



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.



**DESARROLLO DE CULTIVOS 3D POR LA TÉCNICA DE GOTA COLGANTE PARA
APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS PERIODONTALES.**

T E S I S.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

RENÉ JIMÉNEZ ROMUALDO

TUTOR: Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

ASESOR: Dr. OSMAR ALEJANDRO CHANES CUEVAS

México, Cd. Mx. Agosto, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A LA REALIZACIÓN DEL SUEÑO AMERICANO.

“No preguntes que puede hacer tu país por ti; mejor pregunta que puedes hacer tú por tu país”.

JOHN FITZGERALD KENNEDY.

Enero 20 de 1961.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de la nación por haberme aceptado en la Facultad de Odontología hace 6 años a través del examen de admisión permitiéndome cumplir un objetivo de años en espera; por brindarme los recursos académicos, materiales, docentes, científicos, etc., para convertirme en profesionista al servicio de la salud.

A la Dirección de Becas y Enlace con la Comunidad – DGOAE_UNAM por su apoyo en la elaboración de este trabajo a través del programa: “BECA DE TITULACIÓN-ALTO RENDIMIENTO 2021-2022”.

A mi tutor de tesis: Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez por sus palabras de motivación como profesor de 1er año en la carrera, por recibirme en el laboratorio de bioingeniería de tejidos en la DEPel de la Facultad de Odontología para la realización de mi servicio social y para la elaboración de este trabajo de investigación.

A mis padres por su apoyo y asistencia durante la realización de este objetivo.

A la Dra. en ciencias médicas y odontológicas María Verónica Cuevas González por su asesoría y consejos en la elaboración de este proyecto.

Al matrimonio de cirujanos dentistas: Sandra Rodríguez Mejía y Marco Antonio Morales Lugo por sus consejos, su apoyo, su tutela y por haberme abierto las puertas de sus consultorios, así como de su hogar en los primeros pasos de mi ejercicio profesional.

Agradezco el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM: PAPIIT IN213821 que ha permitido la realización de esta investigación.

Agradezco el apoyo por parte del CONACYT a través del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación de tesis de licenciatura.

ÍNDICE

Contenido	Página
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. MARCO TEÓRICO.	4
3.1 ¿QUÉ ES EL PERIODONTO?	4
3.1.1 Características clínicas del periodonto.	5
3.2 ESTRUCTURA DEL PERIODONTO.	6
3.2.1 La encía	7
3.2.2 El hueso alveolar	9
3.2.3 Cemento radicular	13
3.2.4 El ligamento periodontal	18
3.3 ¿QUÉ ES LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)?	22
3.3.1 Composición general de la matriz extracelular del periodonto.....	24
3.3.2 Variaciones de la MEC.	26
3.4 CULTIVOS TRIDIMENSIONALES.	28
3.4.1 Cultivos de gota colgante.	33
IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO	37
V. HIPÓTESIS	38
VI. OBJETIVOS.	39
6.1 General	39
6.2 Específicos.	39
VII. METODOLOGÍA.	40
7.1 Cultivo celular en monocapa.	40

7.2 Técnica de cultivo celular en gota colgante.	40
7.3 Proliferación celular.	41
7.4 Morfología del esferoide 3D formado	41
7.5 Análisis estadístico.	41
VIII. RESULTADOS	42
IX. DISCUSIÓN	47
X. CONCLUSIÓN.	49
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	50

I. RESUMEN.

El cultivo celular en 3D ha estado emergiendo en los últimos años, convirtiéndose en una técnica esencial en múltiples áreas de la biología celular. Estos tipos de cultivo constituyen un paso imprescindible en campos como la ingeniería tisular y medicina regenerativa. Si bien los cultivos celulares de monocapa tradicionales o bidimensionales (2D) que se mantienen en condiciones estáticas han proporcionado grandes avances en la comprensión de los procesos reguladores fisiológicos de las células, este tipo de cultivos en monocapa a menudo no reflejan la morfología y funcionalidad de sus fenotipos tridimensionales nativos.

Estas limitantes han llevado al desarrollo de modelos de cultivo celular en 3D que permita reproducir mejor la complejidad intrínseca de la señalización célula-célula, así como la plasticidad en composición y estructura de la matriz extracelular (MEC). Se ha demostrado que los cultivos 3D favorecen el mantenimiento de fenotipos específicos de tejido y una citoarquitectura similar al tejido nativo.

II. INTRODUCCIÓN.

El periodonto (**PERI** = *alrededor*, **ODONTOS** = *dientes*) comprende los siguientes tejidos: la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar propiamente dicho¹⁻³. La función principal del periodonto es fijar el diente al tejido óseo y mantener la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad oral¹⁻⁴. Se ha dividido en 2 partes: **la encía**; cuya función principal es proteger los tejidos **y el aparato de inserción**; compuesto por el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar^{1,3}. El aparato de inserción, denominado también como “tejido de sostén de los dientes” constituye la unidad de desarrollo biológica y funcional^{1,2}.

El periodonto está sujeto a variaciones morfológicas y funcionales, así como cambios relacionados con la edad, con alteraciones funcionales y del medio ambiente bucal¹⁻⁴. Los dientes se unen al alvéolo por medio de haces de fibras de colágena (fibras principales) separadas por tejido conectivo laxo que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios.^{2,4}

El ligamento periodontal es el tejido que rodea las raíces dentales y se une al hueso alveolar.²⁻⁴ Dicho ligamento funciona como mecanismo de soporte y fijación dental por lo que se denomina ligamento periodontal¹⁻³. La unidad dentoalveolar comprende: cemento, ligamento periodontal y el hueso alveolar^{2, 3}. La función principal de la unidad dentoalveolar es el soporte, además de la formativa, nutritiva y sensitiva^{2,3}. La función de soporte consiste en el mantenimiento y retención del diente; la formativa es necesaria para la restitución de los tejidos: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar.^{2, 3} A

esta función se vinculan 3 células especializadas: cementoblastos, fibroblastos y osteoblastos².

La enfermedad periodontal constituye la evolución aguda y crónica de las enfermedades gingivales en donde la salud del periodonto está comprometida por la sinergia de factores físicos, microbiológicos, fisiológicos e inmunológicos que perjudican la estabilidad y funcionamiento óptimo del aparato estomatognático; en consecuencia, la calidad de vida del paciente². La periodontitis localizada y generalizada está determinadas por la cantidad y grado de perjuicio de los tejidos periodontales afectados durante la evolución de la enfermedad en el periodonto por lo que el reto actual en la Odontología integral es proporcionar novedosas y eficientes técnicas de tratamiento periodontal⁵. Para tal objetivo, la Odontología se correlaciona con la ingeniería de tejidos siendo esta una disciplina científica coadyuvante en el campo interdisciplinario en las ciencias de la salud que contribuye con alternativas específicas-especializadas en el enfoque odontológico-periodontal, este nuevo campo de conocimiento altamente prometedor, propone nuevas terapias que implican la regeneración o reemplazo de tejidos u órganos a través de modelos tridimensionales tisulares que devuelven la forma y función a partir de las propias células del paciente en conjunto con biomateriales y biomoléculas^{2,5}.

III. MARCO TEÓRICO.

3.1 ¿Qué es el periodonto?

El periodonto normal proporciona el apoyo necesario para mantener los dientes en función¹⁻⁴. Consiste en cuatro componentes principales: *encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar*⁶⁻¹¹. Cada uno de estos componentes periodontales tiene distinta ubicación, arquitectura de tejido, composición bioquímica y composición química, pero todos estos componentes funcionan juntos como una sola unidad^{1-4,6-13}. (FIGURA 1).

El desarrollo de los tejidos periodontales ocurre durante el desarrollo y la formación de los dientes, un proceso que comienza temprano en la fase embrionaria cuando las células de la cresta neural migran al interior del primer arco braquial^{3, 10-12}. Desde esta posición, las células de la cresta neural forman una banda de ectomesenquima por debajo del epitelio del estomodeo y después que las células indiferenciadas de la cresta neural alcanzan su lugar en el espacio del maxilar; el epitelio del estomodeo libera los factores que inician las interacciones epitelio-ectomesenquimáticas^{7,10}. Producidas estas interacciones, el ectomesenquima predomina en el desarrollo interior, posteriormente a la formación de la lámina dental se inician los estadios de brote, casquete, campana con el desarrollo de la raíz que dan como resultado la formación de un órgano dental y sus tejidos periodontales circundantes^{7, 8, 10-12}. Para la formación de un diente y su aparato de inserción, la información biológica necesaria reside dentro de los tejidos del órgano dental y del ectomesenquima que lo rodea, el diente es el formador del complejo pulpo-dentinario y el folículo dental es el órgano formador del aparato de inserción^{7,10-12}.

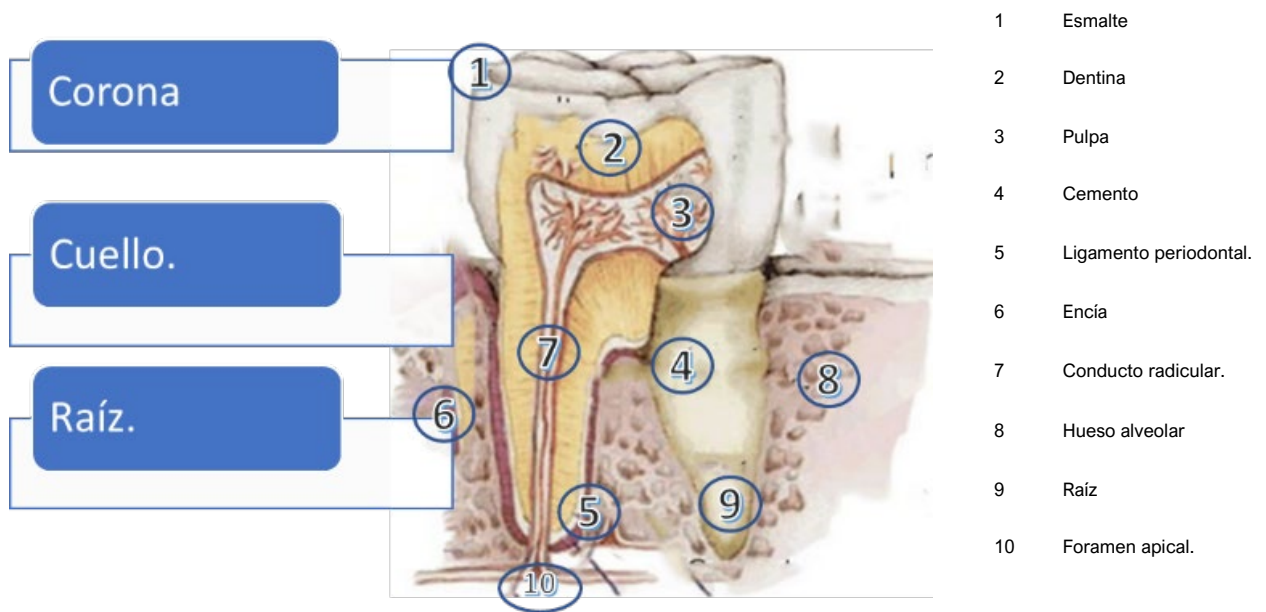


FIGURA 1. ESTRUCTURAS DEL ÓRGANO DENTAL Y EL PERIODONTO. Fuente propia elaborado con: Adobe Inc. Adobe Photoshop [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.adobe.com/products/photoshop.html>.

3.1.1 Características clínicas del periodonto.

En un adulto, la encía normal cubre el hueso alveolar y la raíz del diente a un nivel apenas coronal a la unión amelo cementaria^{1-4, 6-9, 13}. La encía se divide anatómicamente en áreas marginal, adherida e interdental; cada una distintas en diferenciación, histología y grosor de acuerdo con sus funciones, pero estructurados específicamente contra daños mecánicos y microbiológicos⁶⁻⁹.

La encía marginal e insertada se describe de color rosa coral producido por el suministro vascular, el espesor y grado de queratinización del epitelio con la presencia de células con pigmento^{1, 7, 9, 13}. La encía insertada está delimitada de la mucosa alveolar adyacente vestibular por una línea mucogingival bien definida^{6, 9, 13}. El color varía entre personas y se relaciona con la pigmentación cutánea, siendo más claro en individuos de piel blanca comparados con los de piel morena y oscura^{6, 9, 13}.

