tiempo.<sup>3</sup>

Estrategias basadas en ingeniería de tejido óseo para la regeneración de tejido craneofacial/dental pueden ser divididas ampliamente en tres categorías principales basadas en el andamio, componente celular o factor de crecimiento que juega un papel importante en el fenómeno de regeneración esperada. El biorreactor del precultivo o funcionalidad de la superficie de estos implantes también puede ser

usado para limitar la adhesión celular a un tipo específico de células y para ayudar a esas células a jugar un papel después de la implantación teniendo así un tejido funcional (ejemplo, produciendo matriz extracelular) o prevascularizando el tejido mediante la cocultura de células endoteliales.<sup>35</sup>

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pérdida de tejidos y con eso el probable deterioro (parcial o total) de un órgano, o bien de un aparato; se ha constituido como unos de los problemas más frecuentes y de mayor impacto social, laboral y económico para cualquier sociedad, así como para su sistema de salud. Conforme al estilo de vida del ser humano ha ido evolucionando, van sucediendo cambios en el campo de la salud comunitaria, que han causado, entre otras situaciones, que las enfermedades crónico-degenerativas, así como cualquier otro padecimiento ligado al envejecimiento poblacional, se incrementen en frecuencia y prevalencia, constantemente.

La reconstrucción de grandes defectos óseos sigue siendo un problema en la práctica clínica ortopédica y craneofacial, es por esto que la investigación en ingeniería de tejido óseo se centra en el desarrollo de alternativas a los injertos de hueso autólogo y alogénico que puede estimular la regeneración de hueso.

Los autoinjertos son limitados en el suministro y se asocian con morbilidad del sitio donante, mientras que otros materiales muestran escasa integración con el propio hueso del huésped. La falta de integración es causa de la ausencia de periostio, que es la capa externa del hueso que contiene las células osteoprogenitoras y es indispensable para el crecimiento y la remodelación del tejido óseo.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Existen en la actualidad avances que son de gran utilidad, pero todavía hay un camino largo que recorrer con respecto a la investigación en la ingeniería de tejidos, con el fin de que esta terapia sea confiable y se aplique en la clínica.

En el ámbito de la combinación de células, materiales y procesos biotecnológicos, terapéutica extiende sus brazos, no solo para la reparación tisular y orgánica, sino, también, para la génesis de estructuras dentales, orales y craneofaciales que se hayan perdido, parcial o totalmente, debido a factores etiológicos relacionados con anomalías genéticas, traumatismos y enfermedades diversas. Debido a que, prácticamente todas las estructuras craneofaciales provienen de células mesenquimatosas es que, su regeneración y reparación es posible a través de esta forma de bioingeniería.

Para la resolución de defectos óseos que, con relativa frecuencia pueden presentarse en alguna de las estructuras craneofaciales, se han intentado diversas opciones y, sin duda alguna el injerto óseo ha sido el tratamiento estándar de oro para la reparación de dichos defectos, sin embargo, debido a la morbilidad asociada al sitio donador, se requiere contar con otras alternativas para sustitución ósea. En los últimos años se han desarrollado, diversas técnicas y materiales para atender este tipo de necesidad, aunque algunas de ellas, poseen la limitante generada a partir de las propiedades osteoinductivas de dichas técnicas y materiales lo que hace que no sea posible considerarlas como las ideales y/o deseables.

En la búsqueda de opciones terapéuticas osteoinductoras y tisulo-reparativas requeridas para la resolución de casos, gracias a la investigación en este tema, así como el avance científico y tecnológico, es que, el horizonte se ha ido ampliando, y ha proporcionado el nacimiento de la ingeniería de tejidos; disciplina que inicia con la investigación de células troncales, como mecanismo propio del cuerpo humano, para reparar tejidos, como el hueso.

Aunque falta mucho por investigar, se sabe que los estudios obtenidos hasta la fecha son prometedores, pero antes de que la ingeniería tisular se implemente en la práctica clínica, es necesario seguir investigando, sobre todo en los andamios que son los puntos activos en el proceso de regeneración de los tejidos y no sólo como hasta hoy, un operador celular de una serie de tejidos, pero que se han realizado únicamente en estudios (in vitro).

Conforme vamos utilizando enfoques de ingeniería de tejidos para aprender más sobre el comportamiento celular y fisiología, también estamos incrementando las herramientas que están disponibles para mejorar la práctica médica y quirúrgica.<sup>1</sup>

## V. HIPÓTESIS

Los andamios de alginato promueven la adhesión y proliferación de células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental

## VI. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta de células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental en andamios de alginato elaborados a base de cloruro de calcio

### 6.2 Objetivos específicos

Analizar la estructura superficial del andamio de alginato.

Evaluar la respuesta celular de un andamio de alginato tomando en consideración la adhesión y proliferación que las células presenten.

Comparar si las diferentes concentraciones de hidroxiapatita en los andamios tienen una repercusión en respuesta celular (adhesión y proliferación).

## VII. MATERIAL Y MÉTODO

### 7.1 Recursos

#### 7.1.1 Humanos

Dra. Janeth Serrano Bello (directora de tesina)

Jazmin Reyes Richards (estudiante)

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez (asesor en cultivo celular)

#### 7.1.2 Materiales

Equipo:

Campana de flujo laminar

Incubadora de CO<sub>2</sub>

Microscopio óptico

Microscopio Electrónico de Barrido

Lector de microplacas de ELISA – Chromate 4300

Micropipetas de de 0.1-1mL y 20-200µL

Insumos:

Guantes

Cubre bocas

Batas

MTT

Cajas petri para cultivo celular

Placas para cultivo celular de 96 pozos

Jabón quirúrgico

Toallas desinfectantes

Tubos de eppendorf

Medio de cultivo Corning® 500 mL MEM (minimun essential medium) Alpha Medium

Infraestructura:

Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos DEPeI, UNAM



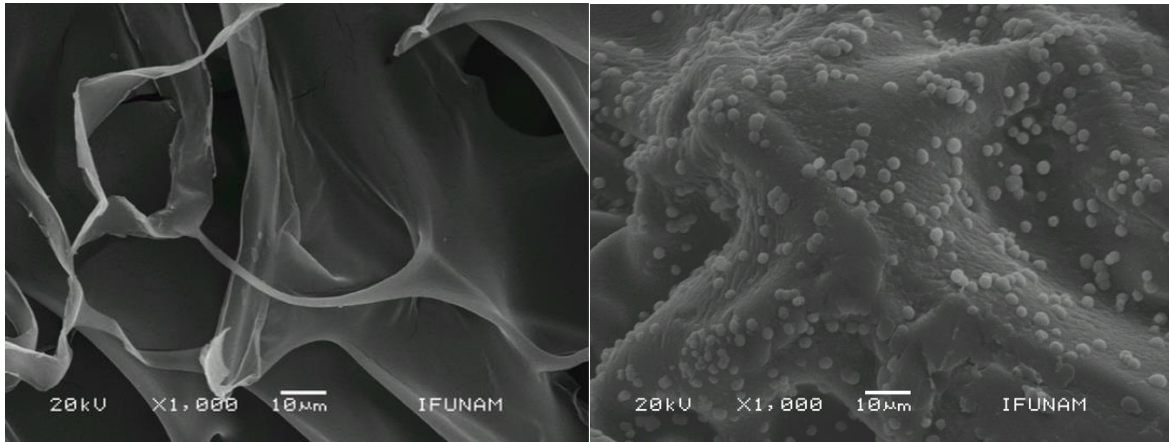
### 7.1.3 Financieros

DGAPA-UNAM-PAPIIT IA205818 Responsable Dra. Janeth Serrano Bello

## 7.2 Síntesis del andamio de alginato y alginato/hidroxiapatita

Para sintetizar los andamios se partió de una solución al 2% (peso/volumen) de alginato de sodio (SIGMA-ALDRICH, CAS: 9005-38-3) en 100 ml de agua bidestilada previamente filtrada con una membrana a 0.22 $\mu$ m y esterilizada. Posteriormente, para generar los andamios de alginato de sodio con los diferentes porcentajes de la nanocerámica de hidroxiapatita (nHA, SIGMA-ALDRICH, 677418: <200 nm particle size by BET), a la solución de 2% se agregaron las nanopartículas de HA a un porcentaje de 30, 40, y 50 % (peso/volumen) y se dispersaron por sonicación durante 3 h, la solución composite resultante se agitó durante 24h a temperatura ambiente. Finalmente, la solución de alginato de sodio (control), y las soluciones composites (ALG/HA) se transfirieron a tubos de PVC con un diámetro de 10 mm y un largo de 270 mm congelándolas a -80°C durante 48 h, al término de la congelación se transfirieron a un liofilizador para formar los andamios macro porosos.

Para su utilización en los estudios biológicos dichos andamios, se esterilizaron con 25 KGy de radiación gamma y posteriormente se incubaron con una solución de 2 mM de CaCl<sub>2</sub> a temperatura ambiente durante 7 días para garantizar el entrecruzamiento de cada uno de ellos. Finalmente se lavaron con agua bidestilada y se secaron bajo campana de flujo laminar con exposición a luz UV por 15 min (figura 12).



**Figura 12** Superficie de los andamios de alginato antes (izquierda) y después (derecha) del entrecruzamiento con  $\text{CaCl}_2$ , observados con MEB. <sup>F.D.</sup>

### 7.3 Caracterización celular del andamio respuesta celular

Para investigar el efecto osteoconductor y/o osteoinductor de los andamios de ALG/HA se realizaron ensayos de proliferación y adhesión celular, utilizando cultivos celulares en el 2do y 5to pasaje de células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental, las cuales se mantuvieron a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ , en un ambiente con 100% de humedad.



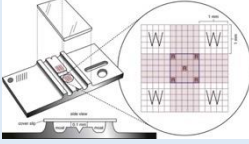
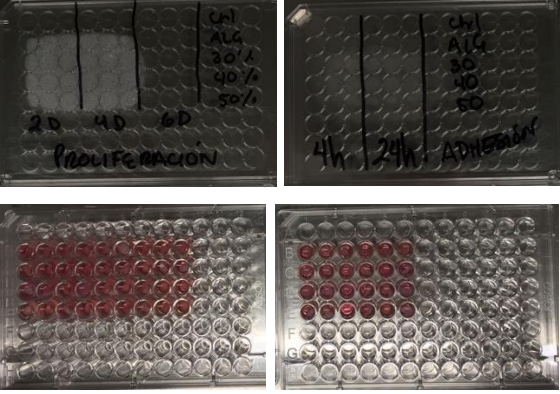
Previo a la colocación de las células en los andamios para la realización de los ensayos, se realizaron los procedimientos explicados en la tabla 1.

**Tabla 1** Serie de pasos realizados para la colocación de las células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental en los andamios. <sup>F.D.</sup>

	<p>Células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental observadas con microscopio óptico en la caja de cultivo antes de la realización del procedimiento.</p>
	<p>Medio de cultivo, tripsina y PBS (de izquierda a derecha).</p>
	<p>Los cultivos celulares se lavaron con PBS estéril y se incubaron en una solución de tripsina durante 10 minutos.</p>
	<p>Una vez dissociadas las células, se recogieron en un frasco estéril, se neutralizó la tripsina con medio de cultivo y recogimos las células mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. La presencia de abundantes proteínas séricas en el medio es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina.</p>

continuación...

...continuación de serie de pasos realizados para la colocación de las células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental en los andamios.




	<p>Posteriormente el pellet celular se despegó y se re suspendió en 1mL de medio.</p> <p>Se agitó cuidadosamente para homogeneizar las células con el medio.</p>
 	<p>Para realizar el conteo celular se utilizó la cámara de Neubauer.</p> <p>Se determinó que se utilizarían alrededor de 5000 células para cada pozo/andamio lo cual equivalía a 8<math>\mu</math>L por experimento.</p>
	<p>Se utilizaron cajas de cultivo de 96 pozos para los ensayos, donde se colocaron los andamios y se le agregó medio de cultivo. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, en un ambiente con 100% de humedad.</p>

### 7.3.1 Ensayo de adhesión

Los andamios se incubaron durante 4 y 24 horas para determinar la influencia de las diferentes concentraciones de la hidroxiapatita en los andamios de ALG/HA (30%,40% y 50%), así como en los cultivos control ALG sobre la adhesión celular. Pasado el tiempo, se obtuvieron medidas de absorbancia en un espectrofotómetro usando una longitud de onda de 450 nm.