3.2 Estructura del periodonto.

El periodonto está formado por los tejidos de soporte y protección del diente: la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar. **Se ha dividido en dos partes:** *la encía*, cuya función principal es proteger a los tejidos; y *el aparato de inserción*; compuesto por el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar^{1-4, 6-9, 13}. Al aparato de inserción periodontal que fija los órganos dentarios a los maxilares, lo constituyen el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar^{2, 6-10, 13}.

El también denominado “tejido de sostén de los dientes” constituye una unidad de desarrollo biológica y funcional, siendo su función principal fijar el diente al tejido óseo y mantener su integridad en la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad oral^{7, 8, 10}. Los órganos dentarios se unen a los alvéolos por medio de haces de colágena (fibras principales), separadas por tejido conectivo laxo que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios^{7, 8, 11-12}.

3.2.1 La encía.

La mucosa bucal se compone de estas tres zonas:

1. *La mucosa masticatoria*: formada por la encía y la cubierta del paladar duro;
2. *Mucosa especializada*: ubicada en el dorso de la lengua;
3. *La membrana de la mucosa de revestimiento*: que reviste el resto de la cavidad bucal; la encía es la parte de la mucosa bucal que cubre los procesos alveolares de los maxilares y rodea los cuellos de los órganos dentario^{2,6,7,9}.

La encía es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea cervicalmente a los dientes, se compone de una capa epitelial y un tejido conjuntivo subyacente denominado *lámina propia*, en sentido opuesto, es de color rosado coralino y termina en el margen gingival libre que tiene contornos festoneado^{3,4,7,9}. Apicalmente, la encía continúa con la mucosa alveolar laxa y de color rojo más oscuro que está separada por una línea demarcatoria fácilmente reconocible: la unión mucogingival o línea mucogingival^{3,4,7}.

Las tres partes de la encía: *libre, interdental y adherida o insertada*^{3,4}.

La encía marginal o libre, es el extremo terminal o borde de la encía que rodea los dientes a manera de collar^{3,6}. Es de color rosado coralino, opaca y firme consistencia,^{7,9} comprende el tejido gingival en las caras lingual o palatina de los dientes^{7,9}. Vestibular y lingualmente, la encía libre se extiende desde el borde gingival apicalmente hasta el surco gingival libre a la altura de la unión amelocementaria^{7,9}. En general tiende a ser gruesa y redonda debido a la forma abultada de los dientes primarios y a la constricción cervical de su corona y contrasta con el margen en filo de cuchillo observado en los dientes permanentes^{2,3}.

La encía interdental (las papilas interdentes) ocupa la tronera gingival; es el espacio interproximal bajo el área de contacto dental y puede ser piramidal o tener una forma de “collado”^{3,4,6}. En la primera, la punta de una papila se encuentra inmediatamente por debajo del punto de contacto; la segunda presenta una depresión tipo valle que conecta una papila vestibular y lingual y se ajusta a la forma del contacto proximal^{3,4,6}. La forma de la encía interdental es determinada por la relación de contacto entre dientes adyacentes y por el ancho de sus caras proximales, en zonas del arco dentario donde existen diastemas como en el sector anterior de la dentición primaria o en los espacios primates, así como en dientes permanentes en proceso eruptivo, la papila interdental toma una forma de “*silla de montar*”^{1,3,6}. Luego cuando estos espacios se cierran durante el desarrollo normal, la papila llena totalmente el espacio interdental^{4,9}. En los sectores anteriores de la dentadura, la encía interdental es de forma piramidal, en la región molar son más aplanadas en sentido vestíbulo-lingual^{2,7}. Entonces la forma de la papila interdental se adapta al contorno de las superficies de contacto interproximales en las regiones premolares-molares formando una cavidad denominada “*col*” lo que genera una porción vestibular y otra lingual-palatina que define la forma de la encía interdental^{1,7,13}.

Apicalmente, *la encía adherida* está delimitada por la unión mucogingival y se continúa con la mucosa alveolar^{1,4,7}. La encía adherida es una continuación de la encía marginal, es firme, resistente y se une fuertemente al periostio subyacente del hueso alveolar^{3,6,7}.

El aspecto labial se extiende hasta la movable y laxa mucosa alveolar, demarcada por la unión mucogingival^{3,4,6}. Es de textura firme, de color rosado coralino y con pequeñas depresiones en su superficie^{4,7,9}. El ancho de la encía insertada en el aspecto labial difiere en diferentes áreas de la boca; en general es más grande en la región de los incisivos y

más estrecho en los segmentos posteriores^{2,3,6}. En la dentición primaria es más flácida debido a una menor densidad del tejido conectivo y carece de puntillado o comienza a observarse alrededor de los 3 años y es menos ancha en los niños en comparación con los adultos, varía durante los procesos eruptivos y exfoliativos^{4,9,13}.

3.2.2 El hueso alveolar.

El hueso es un tejido mesodérmico muy especializado compuesto por matriz orgánica y materia inorgánica; la primera, está constituida por la red de osteocitos y sustancia extracelular mientras la inorgánica por Ca^{+2} , $(\text{PO})_4$ y $(\text{CO})_6$ en forma de cristales de apatita^{2,8}. El hueso se establece primeramente como una estructura abierta de hueso esponjoso y posteriormente se vuelve compacto^{2,8}. El hueso se compone de osteocitos incluidos en una matriz extracelular calcificada, cada célula dentro de su propia laguna y a partir de esta, se despliegan los canalículos que se comunican con los de lagunas adyacentes^{8,13}.

Como otras partes del esqueleto, bajo condiciones normales el estado fisiológico del hueso depende de la edad y sus funciones^{2,8,13}. El tejido óseo de los maxilares experimenta intercambios constantes, la formación y la resorción ocurren de manera continua, pero existe un equilibrio fisiológico en ambos siendo la primera vista como una capa marginal de osteoide en relación con una capa de osteoblastos poliédricos mientras que la resorción se caracteriza por la existencia de osteoclastos multinucleados o células de tejido conectivo en concavidades irregulares en el margen del hueso^{8,12,13}.

El hueso que alberga al diente depende de la función ejercida por este último para conservar su estructura^{1-3,6-8}. La apófisis alveolar es la parte de los maxilares superior e inferior que forma y sostiene los alvéolos de los dientes, se extiende desde el hueso basal de los maxilares y su desarrollo es simultáneo con el desarrollo y la erupción de los dientes^{1,2,7}. Está compuesta por hueso que se forma tanto por células del folículo dental como por células independientes de ese folículo y constituye el aparato e inserción del diente cuya función principal es distribuir las fuerzas que genera la masticación y otros contactos⁷. **(FIGURA 2)**

El hueso alveolar se desarrolla alrededor del folículo dental durante la osteogénesis, cuando se muda un diente deciduo este se reabsorbe^{3,4,6}. El diente permanente sustituto se mueve hacia su lugar y desarrolla su propio hueso alveolar a partir de su propio folículo dental y a medida que se forma la raíz del diente y los tejidos circundantes se desarrollan y maduran, el hueso alveolar se fusiona con el hueso basal que se desarrolla de manera separada convirtiéndose en una estructura continua^{3,6}.

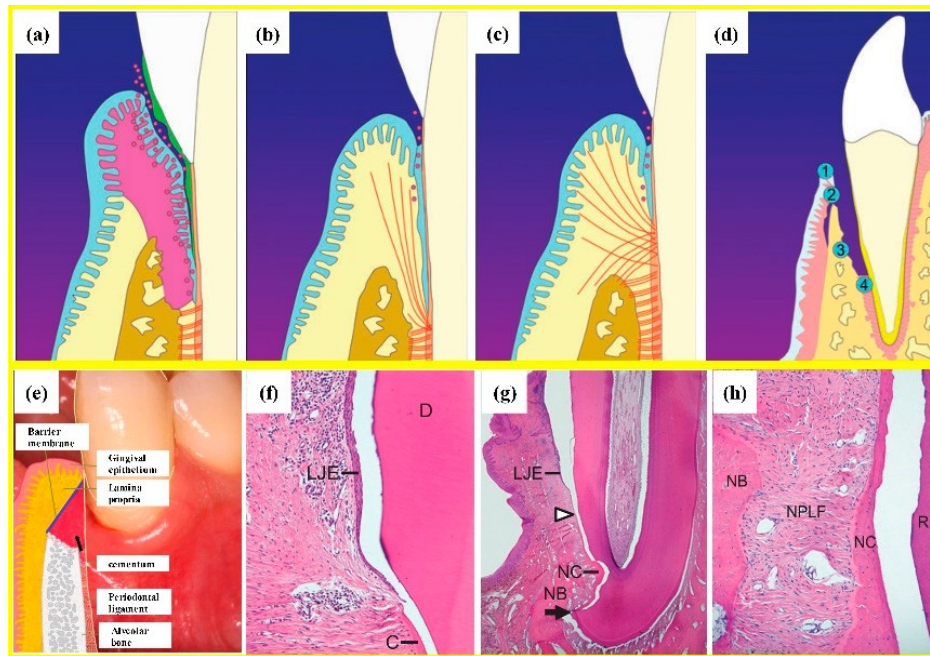


FIGURA 2. REGENERACIÓN PERIODONTAL. (a) tejido blando inflamado y reabsorción ósea en la periodontitis; (b) reparación del epitelio de unión largo periodontal (LJE); (c) regeneración periodontal ideal; (d) esquema de los cuatro compartimentos periodontales: 1 epitelio gingival oral; tejido conjuntivo gingival 2; hueso 3; PDL 4; (e) esquema de regeneración tisular guiada (GTR). (f) la micrografía óptica muestra LJE que termina en el extremo más coronal del cemento regenerado (C) y la dentina (D); (g) LJE y periodontal parcial regeneración, indicada por la formación de cemento nuevo (NC) y hueso nuevo (NB). la punta de flecha indica el extremo apical del epitelio de unión, mientras que la flecha muestra el borde apical del defecto. (h) micrografía óptica que muestra la regeneración periodontal, con la formación de nuevas fibras PDL (NPLF) adhiriéndose a NB y NC. R: raíz.

Imagen obtenida en:
 Bosshardt, D.D.; Sculean, A. Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontol.* 2000 2009, 51, 208–219.
 Siaili, M.; Chatzopoulou, D.; Gillam, D.G. An overview of periodontal regenerative procedures for the general dental practitioner. *Saudi Dent. J.* 2018, 30, 26–37.

Puesto que los procesos alveolares se desarrollan y experimenta remodelado con formación y erupción de los dientes son estructuras óseas que dependen de los dientes^{1-3,6,8}. El hueso alveolar es depositado junto al ligamento periodontal y se sostiene a sí mismo por el hueso de soporte, a través del proceso óseo interradicular corren haces nervioso, venas y una o más arterias largas; sus ramificaciones penetran el ligamento periodontal por las múltiples aberturas de las placas cribiformes^{2,6,8,11}. El proceso alveolar puede dividirse en áreas separadas de forma anatómica, pero funciona como una unidad pues todas las partes están interrelacionadas en el apoyo de los dientes^{1,3,6}.

El proceso alveolar consiste en:

1. Una lámina externa de hueso cortical formada por hueso haversiano y láminas óseas compactas;
2. Hueso alveolar propiamente dicho es la pared alveolar interna de hueso compacto y contiene una serie de aperturas (placa cribiforme) a través de las cuales los haces neurovasculares unen el ligamento periodontal con el hueso trabecular;
3. El tabique interdental se compone de hueso trabecular de apoyo dentro de un límite compacto^{1,2,6}.

La mayoría de las porciones vestibulares y linguales de los alvéolos están conformadas solo por hueso compacto; el hueso trabecular rodea la lámina dura en las áreas apical, ápico-lingual e interradicular y en la mandíbula incluyen hueso basal que es la porción de la mandíbula situada apicalmente pero que no está relacionada con los dientes⁶.

3.2.3 Cemento radicular.

Es un tejido mineralizado especializado que recubre las superficies radiculares y pequeñas porciones de las coronas de los dientes y puede extenderse hacia el conducto radicular^{1-4,7,10}. No contiene vasos sanguíneos ni linfáticos, carece de inervación, no experimenta remodelación ni resorción fisiológica, pero se sigue depositando toda la vida^{7,10}. Es tejido mesenquimal calcificado y avascular que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica; los 2 tipos principales son: acelular (primario) y celular (secundario), ambos consisten de una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas de colágena^{1-4,6-9}.

(FIGURA 3).

Contiene fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica; fija las fibras principales del ligamento periodontal a la raíz y contribuye en el proceso de reparación cuando la superficie radicular ha sido dañada⁷⁻¹⁰. Las dos fuentes principales de fibras colágenas en el cemento son:

1. fibras de Sharpey (extrínsecas); son la porción incluida de fibras principales del ligamento periodontal y están formadas por fibroblastos;
2. fibras que pertenecen a la matriz del cemento (intrínsecas) y son producidas por los cementoblastos^{1-4,6}.

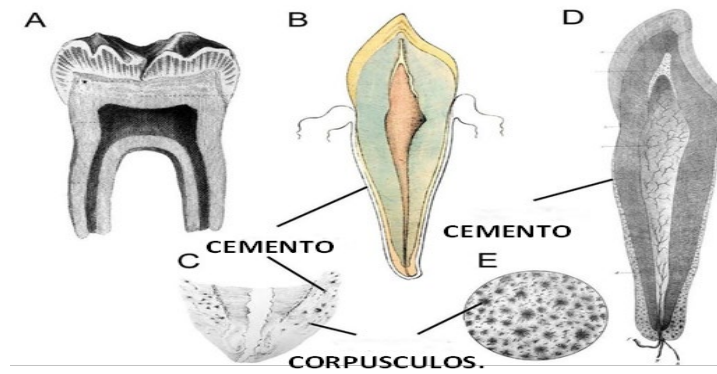


FIGURA 3. REPRESENTACIONES DE CEMENTO EN LOS PRIMEROS LIBROS DE TEXTO DENTALES.

A) Sección transversal de un molar adulto de un manual dental de Robertson (1839), sin indicación de la existencia de cemento radicular. (B) Un dibujo "moderno" pero simplista de un diente canino humano adulto de un libro de texto de Lintott (1841), que representa el cemento delgado (acelular) en el cuello y el cemento más grueso en el vértice de la raíz. (C) Un boceto del cemento celular y sus corpúsculos de Purkinje (cementocitos) por Lintott. (D) Una sección transversal de un incisivo de Goddard (1845) que indica el cemento de la raíz del diente y (E) una vista ampliada de los corpúsculos (cementocitos). **Imagen obtenida en.** doi: 10.1111/jre.12444..

La mayor proporción de la matriz orgánica del cemento está compuesta por colágena tipo I (90%) y tipo III (5%)^{1,2,6,10}. Es un tejido duro cuya sustancia intercelular se calcifica y se presenta en capas alrededor de la raíz dental, su contenido mineral es principalmente hidroxiapatita la que representa el 65% del peso^{6,7,10}. Las fibras de Sharpey constituyen una proporción considerable del volumen de cemento están compuestas por colágena tipo I y el tipo III^{1,3,6}.

Su formación es más rápida en las regiones apicales, donde compensa la erupción de los dientes, que a su vez compensa la atrición; el espesor del cemento en la mitad coronal de la raíz varía de 16 a 60 μ m alcanzando su mayor espesor en el tercio apical y en las zonas de furcación, es más espeso en las superficies distales que en las mesiales, probablemente debido a la estimulación funcional de la migración mesial con el paso del tiempo^{6,10}.

Existen 2 tipos de cemento:

1. Acelular: es el primer cemento en formarse, es transparente y amorfo, compuesto por cementoblastos que depositan la sustancia sin llegar a incluirse en el cemento, cubre siempre la parte cervical del diente y ocasionalmente casi hasta la raíz, excepto en la porción apical, no contiene células y se forma antes de que el diente alcance el plano oclusal con un espesor aproximado entre 30 y 230 μm ⁶⁻⁸. Este tejido forma una capa delgada que cubre la superficie dental cuya densidad en esta área es de 20-50 μm cerca del cérvix, el cemento acelular su tamaño, número y distribución aumentan con la función, las fibras de Sharpey están completamente calcificadas con los cristales minerales orientados paralelos a las fibrillas, aunque también contiene fibrillas intrínsecas de colágena calcificadas y organizadas de manera irregular o paralelas a la superficie,^{1,3,6,10}.
2. Celular: formado después de que el diente alcanza el plano oclusal, es irregular y contiene células (cementocitos) en espacios individuales (lagunas) que se comunican entre sí mediante un sistema de canalículos anastomosados⁶. Es menos calcificado que el celular, tiene características similares al hueso y se puede formar tardíamente sobre el cemento acelular; los cementocitos se encuentran en el interior de las lagunas; las fibras de Sharpey pueden estar completa o parcialmente calcificadas o pueden tener un núcleo central no calcificado rodeado por un borde calcificado^{6,8}.

El cemento celular y acelular se organizan en laminillas separadas por líneas incrementales paralelas al eje longitudinal de la raíz describiendo las diferentes formas de cemento:

1. **Cemento acelular afibrilar:** principalmente en la parte cervical del esmalte, no contiene células ni fibras colágenas intrínsecas y extrínsecas excepto una sustancia fundamental mineralizada; es un producto de los cementoblastos y se encuentra como cemento coronal con un espesor de 1-15 μm ^{3,6,7}.
2. **Cemento acelular de fibras extrínsecas:** en las partes coronal y media de la raíz, contienen principalmente haces densamente compactados de fibras de Sharpey careciendo de células, es un producto de los fibroblastos y los cementoblastos; se encuentra en el tercio cervical de las raíces y puede extenderse apicalmente, es una parte importante del aparato de inserción que conecta el diente con el hueso alveolar propiamente dicho y su espesor es aproximadamente de 30-230 μm ^{3,6,7}.
3. **Cemento celular mixto estratificado:** en el tercio apical de las raíces y en las furcaciones, contiene fibras extrínsecas e intrínsecas y cementocitos; es un coproducto de los fibroblastos y los cementoblastos, su espesor es de 100-1000 μm ^{3,6,7}.
4. **Cemento celular de fibras intrínsecas:** contiene células, pero no extrínsecas de colágena, está formado por los cementoblastos en las lagunas de resorción y contiene fibras intrínsecas^{3,6,7}.

5. **Cemento intermedio:** es una zona mal definida cerca de la unión amelo dentinaria de algunos dientes que parece contener restos celulares de la vaina de Hertwig incluidos en la sustancia fundamental calcificada^{3,6}.

Los extractos de proteínas del cemento maduro promueven la inserción y la migración celular y estimulan la síntesis de proteínas de los fibroblastos gingivales y las células del ligamento periodontal^{1,3,6,7,10}. La osteopontina y la sialoproteína óseas son expresadas durante el desarrollo temprano de las raíces del diente por células en toda la superficie radicular y se cree que juegan un papel importante en la diferenciación de las células progenitoras de cementoblastos a cementoblastos^{6,10}.

Algunas de las proteínas que se encuentran únicamente en el cemento; es la proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP), proteína colágena derivada del cemento que ha demostrado promover la adhesión y propagación de tipos de células mesenquimales; los osteoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal muestran mejor adhesión que los fibroblastos y queratinocitos gingivales^{1,3,6,7,10}. Además, el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF) ha demostrado aumentar la proliferación de fibroblastos gingivales y células del ligamento periodontal^{6,10}.

3.2.4. El ligamento periodontal.

Se halla en el espacio situado entre las raíces de los dientes y la lámina dura (*hueso alveolar*) adquiriendo una forma de reloj de arena siendo más angosto en la raíz con un espesor aproximado entre 0.2-0.4 mm⁷. Se compone de un complejo vascular y tejido conjuntivo altamente celular que rodea la raíz del diente y lo conecta a la pared interna del hueso alveolar, se continúa con el tejido conjuntivo (*lamina propia*) de la encía y está delimitado de esta por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta ósea alveolar con la raíz comunicándose a través de los espacios de la médula a mediante canales vasculares en el hueso^{6,7}. **(FIGURA 4)**.

El ligamento periodontal consta de fibrillas colágenas dispuestas en haces que conectan el cemento con la superficie ósea alveolar, permitiendo que las fuerzas ejercidas durante la masticación y otros contactos dentarios se distribuyan y/o se han reabsorbidas sobre la apófisis alveolar; también es esencial para la movilidad dentaria ya que está determinada por el espesor, la altura y la calidad del ligamento^{7,8}. El ligamento periodontal consta de alrededor del 90% de la colágena y es insoluble^{2,3,8,10,11}.

En el ligamento periodontal está presente la sustancia fundamental que es la sustancia que llena los espacios entre las fibras y las células; consiste en 2 elementos: glicosoaminoglicanos (el *ácido hialurónico* y *proteoglicanos*) y glicoproteínas (*fibronectina* y *laminina*); además de un gran contenido de agua (70%)⁶. Los proteoglicanos de la superficie celular participan en la adhesión celular, interacciones célula-célula y célula-matriz, así como la unión a varios factores de crecimiento como correceptores y reparación celular, que son algunas funciones biológicas^{3,6,11}.

Las fibras periodontales aparecen en el cemento como múltiples haces relativamente delgados y divididos por elementos celulares de la capa cementoblástica^{1-3,8,11}. Dichos haces se diseminan y las fibras individuales de los haces adyacentes se entretrejen en una red que ocupa gran parte del ancho del ligamento^{2,8,11}.

El origen de las fibras y del hueso es similar al que se advierte en el cemento excepto que el número de haces de fibras individuales es menor y su diámetro es mayor que en este último^{2,8,11}. Dichos haces se diseminan y sus elementos fibrilares se incorporan a la red de fibras que atraviesan el ligamento^{2,8}.

Cerca de la parte media del ligamento, cruzan canales de tejido conectivo laxo el cual contiene vasos linfáticos, así como haces nerviosos y vasos sanguíneos que surgen a partir de la médula ósea del hueso de soporte configurando así una red anastomótica complicada^{2,3,8}. Los nervios son mielínicos y amielínicos, sus terminaciones semejan terminaciones libres entre las fibras, protuberancias en forma de aguja, anillos o asas que se localizan en torno a los haces fibrosos^{2,8}. Las terminaciones libres entre fibras son sensibles al dolor y algunas son propioceptivas por naturaleza, permitiendo la localización de estímulos de la masticación al mismo tiempo que controlan el músculo de esta función^{2,8,11}.

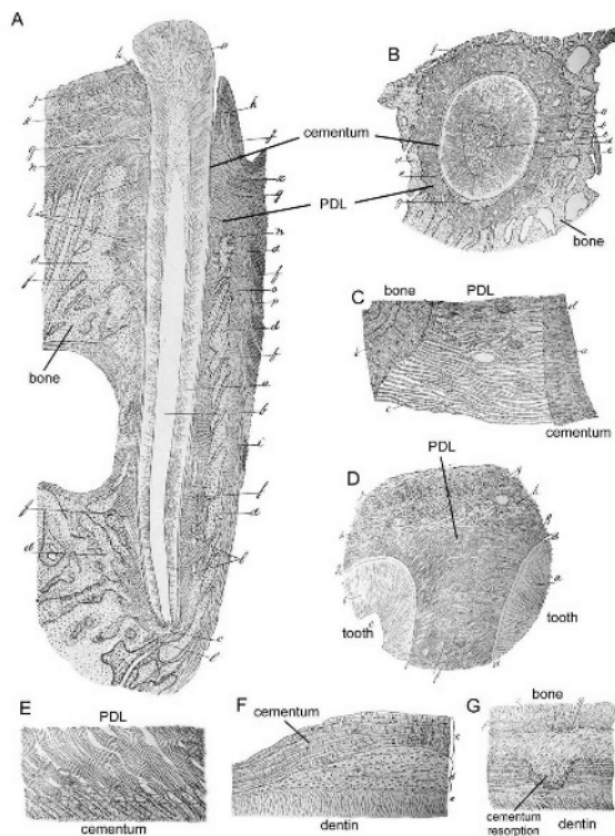


FIGURA 4. DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE INSERCIÓN PERIODONTAL

Figuras adaptadas de G.V. Black's A Study of the Histological Characters of the Periostium and Peridental Membrane (1887). (A) Sección de un incisivo pequeño de un gato que muestra la relación del diente con la periodoncia circundante, incluida una representación detallada del ligamento periodontal (PDL) y el hueso alveolar. (B) Sección transversal de un diente incisivo humano que ilustra las fibras del PDL que se irradian desde el cemento de la raíz del diente hasta el hueso alveolar circundante. (C) Imagen de mayor aumento que detalla las fibras de Sharpey que penetran en las superficies del hueso alveolar y el cemento. (D) Black informó que a veces había una conexión directa de las fibras principales entre los dientes adyacentes, como se muestra aquí en secciones de las raíces cervicales de los incisivos centrales y laterales humanos. (E) Se notó que haces compactos de fibras de Sharpey que emergen del cemento primario se rompen en "fascículos" más pequeños en este molar tomado de un anciano. (F) Hipertrofia del cemento en el cemento celular de un diente premolar. (G) Sección de un premolar humano que muestra una "absorción similar a un hoyo en el lado de la raíz" donde el cemento de reparación ha comenzado a ser depositado. **Imagen obtenida en:** doi: 10.1111/jre.12444.