A continuación, en la tabla 2 se describen y esquematizan los pasos realizados en ensayo de adhesión celular:

**Tabla 2** Pasos realizados para el ensayo de adhesión celular. <sup>F.D.</sup>

	<p>En un tubo de eppendorf se homogeneizaron 1400<math>\mu</math>L de medio de cultivo y 140<math>\mu</math>L de WST-1 con ayuda de micropipeta de 0.1-1mL.</p>
	<p>Eliminamos medio de cultivo de cada pozo y por cada grupo (fila horizontal de tres pozos) cambiamos punta de micropipeta por una nueva.</p>
	<p>Se le agregó la solución previamente mencionada (110<math>\mu</math>L) a cada pozo con micropipeta de 20-200<math>\mu</math>L y se metió a incubadora a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, en un ambiente con 100% de humedad.</p>

continuación...

...continuación de pasos realizados para el ensayo de adhesión celular.



Después de los tiempos deseados (4 y 24 hrs.) respectivamente, se trasladó todo el medio a una caja nueva de 96 pozos y se midió el colorante incorporado a las células adheridas por medio de un espectrofotómetro/lector de placas de ELISA a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 450 nm.



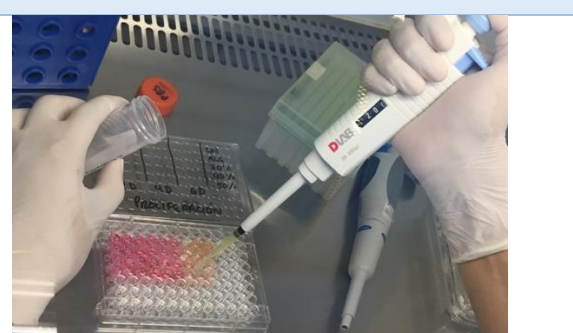

Con los resultados obtenidos se obtuvo el promedio y desviación estándar en Excel y posteriormente se graficaron en programa Prism 6.

### 7.3.2 Ensayo de proliferación

Para determinar la influencia de las diferentes concentraciones de hidroxiapatita en los andamios de ALG/HA sobre la proliferación celular, se utilizará el ensayo de Cell Counting Kit 8 (SIGMA-ALDRICH) tanto en los cultivos control ALG como experimentales ALG/HA (30%,40% y 50%), el cual es un ensayo no destructivo que permite mantener la integridad de los andamios hasta el fin del periodo de cultivo celular. Los andamios de ALG/AH serán incubados durante 2, 4, 6 y 8 días, en cada periodo experimental serán lavados con PBS y posteriormente se incubarán con medio completo con 10 $\mu$ L de la solución CCK-8 dejándose incubar durante 1 h. Pasado el tiempo, se obtendrán medidas de absorbancia en un espectrofotómetro usando una longitud de onda de 450 nm.

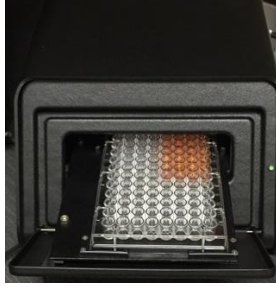
A continuación, se presenta en la tabla 3 cada paso del ensayo de proliferación celular:

**Tabla 3** Pasos realizados para el ensayo de proliferación celular. <sup>F.D.</sup>

	<p>En tubo de ependorf se homogeneizaron 1400<math>\mu</math>L de medio de cultivo y 140<math>\mu</math>L de WST-1 con ayuda de micropipeta de 0.1-1mL.</p>
	<p>Eliminamos medio de cultivo de cada pozo y por cada grupo (fila horizontal de tres pozos) cambiamos punta de micropipeta por una nueva.</p>
	<p>Enjuagamos con 200<math>\mu</math>L de PBS en cada pozo para eliminar las proteínas que quedan del medio de cultivo. Se retiró inmediatamente después.</p>
	<p>Se le agrega la solución previamente mencionada (110<math>\mu</math>L) a cada pozo con micropipeta de 20-200<math>\mu</math>L y se metió a incubadora a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, en un ambiente con 100% de humedad.</p>

continuación...

...continuación de pasos realizados para el ensayo de proliferación celular.



Después de los tiempos deseados (2, 4, 6 y 8 días) respectivamente, se trasladó todo el medio a una caja nueva de 96 pozos y se midió el colorante incorporado a las células adheridas por medio de un espectrofotómetro/lector de placas de ELISA a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 450 nm.

Con los resultados obtenidos se obtuvo el promedio y desviación estándar y posteriormente se graficaron en programa Prism 6.