Los elementos más importantes del ligamento periodontal son las *fibras principales* que son colágenas, están organizadas en haces y siguen un curso ondulado que se ve en sección longitudinal^{1,3,6}. Las porciones terminales de las fibras principales que se insertan en el cemento y el hueso se llaman *fibras de Sharpey* y una vez incluidas en la pared del alveolo o en el diente se calcifican significativamente^{3,6,11}.

Se asocian con proteínas no colágenas abundantes que se encuentran de forma normal en el hueso y que también han sido identificadas en el cemento dental; *estas proteínas son la osteopontina y la sialoproteína ósea* que contribuyen a la regulación de la mineralización y a la cohesión tisular en los sitios con aumento de tensión biomecánica^{1,3,6}. Además de la parte fibrosa del ligamento es posible advertir dentro de su estructura ciertos elementos celulares: *cementoblastos, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos y restos de células epiteliales*^{2,8,11}.

Por su ultraestructura pueden identificarse mediante la presencia de tono fibrillas en su citoplasma, desmosomas que conectan las células adyacentes, hemidesmosomas y por membrana basal alrededor de todo el resto celular^{2,8}.

En su morfología los fibroblastos se asemejan a los osteoblastos y cementoblastos; se pueden diferenciar entre sí con relativa seguridad debido a su localización que se relaciona con la superficie de tejido mineralizado^{3,6}.

Usualmente los fibroblastos del ligamento contienen vacuolas intracitoplasmáticas que encierran una o más fibras colágenas y estas indican actividad de enzimas lisosomales que a su vez sugieren que los fibroblastos contribuyen a la eliminación de colágena mediante endocitosis de fibras; no solo son una fuente de nueva colágena, intervienen en la destrucción de fibras colágenas ya formadas también^{2,8,11}.

La colágena es sintetizada por fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, odontoblastos y otras células, las fibras principales se componen sobre todo de colágena tipo I, mientras que las fibras reticulares se componen de colágena tipo III; la colágena tipo IV se encuentra en la lámina basal^{1,3,6}. La colágena tipo VI también ha sido inmunolocalizado en

la encía y el ligamento periodontal, la configuración molecular de las fibras colágenas le proporciona una resistencia a la tracción superior a la del acero^{6,11}.

El ligamento periodontal en las fibras crestales y apicales es el punto donde se lleva a cabo una rápida producción de colágena y un porcentaje elevado de síntesis de esta; la restitución y producción suceden a nivel molecular^{2,8}.

3.3. ¿Qué es la matriz extracelular (MEC)?

En el texto publicado en *A guide tour of the living cell* (Scientific American books, vol. 2, 1984); C. de Duve propone un viaje por la célula donde “*un citonauta de tamaño molecular, al dirigirse a una célula de un tejido animal, antes de encontrar la membrana plasmática, tiene la sensación de estar avanzando por una jungla de troncos, ramas y lianas*”. A esta maraña la denominamos matriz extracelular¹⁴.

Virchow, la definió como “la unidad anatomorfofisiologica del organismo y macromoléculas situadas en el espacio intersticial¹⁴”. La matriz extracelular (MEC) se define como la red tridimensional que engloba células; es considerada un complejo ecosistema de funciones vitales para la célula y tejidos en procesos como: multiplicación, preservación, procesos bioquímicos y de señalización; mismos que son indispensables para la supervivencia de los tejidos¹⁴⁻¹⁶. **(FIGURA 5)**.

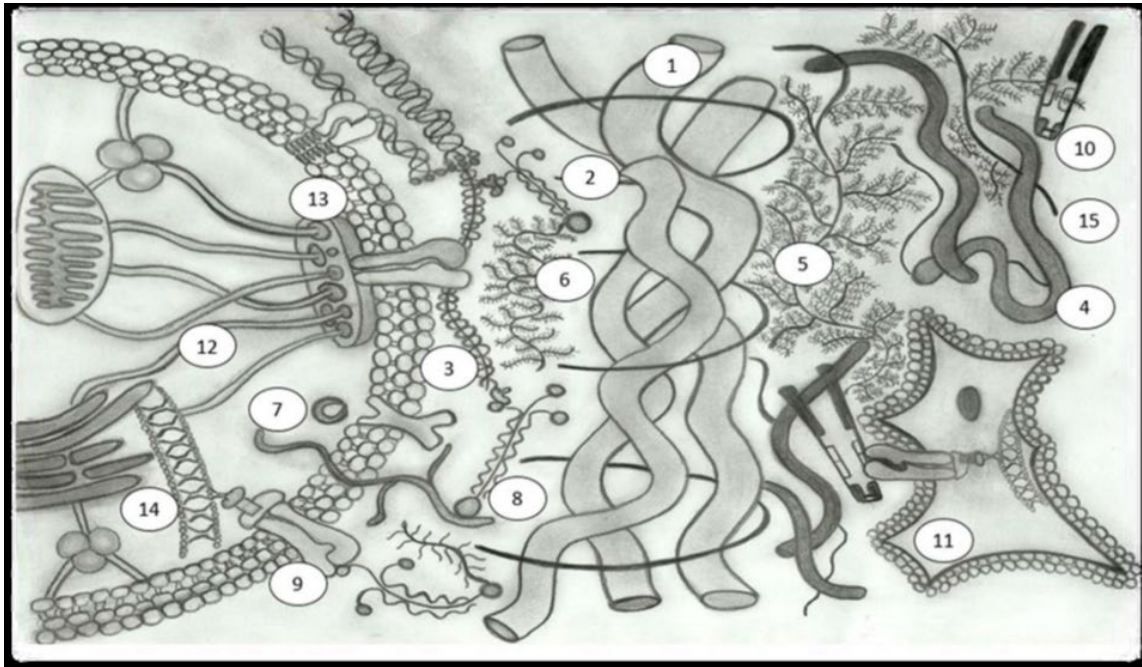


FIGURA 5. ESTRUCTURAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC). 1. Fibras reticulares (Colágena tipo III), 2. Asa de colágena tipo VII, 3. Colágena tipo IV, 4. Colágena tipo Fibrilar, 5. Proteoglicano, 6. Glicosaminoglicano, 7. Síndecan (Proteoglicano), 8. Laminina con entactina, 9. Integrina, 10. Fibronectina, 11. Fibroblasto, 12. Filamento Intermedio, 13. Hemidesmosoma con integrina $\alpha 6 \beta 4$, 14. Filamentos de Actina, 15. Elastina. Fuente propia elaborado con: Adobe Inc. Adobe Photoshop [Internet]. 2019 disponible en: <https://www.adobe.com/products/photoshop.html>.

Los tejidos no se encuentran únicamente constituidos por agrupaciones celulares, gran parte de su volumen está constituido por un conjunto de macro y micromoléculas que permiten crear las funciones específicas e inespecíficas en los diversos procesos de metabolismo y/o patologías¹⁵⁻¹⁷. La composición molecular de la MEC es típica de cada tejido y sus componentes son renovados continuamente por las células que los producen; esto supone que la MEC está en constante renovación^{14,15,17,18}.

La MEC se constituye por colágeno (tipos I, III, IV, VII); proteoglicanos (decorina, versicano, perlecano, variedad de glucoproteínas especializadas); fibronectina, laminina, integrinas, hemidesmosomas, elastina, entactina, fibrilinas, receptores de membrana, factores de crecimiento, glicosaminoglucanos y metaloproteinasas¹⁴⁻²⁰.

Dentro de esta complejidad de componentes se distinguen dos principales clases de macromoléculas extracelulares; *la primera*: se compone de cadenas de polisacáridos

de la clase glucosaminoglicanos (denominados como GAG`s), los cuales suelen encontrarse ligados a proteínas como proteoglucanos; *el segundo tipo* se constituye de proteínas fibrosas (colágena y elastina) y las proteínas adhesivas fibrosas (fibronectina y laminina) que se encuentran en la membrana basal¹⁶⁻²⁰.

Los cambios en estos componentes de la MEC pueden modular las interacciones de una molécula con el entorno, la matriz extracelular también sirve como depósito para una variedad de moléculas de señalización extracelulares que controlan el crecimiento y la diferenciación celular^{14,16,19}.

3.3.1 Composición general de la matriz extracelular del periodonto.

El microambiente extracelular es modelado y remodelado dinámicamente por solubilidad o a través de vesículas extracelulares asociadas a las proteasas secretadas en la MEC; por proteasas de adhesión a la membrana quienes forman el reticulado y por proteasas de remodelación^{14,15,19}. Del reticulado de la MEC la lisyl-oxidasa (LOX) y las transglutaminasas (TG`s) son la mayor familia responsable de establecer el encadenamiento del núcleo central y las proteínas del matrisoma¹⁴⁻¹⁶. **(FIGURA 6)**.



FIGURA 6. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR; MEC. Fuente propia elaborado con: Adobe Inc. Adobe Photoshop [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.adobe.com/products/photoshop.html>.

Sin embargo, un intrincado balance de las proteasas y sus inhibidores mantienen la homeostasis de la MEC; un remodelado anormal de la MEC está involucrado en el desarrollo y/o progresión de varias patologías debido a las modificaciones en la composición macromolecular, biofísica y propiedades biomecánicas^{15,18,19}.

El secretoma es la parte de las proteínas de la membrana que están encadenadas en la superficie de la célula y las que interactúan con la MEC secretando moléculas dentro de ella en forma soluble o dentro de las vesículas extracelulares¹⁴⁻¹⁶. Las proteínas fibrosas y los proteoglicanos son los dos principales componentes del núcleo del matrisoma¹⁵. Las proteínas fibrilares son las responsables de las funciones de soporte y las funciones adhesivas. Estas macromoléculas interactúan entre sí y pueden unirse a los factores de crecimiento^{11,14,16,18,20}.

Los proteoglucanos son proteínas conjugadas en cadenas GAG y son cruciales para conferir resistencia a las fuerzas de compresión en el periodonto^{1,3,6,11,15,16}. La mayoría de las GAG están cargadas altamente por aniones que atraen a los cationes Na⁺ y consecuentemente al H₂O contribuyendo a la viscosidad e hidratación en los tejidos de soporte periodontal^{1,3,6,15}. El condroitín, dermatán, heparán y queratán sulfato son los principales GAG's asociados con los proteoglucanos en los tejidos periodontales^{3,6,15,16}. El ácido hialurónico (HA) que es un GAG no sulfatado también se encuentra en la MEC periodontal¹⁵.

Dependiendo del tipo de GAG asociado a los proteoglucanos, este determinara su posición en el citoplasma, en la superficie celular o en la MEC^{14-16,19}. La mayoría de los proteoglucanos del heparán sulfato son anclados en la membrana celular a través de los dominios transmembranales o en los receptores de glucosilfosfatidilinositol, entonces los proteoglucanos pueden interactuar con la mayoría de las moléculas incluyendo las enzimas remodeladoras de la MEC y factores de crecimiento, quienes realizan un papel importante en la dinámica de la MEC^{15,16,19}.