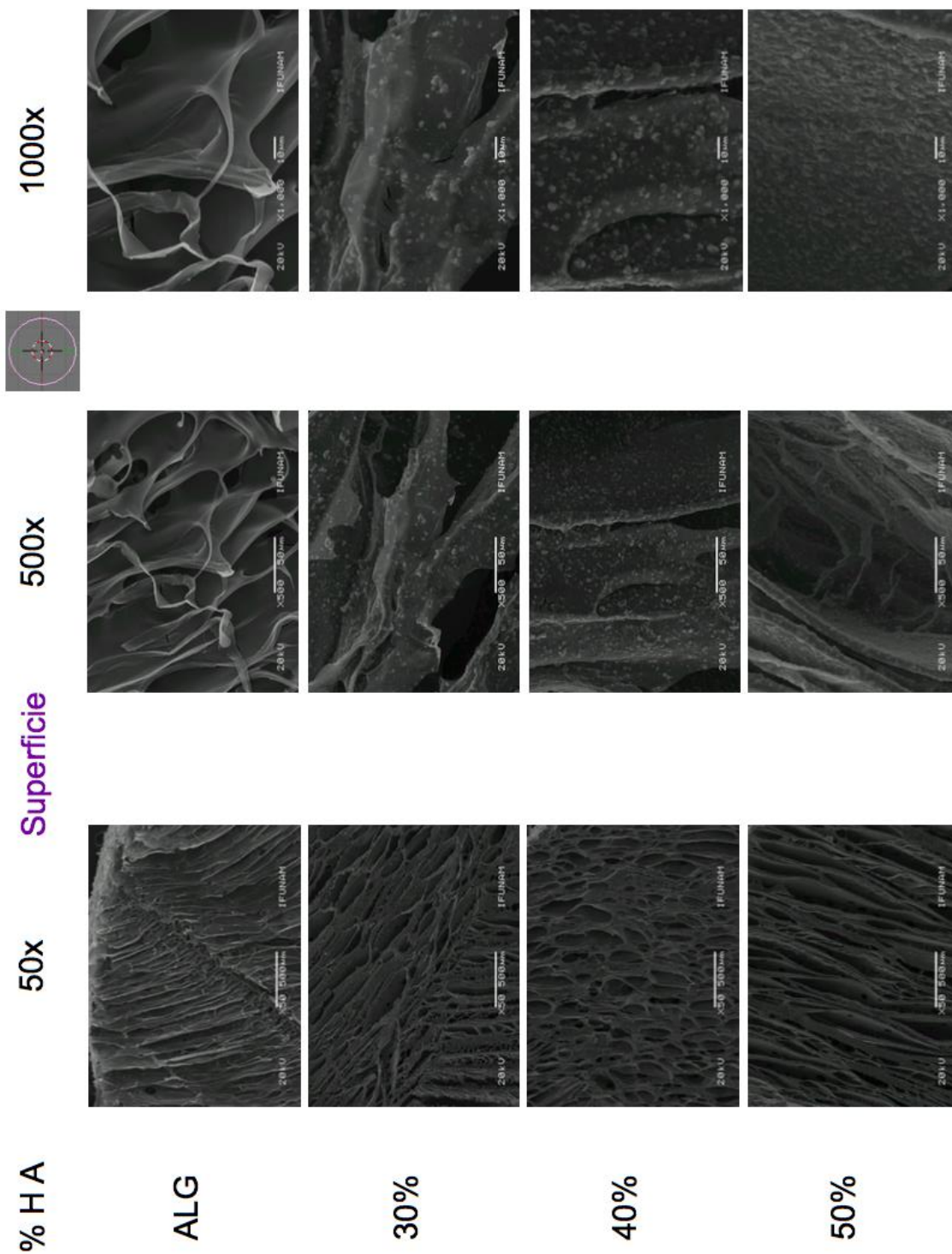


## VIII. RESULTADOS

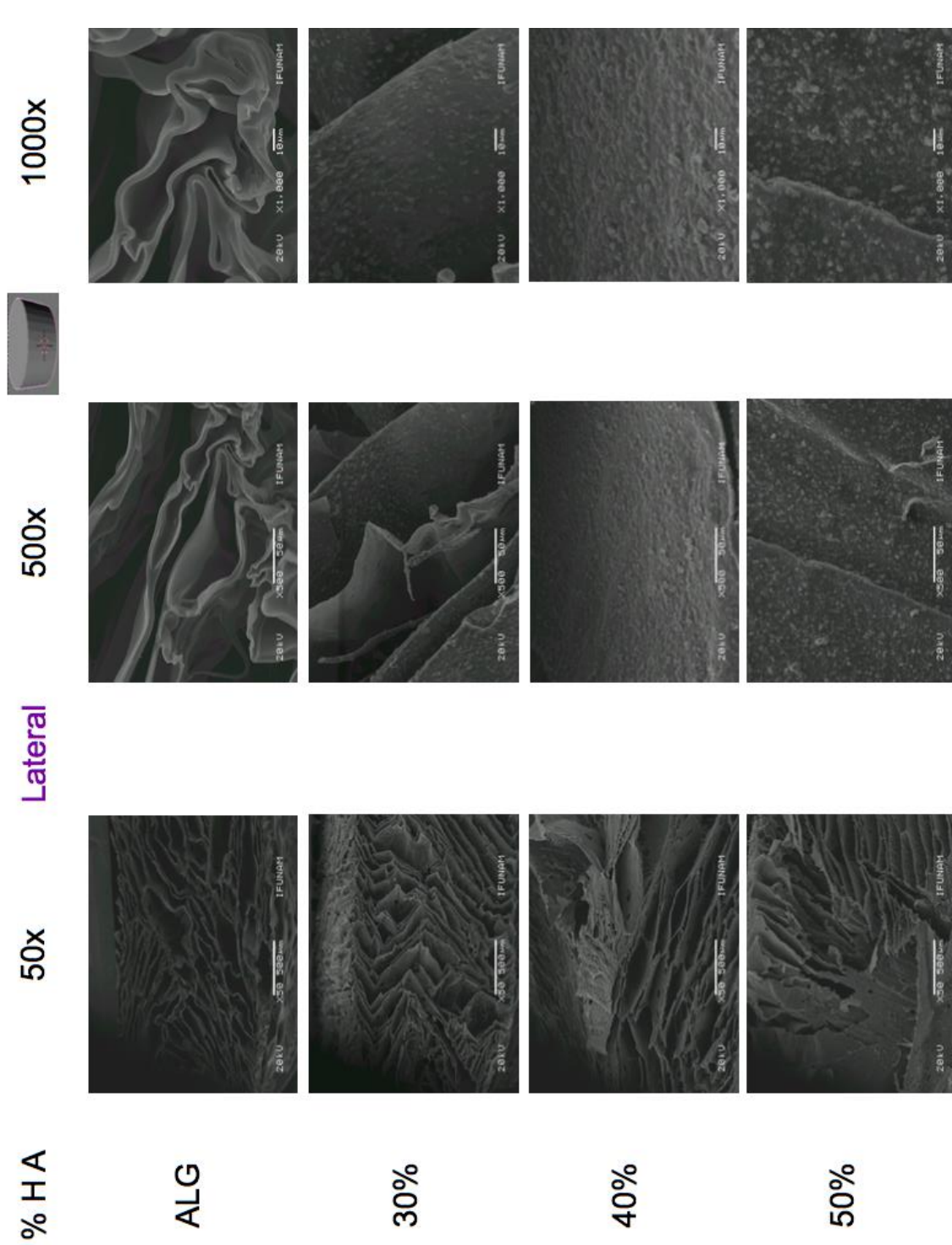
Una vez finalizada la síntesis del andamio de alginato y alginato/hidroxiapatita se realizaron fotomicrografías con MEB de los andamios de ALG (muestra control) y ALG/HA (a concentraciones de 30, 40 y 50%). Como se puede apreciar en la (figura 13), los andamios de ALG tienen una textura superficial bastante homogénea y de aspecto liso, en comparación con los que contienen diferentes porcentajes de la nanocerámica de hidroxiapatita, en los que se aprecia que entre mayor la concentración de HA, mayor es también la topografía superficial de los andamios. Es considerable la diferencia que se presenta en la superficie del andamio con concentración del 30% a aquella del 50% de HA, la cual está casi completamente saturada de micro texturas. En la figura 14 que es una vista lateral del andamio se determina lo mismo que en la superficie.

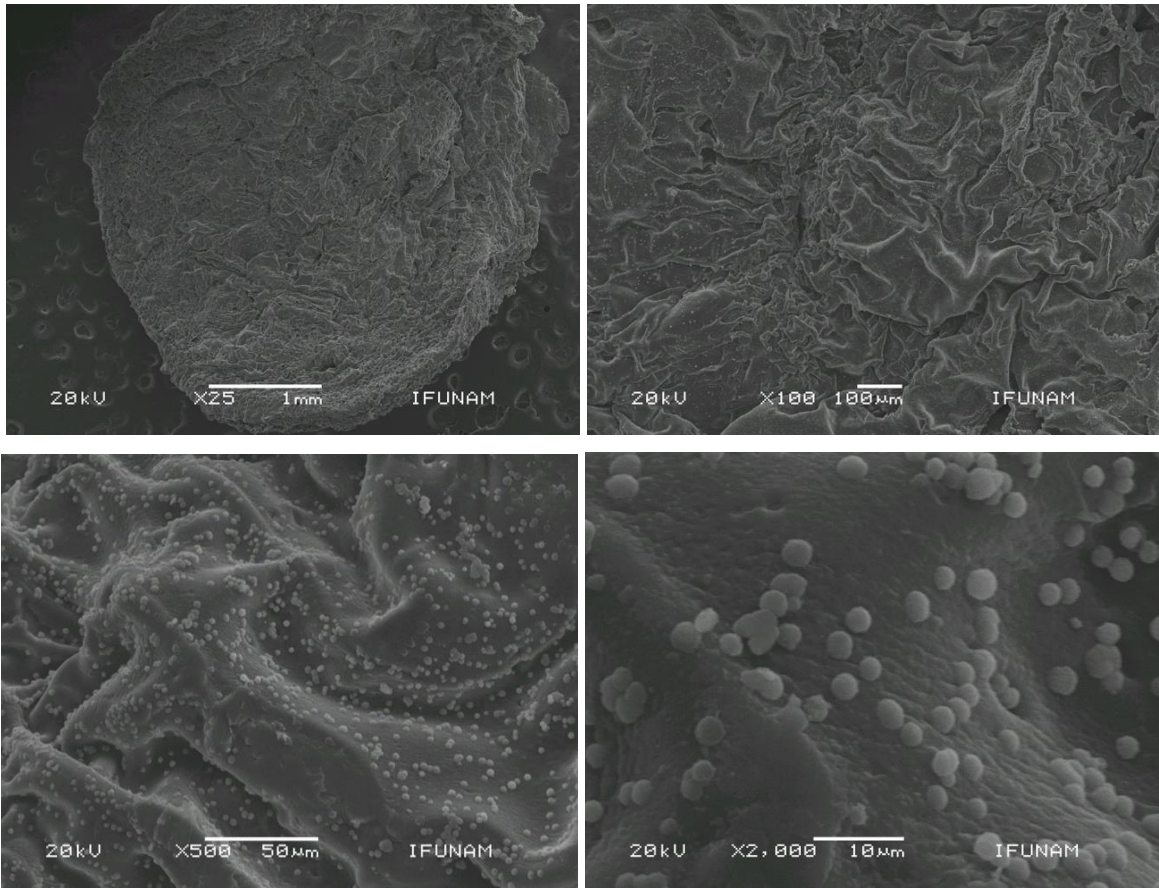
Al realizar el entrecruzamiento de los andamios de ALG e HA con  $\text{CaCl}_2$  se observó en las micrografías de MEB un cambio considerable en la topografía de los andamios, específicamente en el andamio control (ALG) ya que éste poseía un aspecto bastante liso previo al entrecruzamiento. Se aprecian como microestructuras esféricas a menor escala de gris sobre la superficie del andamio (Figura 15 y 16), siendo claramente más visibles en la amplificación de X2,000. Esta condición nos lleva consecuentemente a tomar la decisión de realizar una espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) para conocer con exactitud si la composición de estas microestructuras tenían relación con el  $\text{CaCl}_2$ , y así fue, en los resultados que obtuvimos (Gráfica 1) el elemento más destacado es el Ca, y le siguen algunos otros como carbono, oxígeno y oro; éste último por ejemplo, forma parte de su composición para mejorar la conductividad eléctrica del andamio.<sup>1</sup> No se colocó de igual manera como con el andamio de ALG, una micrografía del andamio de ALG/HA después del entrecruzamiento con  $\text{CaCl}_2$  debido a que no se observaba un cambio significativo en la superficie, esto a raíz de que ya poseía una considerable saturación en cuanto a textura gracias a las partículas de nanocerámica de hidroxiapatita.

**Figura 13** Micrografía de MEB de la superficie de andamios a diferentes concentraciones de HA. Sin concentración alguna de HA (ALG), con 30, 40 y 50% de nanocerámica de hidroxiapatita. F.D.