3.3.2 Variaciones de la MEC.

Matriz extracelular fibroblástica. es una matriz fibrosa formada por colágena de tipo I y III, un proteoglicano, condroitín sulfato pequeño y fibronectina. La colágena de tipo I forma fibras complejas resistentes a elevada tensión; la fibronectina es una glucoproteína extensa que enlaza los fibroblastos a la matriz y es posible que intervenga en la fibrilogénesis; se encuentra distribuida en tejidos y en la sangre además que se enlaza a

numerosos tipos de colágena, como sulfato de heparán, fibrina y a muchas otras glucoproteínas de la matriz extracelular^{1-3,6-8,11,14,15}. La forma de las moléculas de fibronectina puede variar de globular a estructuras extendidas, dependiendo de la resistencia iónica y el pH del medio extracelular^{1-3,6-8,10-15}.

Matriz extracelular cartilaginosa. El cartílago es una matriz extracelular biológicamente específico^{1-3,6-8,11,14,15}. Los condrocitos están presentes en matrices homogéneas que contienen colágena de tipo II, un enorme proteoglicano condroitín sulfato, proteína de enlace, ácido hialurónico y la condronectina una glicoproteína de cartílago-específica^{1-3,6-8,15,16,18,19}.

En este tipo de matriz, las fibras colágenas son pequeñas y muy espaciadas, las moléculas de proteoglucano se unen junto con la proteína de enlace a lo largo de las franjas de ácido hialurónico y se pueden observar cómo grandes agregados que llenan los espacios entre las fibras colágenas^{1-3,6-8,14,16-19}. Los condrocitos se unen a la matriz mediante la condronectina, la cual se inserta al proteoglucano, a la colágena y a los receptores de las superficies celulares^{1-3,6-8,11,14,15}.

Matriz extracelular de células epiteliales. esta clase de matriz es única, las células epiteliales descansan sobre la matriz de la membrana basal que contiene colágena tipo IV, un enorme proteoglucano sulfato de heparán y la laminina de glicoproteína; estos tres componentes se advierten en toda la membrana basal y pueden interactuar en la configuración de una estructura supramolecular definida^{1-3,6-8,11-16,19}.

3.4 CULTIVOS CELULARES TRIDIMENSIONALES

El cultivo de tejidos convencional se lleva a cabo en superficies 2D sin que las células adopten morfologías naturales o se comuniquen de manera eficiente con sus vecinas²¹⁻²⁹. Este confinamiento 2D está muy alejado de las complejidades 3D del tejido vivo antes mencionadas^{21-23,25-27}. La ingeniería del microambiente del cultivo celular para crear condiciones de crecimiento que imiten con mayor precisión el comportamiento *in vivo* de las células es un paso esencial para mejorar la precisión predictiva durante el desarrollo biomédico²⁰⁻²⁹. Se ha demostrado, utilizando aplicaciones alternativas de cultivo celular, que el crecimiento y la función de las células como estructuras 3D multicelulares es significativamente diferente de su crecimiento como en cultivos monocapa 2D convencionales^{22,23,25-28}.

Tradicionalmente, los sistemas de cultivo celular 2D son un método estándar para la proliferación de células en las que crecen como una monocapa y no reflejan completamente la fisiología de los tejidos debido a algunas limitaciones en imitar condiciones multicelulares *in vivo*^{21-23,25-28,30,31}. Sin embargo, los entornos de cultivo celular tradicionales están muy lejos de los tejidos de la vida real²¹⁻³¹. *In vivo*, las células están respaldadas por un complejo 3D de la MEC, que facilita la comunicación célula-célula a través del contacto directo y mediante la secreción plétora de citosinas y factores tróficos^{11,12,21-32}. **(FIGURA 7).**

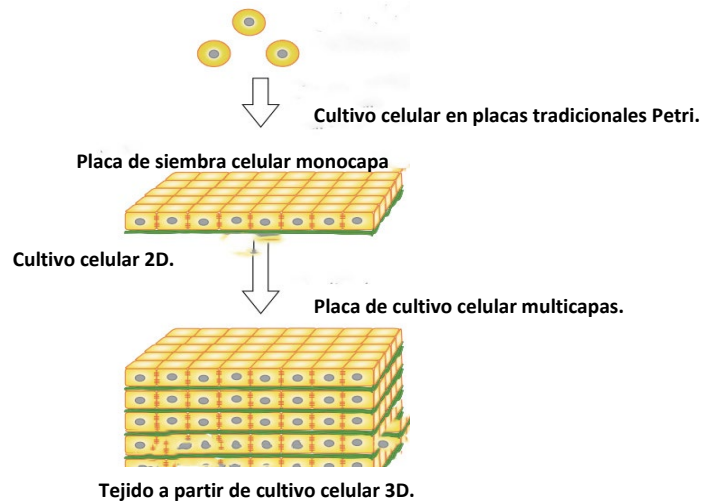


Figura 7. ESQUEMA DE CULTIVO MONOCAPA TRADICIONAL (2D) Y EL TRIDIMENSIONAL. Fuente propia elaborado con: Adobe Inc. Adobe Photoshop [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.adobe.com/products/photoshop.html>.

En contraste, el cultivo 3D podría imitar la especificidad del microambiente durante embriogénesis, morfogénesis y organogénesis^{11,12,21-23,25,27,30-33}. El diseño de sistemas de cultivo en 3D para el desarrollo de fármacos, por ejemplo, es una parte importante de este proceso. Los resultados muestran que el refinamiento del entorno *in vitro* influye significativamente en la forma en que las células responden a las moléculas pequeñas^{21-31,33,34}.

El microambiente celular es un factor importante en el mantenimiento de los fenotipos celulares^{11,12,22,25,26}. Las investigaciones indican que las células cultivadas generalmente *in vitro* en condiciones de cultivo 2D experimentan cambios rápidos en la rigidez y complejidad molecular de un microambiente 3D²¹⁻²⁷. Por ejemplo, las células en condiciones de cultivo 2D experimentan una mayor rigidez circundante y muestran una morfología polarizada debido a la adhesión celular restringida al plano $x - y$ ²¹⁻²⁴. Además, la falta de gradientes solubles y moléculas MEC en cultivos 2D puede afectar las funciones biológicas de la célula^{11,12,21-27}. **(FIGURA 8).**

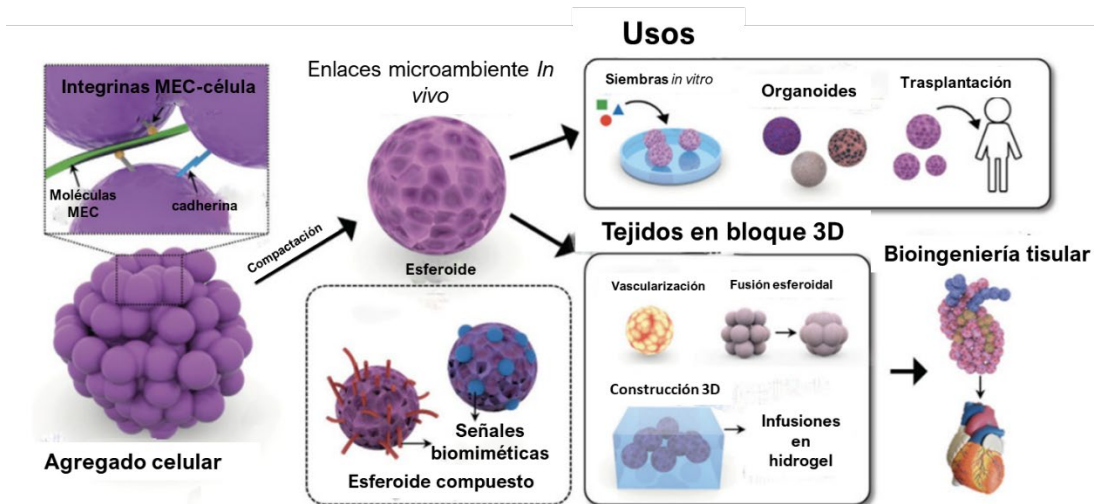


FIGURA 8. *CULTIVOS 3D Y SU APLICACIÓN EN LA BIOINGENIERÍA.* Fuente propia elaborada por: Adobe Inc. Adobe Photoshop [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.adobe.com/products/photoshop.html>

Por el contrario, las células que crecen en cultivo generalmente están confinadas en monocapa 2D (bidimensionales) sin muchas de las señales físicas y químicas que subyacen a su identidad y función *in vivo*²¹⁻²⁷. Estos factores son particularmente importantes cuando se considera el potencial de diferenciación dirigida de células madre *in vitro*²¹⁻³¹. Este tipo de cultivos, las células pueden comportarse de manera muy diferente dependiendo del sustrato de crecimiento empleado²¹⁻²⁶. Este creciente interés en cultivar células adherentes para desarrollar una construcción 3D es uno de los temas más importante para la bioingeniería de tejidos; iniciando una nueva área de investigación en técnicas de cultivo celular 3D por lo que existe una diferencia significativa entre el fenotipo celular y la respuesta biológica de células cultivadas en dos dimensiones (2D) *versus* sistemas de cultivo celular 3D²⁵⁻²⁹. **(FIGURA 9).**

Los problemas asociados con los injertos trasplantados en la ingeniería de tejido óseo han aumentado el interés en buscar y mejorar el diseño de construcciones celulares

tridimensionales (3D)²⁵⁻³⁴. Por tanto, la investigación se ha dirigido hacia la construcción de sistemas 3D como estrategias prometedoras en regeneración de tejidos, particularmente en el estudio de la formación de agregados multicelulares o esferoides, debido a su auto ensamblaje natural y conservación de la viabilidad con la hipótesis de que la provisión de un entorno espacial 3D superará algunas de las restricciones asociadas con el cultivo 2D^{21-23, 25-29}.

Para el cultivo rutinario de células en 3D, el desarrollo de cualquier nueva tecnología debe considerar cuestiones como el costo, la facilidad de uso, la aplicación y la reproducción, especialmente cuando la aplicación es para bioingeniería de tejidos^{21-23,25-27,30-32}. Los avances en esta área están comenzando a cerrar la brecha entre el cultivo celular tradicional y los entornos de tejidos vivos³²⁻³⁷.

Varias de estas tecnologías de fabricación se han aplicado en la elaboración de andamios porosos a base de polímeros^{20,30-42}. El polímero que forma el andamio está reticulado, lo que le da al material una mejor estabilidad estructural y resistencia incluso cuando se presenta como una membrana delgada^{32-38,42}. Por ejemplo, el poliácido láctico (PLA) es compatible con el protocolo con plasma de cultivo celular estándar, métodos de esterilización y si es necesario, se puede recubrir con reactivos de cultivo celular estándar como colágena o fibronectina^{30-35,37,38,42}.

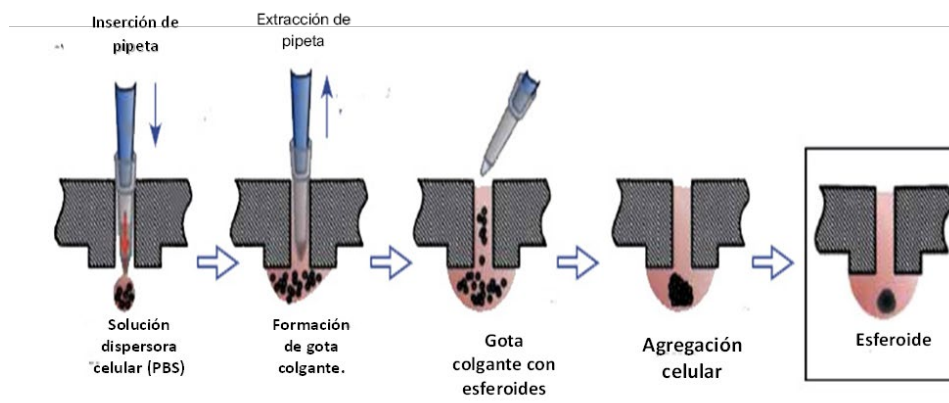


FIGURA 9. ESQUEMA DE CULTIVOS DE ESFEROIDES CELULARES. Fuente propia elaborado con: Adobe Inc. Adobe Photoshop [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.adobe.com/products/photoshop.html>

El PLA que se utiliza en esta tecnología produce un andamio a base de polímero que tiene una estructura relativamente uniforme^{30-35,37,42}. El armazón se forma por polimerización en una emulsión bifásica, que consta de una fase acuosa y no acuosa de monómero / tensioactivo, denominada HIPE (Hight interna pase emultion) *emulsión de alta fase interna* ^{30,31,33,34,37-41}. El producto de polímero resultante (poli-HIPE) consiste en una red porosa de huecos con plantilla, unida por poros interconectados³⁴⁻⁴¹. Estas estructuras en el material poli-HIPE final son altamente controlables mediante la manipulación de parámetros clave de fabricación^{34-38,40,41}.

Los polímeros se han desarrollado como una solución para el cultivo celular 3D de rutina y está diseñado para su incorporación en productos de cultivo celular existentes, como placas con orificios o insertos de pocillos^{20,22-28,32-34,37-42}.

El andamio diseñado es una membrana delgada de 200 μm de espesor para abordar el problema de la transferencia de masa, lo que permite que las células ingresen al material y permita un intercambio de masa suficiente de gases, nutrientes y productos de desecho durante el cultivo estático³⁰⁻³⁸.

Los cultivos de esferoides representan un simple sistema 3D, donde no se requiere andamio o material de soporte para crecimiento de células 3D y tiene ventajas significativas como facilitar la relación célula-célula y redes de interacción célula-matriz, proporcionando un ambiente fisicoquímico; donde secretan citosinas, quimosinas, y factores angiogénicos y mantienen fenotipos intrínsecos y propiedades idénticas a las *in vivo*, la morfología del tejido así como la función es diferente de las células en el sistema de cultivo monocapa^{11,12,14-17,19,21-24}. Hay varios métodos disponibles para generar esferoides 3D^{21,22}. Incluyen cultivo en matraces giratorios, el método de gota colgante, placas de fijación baja y microfabricación^{21-23,25-27}.

3.4.1 Cultivo de gota colgante

Además del cultivo celular monocapa, los esferoides han surgido en la ingeniería de tejidos como bloques de construcción para reconstituir tejidos 3D artificiales utilizados como futuros implantes para lesiones de tamaño considerable, lo que representa una tecnología de bajo costo²¹⁻²⁹. A diferencia de los enfoques generales en la ingeniería de tejidos donde se utilizan andamios, la fabricación de tejido 3D basada en esferoides puede maximizar interacciones célula-célula y minimizar los posibles efectos secundarios de la degradación de andamios^{21-25,28,29}.

Las técnicas de fabricación de esferoides se basan en el principio básico de autoensamblaje, debido a que se proporciona a las células diana un entorno que induce la cohesión espontánea de célula a célula al tiempo que inhibe la adhesión celular a los sustratos y minimiza el daño celular durante el proceso de autoensamblaje^{11,12,21,29}. **(FIGURA 9)**. Se han desarrollado varias técnicas como se ha mencionado previamente

para inducir el autoensamblaje de células y acelerar la formación de esferoides, que se resumen en la Tabla 1^{21,43}. Esto involucra distintos tipos de fuerzas fisicoquímicas, por ejemplo: fuerza gravitacional, fuerza centrífuga, superficie química, microestructural, onda acústica⁴³. Sin embargo, debe mencionarse que estos métodos tienen sus ventajas, desventajas y por lo tanto, el método depende de la aplicación que se quiere lograr para inducir la cohesión célula-célula para recolectar esferoides con tamaños controlados²⁵⁻

27,43.

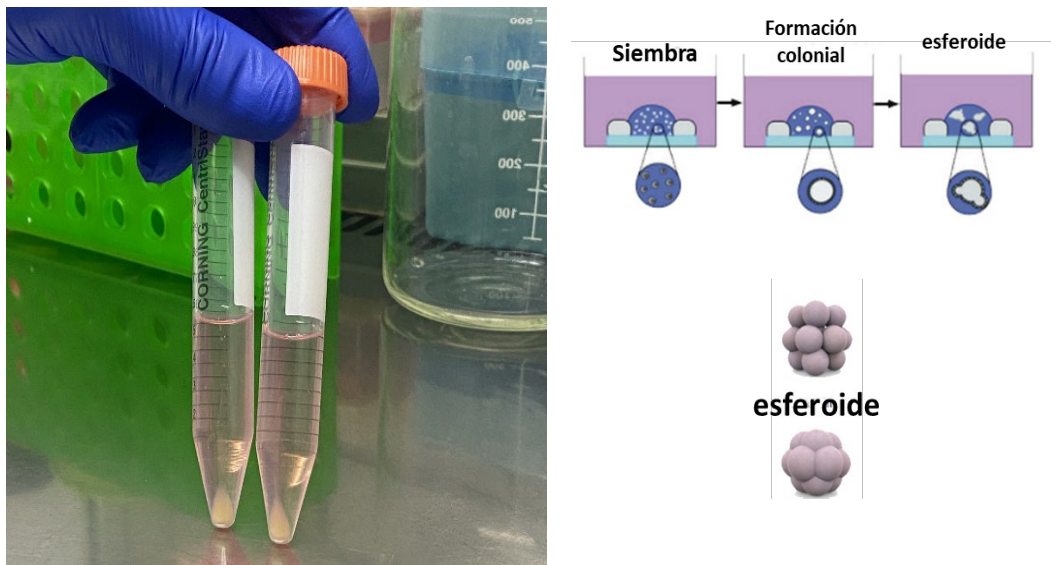


FIGURA 10. TÉCNICA DE SIEMBRA “GOTA COLGANTE”. Fuente propia elaborado con: Adobe Inc. Adobe Photoshop [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.adobe.com/products/photoshop.html>

Una de las técnicas que ha comenzado a abordar las limitaciones de las plataformas convencionales debido a que se está utilizando para el proceso de bioimpresiones, es la técnica de cultivo en gota colgante^{28,33-35,40,43}.

Donde generalmente consiste en crear gotas de una suspensión celular sobre una placa de 96 pocillos de fondo horadado^{28,29,43}. Esto permite la localización espontánea de

las células suspendidas en el cóncavo de la gota colgante por la fuerza gravitacional y conduce a la formación estable de esferoides^{21-23,25-27,43}. **(FIGURA 10)**. Algo que se ha reportado es que la técnica de gota colgante permite controlar el tamaño de los esferoides mediante la introducción de un número definido de células (que va desde 10 hasta más de 3000 células por microlitro)^{29,43}. Asimismo, permite la combinación de varios tipos de células en el mismo esferoide incluidas las células troncales embrionarias murinas, osteoblastos fetales humanos, células troncales mesenquimales y células endoteliales del cordón umbilical humano (*human umbilical vein endothelial cells: HUVEC's*)⁴³. Reportándose que las células dentro del esferoide han demostrado que tienen una mayor viabilidad celular, secreción de proteínas y capacidad de diferenciación celular^{21-27,29,43}.

Esas propiedades pueden deberse a la mejor estructura morfológica 3D de los esferoides, que permite abundantes interacciones y refleja el microambiente controlado en términos de señales biomecánicas/bioquímicas que pueden estimular las interacciones célula-célula, célula-MEC y secreción de gradientes solubles^{11,12,28,29,43}. En consecuencia, ya se han utilizado en la investigación del cáncer en modelos *in vitro* para estudiar los mecanismos fundamentales de la biología tumoral y como herramientas de detección de biomarcadores abriendo la posibilidad de poderse utilizar en la medicina regenerativa tisular^{29,43}. **(FIGURA 8)**.

FUERZA FÍSICA DE CONTROL	MÉTODO	VENTAJAS.
Fuerza gravitacional.	Gota colgante.	Simplicidad. Control de tamaño.
	Gota colgante automatizada.	Control de tamaño. Efectividad en el cultivo
	Superficie superhidrofóbica.	Eficiencia. Control de tamaño.
	Inserción en impresión 3D	Eficiencia. Control de tamaño.
Fuerza centrífuga.	Cultivo granular	Control de tamaño. Simplicidad.
	Matraz curvo	Apoptosis reducida. Producción en masa
	Cultivo rotatorio	Control de tamaño. Producción en masa.
Superficie química.	Patrón químico.	Producción en masa.
	PNIPAAm / Biomoléculas	Control de tamaño
Microestructura/andamio	Patrón topológico	Simplicidad. Control de tamaño.
	Pocillos.	Control de tamaño.
Hidrogel	Microfluidos	Cambios de media efectividad. Control de tamaño. Manipulación.
Onda acústica.	Onda acústica de superficie.	Control de tamaño.

Tabla 1. Mecanismos y ventajas en el diseño modelos para cultivos de esferoides^{21,43}.

IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO.

En la ingeniería de tejidos un enfoque nuevo es tratar de recrear microambientes que imiten el desarrollo de un tejido nativo. Durante la formación de cualquier tejido vivo, las señales y el microambiente son esenciales para garantizar una estructura tridimensional. Los cultivos celulares se logran por lo general en dos dimensiones debido a la generación de la monocapa cuando se trabaja a nivel *in vitro*. Hoy día la ingeniería de tejidos está en la búsqueda de nuevas formas de mejorar los cultivos celulares que permitan un crecimiento tridimensional (3D), tratando de simular el microambiente del tejido nativo. Reportes recientes indican que lograr tejidos 3D es la presencia la fuerza gravitacional para inducir el ensamblaje celular. Por ello, recientemente, se han propuesto sistemas de manera eficaz que se apoyan de la influencia de la fuerza de gravedad durante el cultivo celular *in vitro* que podrían solventar el entendimiento del crecimiento de tejido 3D. En esta propuesta de investigación pretendemos estudiar como los cultivos de gota colgante permite desarrollar esferoides de células de osteoblastos fetales humanos (hFOB, 1.16 ATCC) en la formación de un tejido 3D como estrategia para aplicación periodontal.

V. HIPÓTESIS

Los cultivos tridimensionales de osteoblastos fetales humanos (hFOB, 1.16 ATCC) por medio de la técnica de gota colgante permitirá la formación de esferoides 3D con tamaños homogéneos como estrategia para el ensamblaje de microtejidos para aplicación periodontal.

VI. OBJETIVOS.

6.1 General.

Implementar la formación homogénea de esferoides en la formación de un tejido 3D bajo condiciones de cultivos de gota colgante.

6.2 Específicos

6.2.1 Determinar y optimizar los cultivos en gota colgante de osteoblastos fetales humanos (hFOB, 1.16 ATCC) para la formación de esferoides 3D.

6.2.2 Evaluar el efecto en la proliferación celular de esferoides 3D formados por la técnica en los cultivos celulares de gota colgante de las células hFOB.

6.2.3 Caracterizar la morfología estructural de los esferoides 3D formado por los cultivos de osteoblastos fetales humanos (hFOB, 1.16 ATCC).

VII. METODOLOGÍA.

7.1 Cultivo celular en monocapa

Se cultivaron y expandieron células de osteoblastos fetales humanos (hFOB, 1.16 ATCC) en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), antibióticos [penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml)], aminoácidos no esenciales (100 mM) y piruvato de sodio (100 mM). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad. Para la diferenciación se utilizó un medio inductor osteogénico compuesto por: 50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 mM β-glicerofosfato y 10⁻⁷ M de dexametasona.

7.2 Técnica de cultivo celular en gota colgante.

Para la técnica se emplearon los cultivos en monocapa de células hFOB en los pases 2 a 6. Para generar la gota se inició con 40 a 45 µL de una densidad de 1x10⁵ células para evitar la inestabilidad de la gota. El sembrado se realizó en las placas 3D-Well Hanging Drop Plates, desde la región del cuello en la parte superior y dispensando la suspensión de células de manera lenta para formar la gota en la parte inferior de la placa sin llegar a estar en contacto con la base. Debido al pequeño volumen de las gotas colgantes, que las hacen susceptibles a la evaporación, se llenaron los depósitos con agarosa y la base se recubrió con papel filtro humedecido para garantizar la humedad interna.