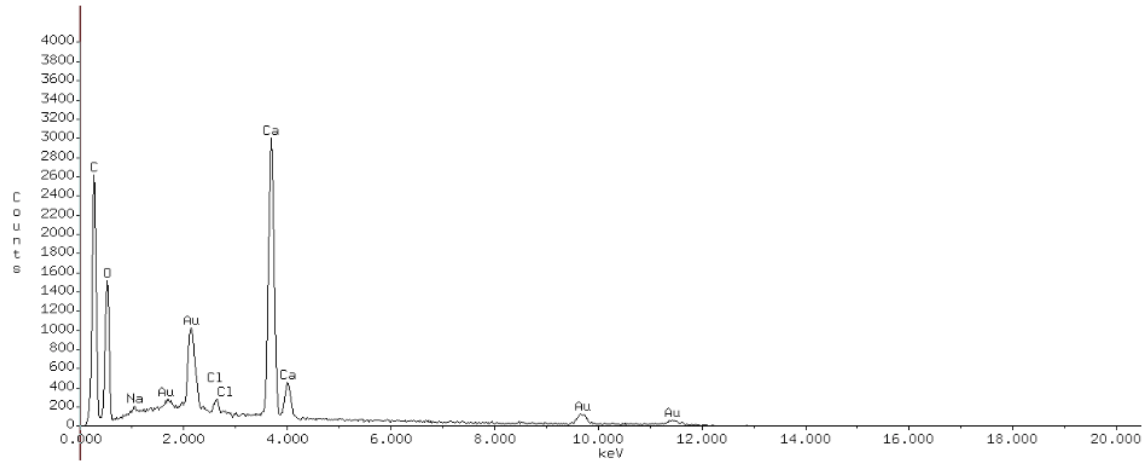


**Figura 14** Micrografía de MEB desde una vista lateral de la superficie de andamios a diferentes concentraciones de HA. Sin concentración alguna de HA (ALG), con 30, 40 y 50% de nanocerámica de hidroxiapatita. <sup>F.D.</sup>





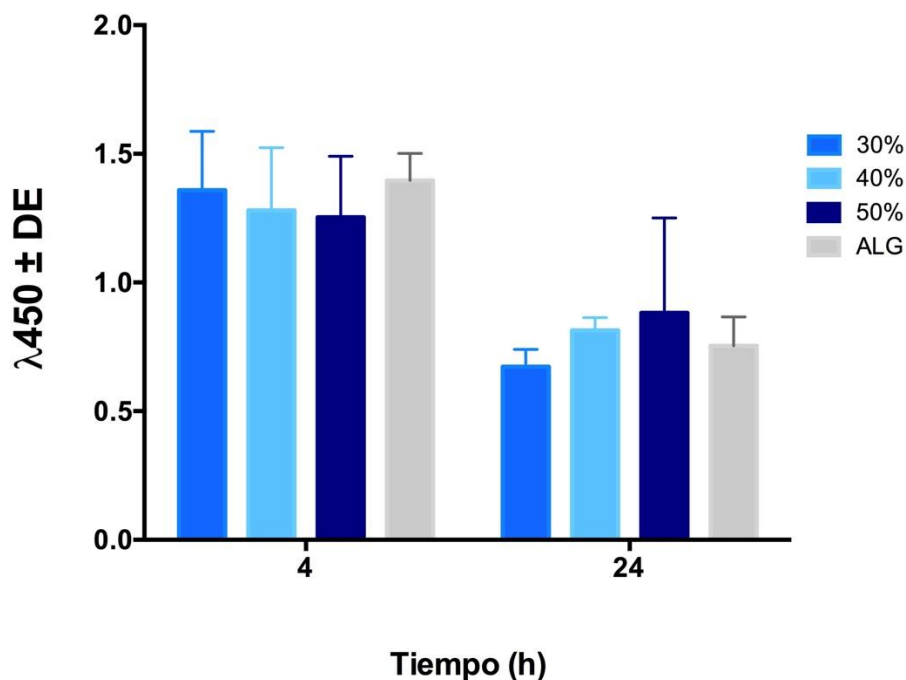
**Figura 15** Micrografías de superficie del andamio observado con microscopio electrónico de barrido (MEB) a diferentes ampliaciones, en la cual se pueden distinguir las partículas de  $\text{Ca}^{2+}$  como estructuras esféricas con menor escala de gris. F.D.



**Gráfica 1** Espectrofotometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) aplicado al andamio de ALG. F.D.

### Adhesión celular

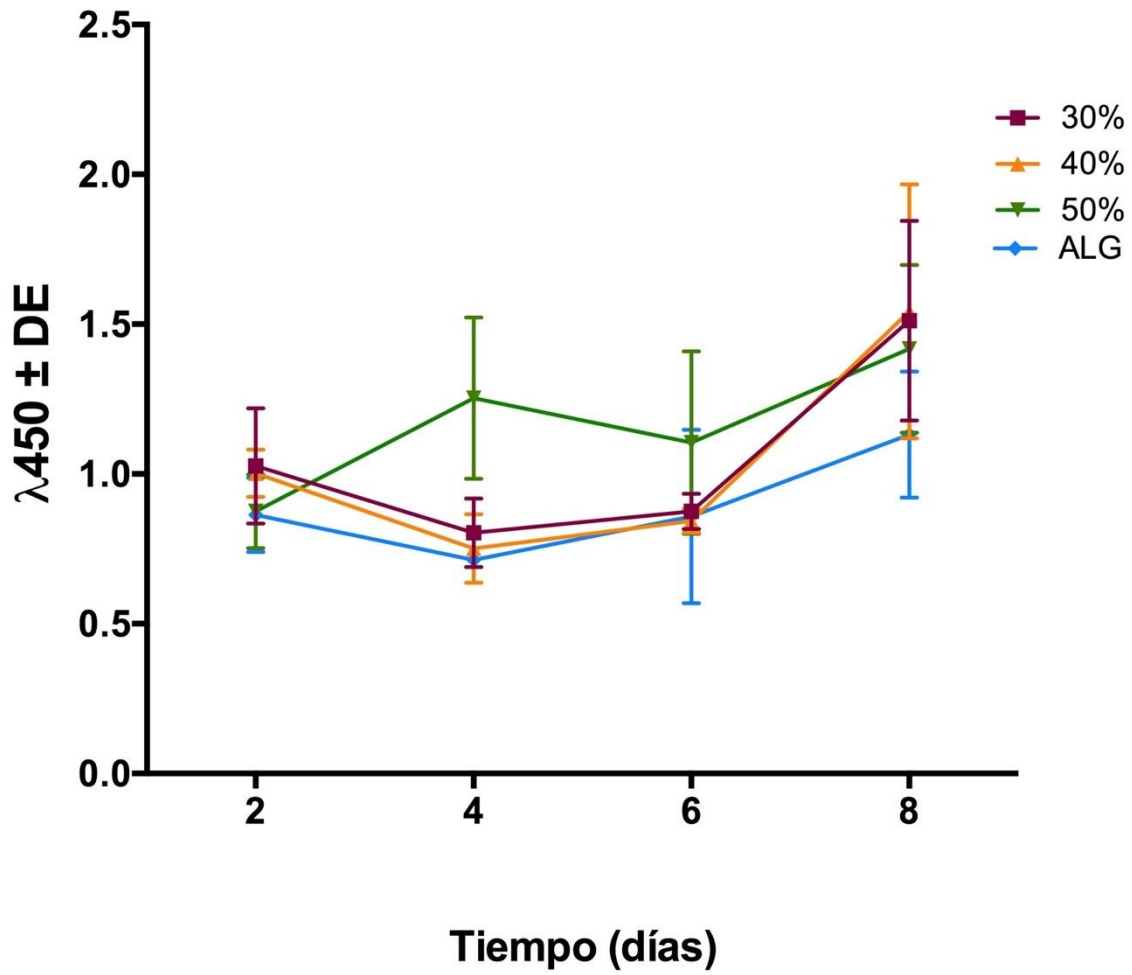
Realizando el análisis de la gráfica 2 podemos deducir que el mayor porcentaje de adhesión se dio dentro de los primeros cuatro días en los todos los diversos andamios, incluyendo inclusive el de ALG, y si tomamos en cuenta la desviación estándar, podríamos pensar que el andamio con 30% de concentración de HA fue ligeramente superior para fomentar la adhesión celular, siguiéndole el de ALG y 40% HA y finalmente el que figuró menor adhesión durante las primeras cuatro horas fue el de 50% HA, sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, observamos que la adhesión celular correspondiente a las 24 horas resultó demostrar un efecto diferente en los andamios que aquel de las 4 horas. Probablemente esto se debe a que la mayor cantidad de células se adhirieron al andamio durante las primeras 4 horas (como lo vemos en el andamio de 30% HA, por ejemplo). En contraste con el andamio de 50% HA que fue el que menor adherencia tuvo durante las primeras cuatro horas, pero mayor al de los demás andamios a las 24 horas.