7.3 Proliferación celular

El efecto proliferativo en las hFOB bajo el cultivo de gota colgante se evaluó a los 1, 3, 7, y 14 días de cultivo. Pasado el tiempo experimental se añadió 30 μ L de resazurina que se incubó durante 6 h. Los porcentajes de proliferación se evaluaron midiendo la incorporación de BrdU en el nuevo ADN sintetizado usando el kit de detección III (Roche, NJ). Estos experimentos fueron repetidos 3 veces para obtener resultados estadísticamente significativos. La resazurina, es una sal que tiene el potencial de ser considerado un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción no fluorescente a un color rojo altamente fluorescente en respuesta a una reducción química en las mitocondrias y que dicho metabolito es secretado en el medio de cultivo como resultado del crecimiento celular.

7.4 Morfología del esferoide 3D formado

Para caracterizar el tamaño y evaluar su diámetro homogéneo de los esferoides, se observaron bajo un microscopio de invertido (AMSCOPE). Se obtuvieron imágenes de los esferoides para tener un estimado del diámetro de la morfología lograda en los cultivos 3D.

7.5 Análisis estadístico.

Se realizó prueba estadística utilizando el paquete estadístico SIGMAPLOT 12. La comparación de medias se realizó a través del análisis de varianza (ANOVA) con una significancia estadística de $p < 0.05$ y un intervalo de confianza del 95% con un análisis posthoc de Tukey.

VIII. RESULTADOS

Esta investigación presenta un método flexible y eficiente que permite formar esferoides de manera homogénea bajo condiciones de cultivo en placas acrílicas. Con esta técnica de cultivo, al emplear osteoblastos, permite que exista una interacción célula-célula para formar la morfología redonda en el centro del pozo.

En resumen, comparamos el crecimiento de la línea celular de osteoblastos del cultivo de control en monocapa 2D con medio normal (ctrl.M.N) cuando se encuentran en condiciones de medio estándar solo con 10% de suero fetal bovino (SFB) *versus* los esferoides del medio normal (M.N.3D).

En la figura 11 se ilustra la comparación entre ambas condiciones desde el día 1 hasta el día 14 del cultivo celular. Se observa diferencias estadísticamente significativas en los días 1, 3 y 7 entre ambas condiciones.

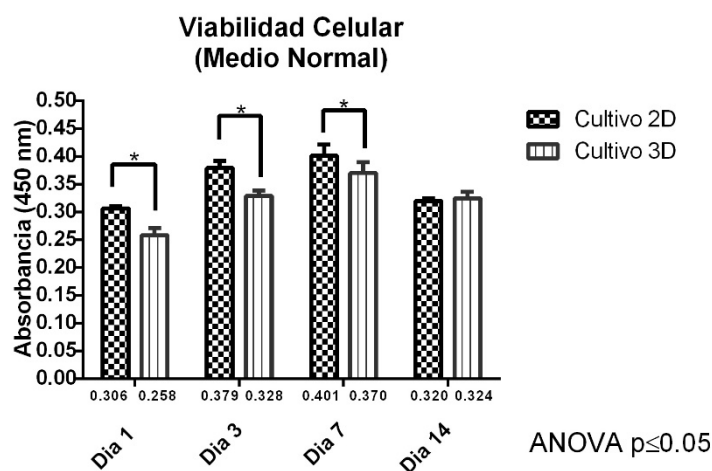


FIGURA 11. Viabilidad celular de osteoblastos fetales humanos en monocapa (2D) *versus* esferoides (3D) cultivados a 1, 3, 7 y 14 días en medio completo con 10% de suero fetal bovino. Fuente propia: Software GraphPad Prism 6

Por otro lado, comparamos el crecimiento de los osteoblastos en monocapa (2D) *versus* los esferoides (3D) con la presencia de un medio osteogénico. En la figura 12 se ilustra el crecimiento los 14 días de cultivo, donde se observa que en el día 3 y 7 hay una diferencia estadísticamente significativa y un comportamiento similar al día 14.

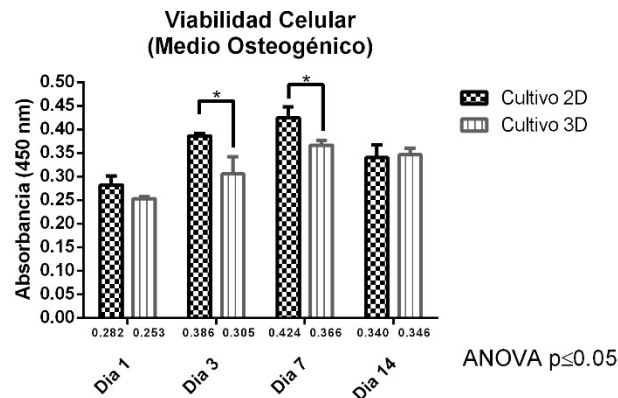


FIGURA 12. Histograma que ilustra la viabilidad celular de osteoblastos fetales humanos en monocapa 2D *versus* esferoides cultivados a 1, 3, 7 y 14 días en medio osteogénico. El análisis mediante ANOVA, One way con un valor de $p < 0,05$ **mostró diferencias significativas en los día 3 y 7 únicamente.** La numeración etiquetada en las barras representa la desviación estándar ($n = 4$). Las letras indican el día de la lectura espectrofotométrica donde marcan la significación estadística entre las muestras **ctrl M.O.G. y M.O.G. 3D** en una condición de punto de tiempo medio. ANOVA con prueba post-hoc de Tukey. Fuente propia: Software GraphPad Prism 6.

Así mismo, comparamos la viabilidad celular hasta los 14 días de esferoides (M.N.3D) cultivados bajo condiciones de medio normal (10% SFB) *versus* los esferoides cultivados en medio osteogénico (M.O.G.3D). Como se aprecia en la figura 13, la viabilidad celular en ambas condiciones fue semejante desde el día 1 hasta el día 14 ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas.

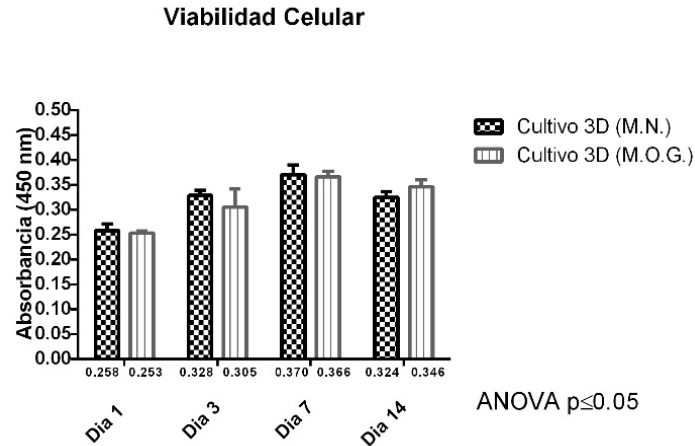


FIGURA 13. Comparación en la respuesta de proliferación de esferoides 3D de osteoblastos bajo condiciones de cultivo estándar y bajo condiciones osteogénicas a 1, 3, 7 y 14 días de incubación. El análisis mediante ANOVA, One way con un valor de $p < 0,05$ **No mostró diferencias significativas**. La numeración etiquetada en las barras representa la desviación estándar ($n = 4$). Las letras indican el día de la lectura espectrofotométrica donde marcan la significación estadística entre las muestras **M.N.3D** y **M.O.G. 3D** en una condición de punto de tiempo medio. Una $p < 0,001$; $p_b = 0,013$; ns: no significativo; ANOVA con prueba post-hoc de Tukey Fuente propia: Software GraphPad Prism 6.

Todos los valores se expresan como valores medios \pm desviación estándar (DE).

Es bien sabido que la diferenciación de hFOBs puede variar entre diferentes donantes. Utilizamos solo un donante, lo que no permite un análisis estadístico robusto y específico de los datos.

En la figura 14, se puede observar la caracterización de la morfología del esferoide cultivado bajo condiciones estándar y bajo condiciones osteogénicas por medio de microscopía óptica. Se puede apreciar que ambos esferoides están compuestos por agregados celulares donde la capa más externa se encuentra la capa proliferativa celular y en el centro la compactación de estos. El diámetro del esferoide cultivado a 14 días en medio estándar es de $\sim 350\mu\text{m}$ y el esferoide cultivado bajo condiciones osteogénicas es de $\sim 330\mu\text{m}$.

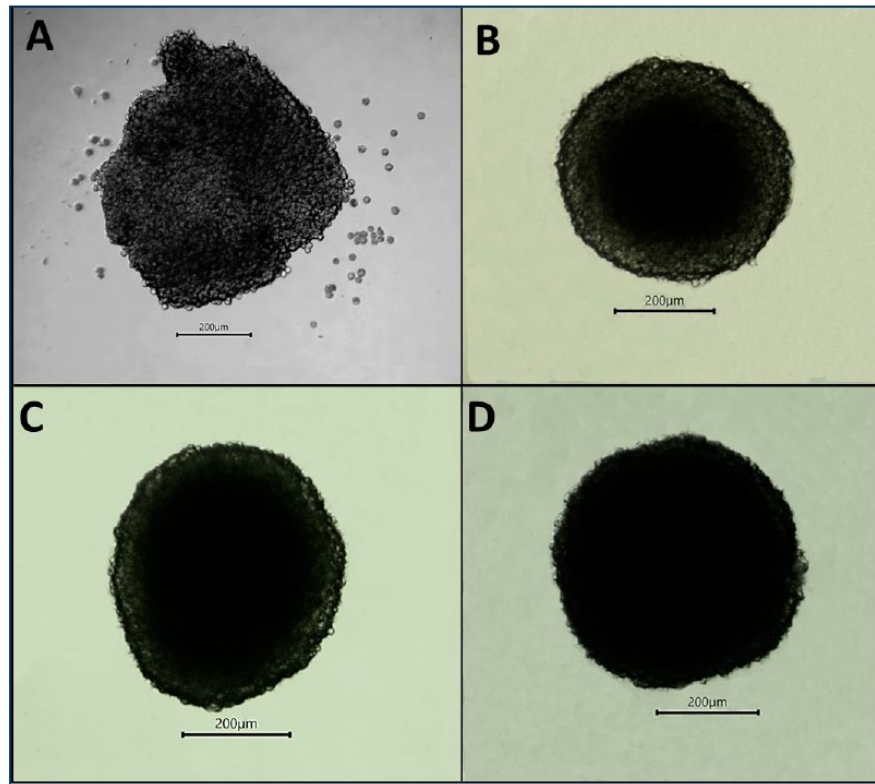


FIGURA 14. MORFOLOGÍA 3D DEL ESFEROIDE A 14 DÍAS DE CULTIVO CELULAR bajo condiciones de cultivo estándar; se observa la formación y crecimiento. (A) 1er día. (B) 3er día. (C) 7mo día. (D) 14º día. Las microfotografías fueron adquiridas con el objetivo 10X. Fuente propia.

IX. DISCUSIÓN

Los injertos óseos se utilizan en una amplia gama de entornos clínicos para aumentar la reparación y regeneración ósea^{21,22,26,30,43-47}. Actualmente, la ingeniería periodontal y la terapia de tejidos óseos se ha centrado en modelos celulares en monocapa que aportaron contribuciones significativas a la comprensión de la respuesta biológica y en estudio de biocompatibilidad de nuevos materiales⁴³⁻⁴⁸. La ingeniería de tejidos busca opciones de tratamiento alternativas para regenerar la funcionalidad de los tejidos y la tendencia es el enfoque de modelos de cultivo tridimensionales (3D).^{21,22,26,28,30,34,43}. Este enfoque se fundamenta en que se puede imitar el microambiente fisiológico que incluye la comunicación celular y la adhesión entre célula-célula y célula-matriz extracelular^{11,12,16,17}.

En el campo de la ingeniería de tejidos, el tipo de célula y la fuente son esenciales para tratar de entender el proceso de regeneración ósea^{11,12,16,17,43,45}. Los cultivos celulares primarios son los más utilizados, generalmente obtenidos a partir de tejido óseo humano y de roedores; con las líneas celulares de osteosarcoma son las que se han analizado ampliamente⁴³⁻⁴⁷.