**Gráfica 2** Adhesión celular a los diferentes andamios (ALG(sin HA), 30, 40 y 50% de concentración de nanocerámica de hidroxiapatita en andamios de alginato). <sup>F.D.</sup>

### Proliferación celular

En cuanto a la proliferación, sin duda podemos descartar que el andamio de ALG es buen sustrato para promover la proliferación celular, comparado con los otros que contienen los diferentes porcentajes de la nanocerámica de hidroxiapatita y esto lo vemos claramente en la gráfica 3. En cuanto a los diferentes porcentajes de HA los que demostraron ser mejores promotores de proliferación celular parecen ser el de 30% y 40% respectivamente, especialmente del sexto al octavo día percibimos un aumento considerable en su proliferación celular, sobrepasando aquél de 50% HA. Recordando las superficies que cada concentración de HA nos proporcionó, podríamos decir que se requiere una superficie con topografía superficial intermedia para promover la proliferación celular, ni tan lisa como aquella del andamio de ALG ni con demasiada textura como la que presenta la de 50% HA.



**Gráfica 3** Proliferación celular en los andamios (ALG(sin HA), 30, 40 y 50% de concentración de nanocerámica de hidroxiapatita en andamios de alginato), en 2, 4, 6 y 8 días respectivamente. <sup>F.D.</sup>

## IX. DISCUSIÓN

Respecto a la adhesión celular en la cual no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los andamios con HA y los que no la contenían, sería importante definir la calidad de la adhesión de las células al andamio, como lo han hecho algunos investigadores tal como Taesik Chae<sup>21</sup>, quien observó que los osteoblastos se encontraban adheridos con mayor estabilidad y acercamiento los unos con los otros en la superficie de los andamios de ALG/HA que en aquellos que solo contenían alginato. Observó que los osteoblastos se encontraban más aplanados, estirados y elongados. Por lo tanto, podríamos valorar la posibilidad de que si, tal vez se adhirieron en un número muy similar de células a todos, pero la calidad de la adhesión podría presentar diferencias en presencia de HA o incluso en las diferentes concentraciones que se valoraron en este estudio.

Debido al echo de que la proliferación celular indicó dar resultados superiores en los andamios con nanocerámica de hidroxiapatita, planteamos la hipótesis de que ésta respuesta celular se debe principalmente a la modificación química de la superficie por la nanocerámica de HA, al igual que Chae<sup>21</sup>, quien observó una relación directa entre la respuesta celular y la presencia de HA.

Sería importante completar una investigación de estas muestras para valorar el potencial de diferenciación celular que puede llegar a presentar cada andamio con las diferentes concentraciones de HA, para tener un panorama más amplio del posible éxito o fracaso que podría tener cada uno de ellos sobre la respuesta celular.

Al igual resultaría de suma trascendencia el poder observar la respuesta celular dentro de un plazo de tiempo más largo que el que pudimos realizar en este trabajo. Menciono esto debido a que en estudios similares, hay autores como Valente<sup>36</sup> y Chae<sup>21</sup> que refieren haber observado diferencias significativas alrededor del quinto a séptimo día respectivamente.



## X. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se ha evidenciado que la concentración de HA tiene un efecto directo sobre la superficie estructural/topográfica de los andamios de alginato, y con esto a su vez un efecto directo sobre la respuesta celular que cada concentración puede llegar a tener sobre la respuesta celular. Además se ha logrado determinar que los andamios de alginato con  $\text{CaCl}_2$  entrecruzados con nanocerámica de hidroxiapatita presentan biocompatibilidad y demuestran ser mejores para promover la proliferación y adhesión celular que aquellos que no contienen HA. Recordando las superficies que cada concentración de HA nos proporcionó, podríamos decir que se requiere una superficie con topografía superficial intermedia (30 y 40%) para promover la proliferación y adhesión celular, ni tan lisa como aquella del andamio de ALG, ni con demasiada textura como la que presenta la de 50% HA. De los resultados previamente mencionados se puede concluir que los andamios de alginato/HA pueden ser una alternativa futura que puede funcionar como sustrato para regeneración en ingeniería tisular ósea craneofacial, aunque por supuesto falta investigación complementaria para que eventualmente estos materiales puedan ser utilizados en la clínica.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saltzman WM. *Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues.*; 2004.  
[http://books.google.com/books?id=KorDMxtkZ\\_wC&pgis=1](http://books.google.com/books?id=KorDMxtkZ_wC&pgis=1).
2. Dr. Raúl Rosales-Ibáñez, Biol. Keila Neri Alvarado-Estrada MCFO-G. Ingeniería Tisular en Odontología. *Rev Adm.* 2012;LXIX(4):164-167.
3. Zhang LG, Fisher JP, Leong KW. *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* San Diego, CA: Elsevier Inc.; 2015.
4. Cauich Rodríguez J V., Rosales Ibáñez R. *Ingeniería Tisular de La Articulación Temporomandibular.* Primera Ed. (Molina Miranda E, Manuel Robles J, eds.). México D.F.: Editorial Odontología Actual S.A. de C.V.; 2017.
5. Catanzano O, Soriente A, La Gatta A, et al. Macroporous Alginate Foams Crosslinked With Strontium for Bone Tissue Engineering. *Carbohydr Polym.* 2018. doi:10.1016/j.carbpol.2018.08.086
6. First PO. Dental Pulp Regeneration : Insights from Biological Processes  
Regeneración pulpar : Perspectivas desde los procesos biológicos.  
2017;1(20):10-16.
7. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: From research to dental clinics. *Dent Mater.* 2012.  
doi:10.1016/j.dental.2011.11.025
8. Sanchez-Lara PA, Zhao H, Bajpai R, Abdelhamid AI, Warburton D. Impact of Stem Cells in Craniofacial Regenerative Medicine. *Front Physiol.* 2012;3.  
doi:10.3389/fphys.2012.00188
9. Marra KG, Rubin JP. The potential of adipose derived stem cells in craniofacial repair and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2012;Mar,96(1): doi:10.1002/bdrc.21001
10. MacHado E, Fernandes MH, De Sousa Gomes P. Dental stem cells for craniofacial tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.*

2012. doi:10.1016/j.tripleo.2011.05.039
11. Bousnaki M, Bakopoulou A, Papadogianni D, et al. Fibro/chondrogenic differentiation of dental stem cells into chitosan/alginate scaffolds towards temporomandibular joint disc regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(7). doi:10.1007/s10856-018-6109-6
  12. Yang M, Zhang H, Gangolli R. Advances of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Dental Tissue in Craniofacial Tissue Engineering. 2014.
  13. Syed-Picard FN, Ray HL, Kumta PN, Sfeir C. Scaffoldless tissue-engineered dental pulp cell constructs for endodontic therapy. *J Dent Res*. 2014. doi:10.1177/0022034513517901
  14. Dean D, Wallace J, Siblani A, et al. Continuous digital light processing (cDLP): Highly accurate additive manufacturing of tissue engineered bone scaffolds. *Virtual Phys Prototyp*. 2012;7(1):13-24. doi:10.1080/17452759.2012.673152
  15. Kim J, McBride S, Fulmer M, et al. Fiber-reinforced calcium phosphate cement formulations for cranioplasty applications: A 52-week duration preclinical rabbit calvaria study. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2012. doi:10.1002/jbm.b.31920
  16. Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res*. 2012. doi:10.1177/0022034511417441
  17. Li G, Zhang T, Li M, et al. Electrospun Fibers for Dental and Craniofacial Applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014. doi:10.2174/1574888X09666140213151717
  18. Algul D, Sipahi H, Aydin A, Kelleci F, Ozdatli S, Yener FG. Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate-chitosan/ $\beta$ -TCP scaffold for osteochondral tissue. *Int J Biol Macromol*. 2015;79:363-369. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.005
  19. Navarro DM. Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. *Rev Cubana Estomatol*. 2014. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00737-013-0355-x

20. Pina S, Oliveira JM, Reis RL. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. *Adv Mater.* 2015;27(7):1143-1169. doi:10.1002/adma.201403354
21. Chae T, Yang H, Leung V, Ko F, Troczynski T. Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24(8):1885-1894. doi:10.1007/s10856-013-4957-7
22. Hirsch T, Laemmle C, Behr B, et al. Implant for autologous soft tissue reconstruction using an adipose-derived stem cell-colonized alginate scaffold. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2018;71(1):101-111. doi:10.1016/j.bjps.2017.08.009
23. Hu WW, Hu ZC. The control of alginate degradation to dynamically manipulate scaffold composition for in situ transfection application. *Int J Biol Macromol.* 2018;117(2017):1169-1178. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.016
24. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog.* 2009. doi:10.1002/btpr.246
25. Pawlina W, Ross MH. *ROSS Histología Texto y Atlas.*; 2015. doi:10.4103/0301-4738.44515.Copyright
26. Szpalski C, Wetterau M, Barr J, Warren SM. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques—Part I: Scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012. doi:10.1089/ten.teb.2011.0427
27. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta Biomater.* 2012. doi:10.1016/j.actbio.2011.11.017
28. Reznikov N, Shahar R, Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater.* 2014;10(9):3815-3826. doi:10.1016/j.actbio.2014.05.024
29. Ulrich D, Van Rietbergen B, Weinans H, Rügsegger P. Finite element analysis of trabecular bone structure: A comparison of image-based meshing techniques. *J Biomech.* 1998;31(12):1187-1192. doi:10.1016/S0021-

9290(98)00118-3

30. Bohner M, Loosli Y, Baroud G, Lacroix D. Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. *Acta Biomater.* 2011. doi:10.1016/j.actbio.2010.08.008
31. Butscher A, Bohner M, Hofmann S, Gauckler L, Müller R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomater.* 2011. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.039
32. Ross CF, Berthume MA, Dechow PC, et al. In vivo bone strain and finite-element modeling of the craniofacial haft in catarrhine primates. *J Anat.* 2011. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01322.x
33. Hung BP, Hutton DL, Grayson WL. Mechanical control of tissue-engineered bone. *Stem Cell Res Ther.* 2013. doi:10.1186/scrt158
34. Mehrali M, Shirazi FS, Mehrali M, Metselaar HSC, Kadri NA Bin, Osman NAA. Dental implants from functionally graded materials. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2013. doi:10.1002/jbm.a.34588
35. Temple JP, Hutton DL, Hung BP, et al. Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014. doi:10.1002/jbm.a.35107
36. Valente JFA, Valente TAM, Alves P, Ferreira P, Silva A, Correia IJ. Alginate based scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 2012;32(8):2596-2603. doi:10.1016/j.msec.2012.08.001