En el presente estudio, utilizamos cultivos primarios de la línea celular hFOB que es una línea celular aprobada por la ATCC. Estas células están naturalmente involucradas en procesos de regeneración fisiológica y pueden sufrir diferenciación osteogénica *in vitro e in vivo*⁴⁶⁻⁵². Además, es una línea celular fetal humana clonal y multifuncional que está bien caracterizada como una línea osteoprogenitora con un daño mínimo del cariotipo, incluso después de múltiples pases, lo que convierte a la línea celular en un candidato prometedor para su uso en enfoques de ingeniería de

tejidos para la regeneración ósea, además de que presenta marcadores de troncalidad^{28,43-47}.

Actualmente, los cultivos 3D están tomando relevancia en múltiples aplicaciones en las ciencias biomédicas tales como ortopedia, cirugía plástica, neurología, oncología y en esta investigación estamos tratando de implementar su futura aplicación al campo odontológico.

Nuestro enfoque fue generar esferoides a manera de contribuir al campo de cultivo 3D, ya que son un modelo valioso para el estudio del comportamiento y la fisiología de las células normales y tumorales. Este procedimiento es rápido y económico para la generación de esferoides de tamaño constante que se pueden utilizar en una variedad de ensayos preclínicos y aplicaciones en las interacciones del microambiente en presencia de andamios y como evaluación de nuevas terapias de regeneración.

De acuerdo con los resultados, los esferoides 3D generados son viables y proliferan hasta los 14 días cultivados con y sin factores osteogénicos con un diámetro de 300 μm en promedio. Estos datos están en concordancia con estudios que reportan que esferoides con tamaños menores a 450 μm garantizan la difusión de oxígeno y nutrientes en la región central, manteniendo la integridad del esferoide, sin causar la necrosis celular que es debido a esferoides por arriba de 450 μm que provoca una baja difusión de oxígeno y nutrientes hacia las células densamente aglomeradas en la región central, generando un mayor riesgo de desarrollar centros hipóxicos que conducen a la desintegración del esferoide^{28,50,51}.

Por otro lado, los resultados del análisis de la morfología 3D del esferoide por microscopía óptica, mostró una agregación regular y estable de las células osteoblásticas; que permite la generación de una estructura compacta con

interacciones de contacto célula-célula. Estos resultados están de acuerdo con el comportamiento de que la unión célula-célula, en nuestro estudio de los osteoblastos; es vital para la supervivencia, así como es posible correlacionar los procesos biológicos en la formación del esferoide 3D bajo un sistema de gota colgante; la primera unión entre células podría estar mediada por receptores a través de enlaces químicos; sin embargo, esta adhesión celular no proporciona señal a las células, solo permite que se agreguen; la unión continua entre células hace que el microambiente desempeñe un papel vital para regular la secreción de colágeno tipo I como proteína de la matriz extracelular (MEC) por parte de los osteoblastos y funcionar como señal-ligando a las células que en sinergia con la acción de la fuerza gravitacional debido a la generación de la gota colgante, podría influir y contribuir a la regulación de la organización del citoesqueleto célula-célula de la morfología, proliferación y diferenciación de las células osteoblásticas. Por lo tanto, las adherencias de la matriz extracelular controlan el comportamiento celular en 3D, que generalmente está mediado por una clase específica de receptores de adherencia transmembrana conocidos como integrinas^{28,44-46,49-51}.

X. CONCLUSIONES.

- El presente trabajo muestra un método rápido y flexible para producir esferoides en cultivos 3D de manera económica.
- El protocolo explora las propiedades no citotóxicas y de promoción de la adhesión para mediar en la agregación celular minimizar la formación de monocapa celular.
- Este trabajo utiliza la agregación rápida de numerosas células consistentes para generar esferoides de tamaño homogéneo, lo que permite comparaciones directas en diversas condiciones experimentales.
- El método de gota colgante utilizado permite resolver la formación de esferoides con tamaños controlados y cantidad deseable.
- Los esferoides 3D presentan un potencial como estructura para la biofabricación de implantes y como estrategia de regeneración en el campo periodontal.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Lindhe Jan, Karring Thorkild, Araujo Mauricio: Cap. 1 Anatomía de los tejidos periodontales en Periodontología Clínica e Implantología Odontológica, 6a Ed. Editorial Médica Panamericana, 2015. Pag 3-4.
2. Terranova M, Víctor. Goldman Henry M. Listgarten Max A. El aparato inserción periodontal: estructura, funciones y química. Periodonto de Genco. Pag 36-54
3. Newman Michael G. Parte 1. El periodonto normal en periodontología clínica. 11a ed. Editorial Amolca 2016. Pag 11-12.
4. Biondi, Ana Maria., Cortese, Silvina G. Odontopediatría: Fundamentos y prácticas para la atención integral personalizada. Buenos Aires, Argentina. Editorial Alfaomega, 2011.
5. M.V. Granados, J.J. Montesinos, Álvarez Pérez M.A. Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de medula ósea en andamios fibrilares de poliácido L láctico. Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, 38(1): 288-296, 2017.
6. Michael G. Newman, Henry H. Takei, Perry R. Klokkevold; Newman and Carranza's clinical periodontology Philadelphia, PA: Elsevier, 2019.
7. Lindhe Jan, Lang P Niklaus, Berglundh Tord, Giannobile William V. Sanz Mariano. Periodontología clínica e implantología odontológica; Buenos Aires, Argentina, Editorial Medica Panamericana 6ª ed. 2017.
8. Genco Robert J, Goldman Henry M, Cohen Walter D. Periodoncia contemporánea. Editorial Interamericana McGraw Hill, México, D.F.1993. Pag 33-34.
9. Biondi, Ana María., Cortese, Silvina G. Hirose López María. Cap 8 El Periodonto en el niño y en el adolescente consultado en: Odontopediatría: Fundamentos y prácticas para la atención integral personalizada. Buenos Aires, Argentina. Editorial Alfaomega, 2011.
10. Gomez Flores M, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I. Cementum–periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. J Periodont Res 43: 364-371, 2008.
11. Yan, X., Ran, X., Xia, S., Yang, Y., Zhou, M., Yuan, C., Luo, L. Formation of Human Periodontal Ligament Cell Spheroids on Chitosan Films. *J. Vis. Exp.* 148: e59855, 2019.

12. Krivanek J, Adameyko I and Fried K. Heterogeneity and Developmental Connections between Cell Types Inhabiting Teeth. *Front. Physiol.* 8:376, 2017.
13. Biondi, Ana Maria., Cortese, Silvina G. Málaga-Figueroa, Edmundo J. Cap 13 Enfermedad Periodontal en el niño y en el adolescente consultado en: *Odontopediatría: Fundamentos y prácticas para la atención integral personalizada*. Buenos Aires, Argentina. Editorial Alfaomega, 2011.
14. Saavedra J, Zúñiga L, Mosquera L, Ceballos A, Freyre S. Microfotografía: generalidades en la matriz extracelular, colágeno y piel. *Morfología* 10(3): 2788, 2021
15. Paiva KBS, Maas CS, Santos PM, Granjeiro JM and Letra A. Extracellular Matrix Composition and Remodeling: Current Perspectives on Secondary Palate Formation, Cleft Lip/Palate, and Palatal Reconstruction. *Front. Cell Dev. Biol.* 7: 340, 2019.
16. Pandya, M.; Saxon, M.; Bozanich, J.; Tillberg, C.; Luan, X.; Diekwisch, T.G.H. The Glycoprotein/ Cytokine Erythropoietin Promotes Rapid Alveolar Ridge Regeneration In Vivo by Promoting New Bone Extracellular Matrix Deposition in Conjunction with Coupled Angiogenesis/Osteogenesis. *Int J Mol Sci.* 22(6): 2788, 2021.
17. Saavedra J, Zúñiga L, Vásquez J, Navia C, Mosquera L, Bernal S. La matriz extracelular; un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. *Morfología* 7(1): 2015.
18. Fouillen A, Grenier D, Barbeau J, Baron C, Moffatt P, Nanci A. Selective bacterial degradation of the extracellular matrix attaching the gingiva to the tooth. *Eur J Oral Sci;* 127: 313-322, 2019.
19. Pereira Prado, Vanesa, Asquino, Natalia, Apellaniz, Delmira, Bueno Rossy, Luis, Tapia, Gabriel, Bologna Molina, Ronell. Metalloproteinases (MMPs) of the extracellular matrix in Dentistry. *Odontoestomatología XVIII(28)*, 2016.
20. María del Carmen; Loera Muro, Abraham; Ramírez Castillo, Flor Yazmín; Olvera Farías, Roxanne; Guerrero-Barrera, Alma Lilián *Matriz extracelular: ¿es el andamio de los tejidos?* *Investigación y Ciencia*, 20(5): 53-60, 2012.
21. Matthias W. Laschke, Michael D. Menger. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends Biotechnol.* 35(2): 133-144, 2017.

- 22 Kobayashi J, Kikuchi A, Aoyagi T, Okano T. Cell sheet tissue engineering: Cell sheet preparation, harvesting/manipulation, and transplantation. *J Biomed Mater Res Part A* 107A: 955-967, 2019.
23. Reka Agnes Haraszti, Rachael Miller, Matteo Stoppato, Yves Y. Sere, Andrew Coles, Marie-Cecile Didiot, Rachel Wollacott, Ellen Sapp, Michelle L. Dubuke, Xuni Li, Scott A. Shaffer, Marian DiFiglia, Yang Wang, Neil Aronin, Anastasia Khvorova. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity. *Mol Ther.* 26(12): 2838-2847, 2018.
24. Xuegang Yuan, Ang-Chen Tsai, Iain Farrance, Jon A. Rowley, Teng Ma, Aggregation of culture expanded human mesenchymal stem cells in microcarrier-based bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 131, 39-46, 2018.
25. Maritan, S.M., Lian, E.Y., Mulligan, L.M. An Efficient and Flexible Cell Aggregation Method for 3D Spheroid Production. *J. Vis. Exp.* 121: e55544, 2017.
26. Wenli Zhang, Caibin Li, Bruce C. Baguley, Fang Zhou, Weisai Zhou, John P. Shaw, Zhen Wang, Zimei Wu, Jianping Liu, Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model, *Analytical Biochemistry*, 515: 47-54, 2016.
27. Berens, E.B., Holy, J.M., Riegel, A.T., Wellstein, A. A Cancer Cell Spheroid Assay to Assess Invasion in a 3D Setting. *J. Vis. Exp.* 105: e53409, 2015.
28. Gaitán-Salvatella I, López-Villegas EO, González-Alva P, Suaste-Olmos F and Álvarez-Pérez MA. Formation of 3D Osteoblast Spheroid Under Magnetic Levitation for Bone Tissue Engineering. *Front. Mol. Biosci.* 8: 672518, 2021.
29. Linkous A, Balamatsias D, Snuderl M, Edwards L, Miyaguchi K, Milner T, Reich B, Cohen-Gould L, Storaska A, Nakayama Y, Schenkein E, Singhania R, Cirigliano S, Magdeldin T, Lin Y, Nanjangud G, Chadalavada K, Pisapia D, Liston C, Fine HA. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. *Cell Rep.* 26(12): 3203-3211, 2019.

30. Yuru Vernon Shih, Shyni Varghese, Tissue engineered bone mimetics to study bone disorders ex vivo: Role of bioinspired materials, *Biomaterials*, 198, 107-121, 2019.
31. Colazo, J. M., Evans, B. C., Farinas, A. F., Al-Kassis, S., Duvall, C. L., & Thayer, W. P. Applied Bioengineering in Tissue Reconstruction, Replacement, and Regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 25(4), 259–290, 2019.
32. Granados, M.V.; Montesinos-Montesinos, J.J. Alvarez-Perez, M.A. Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA). *Rev. Mex. Ing. Bioméd* 38(1): 288-296, 2017.
33. Riddhi A. Gangolli, Sean M. Devlin, Jonathan A. Gerstenhaber, Peter I. Lelkes, and Maobin Yang. A Bilayered Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Scaffold Provides Differential Cues for the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *TISSUE ENGINEERING: Part A* 25(3-4): 224-233, 2019.
34. Elsharkawy, S., Al-Jawad, M., Pantano, M.F. *et al.* Protein disorder–order interplay to guide the growth of hierarchical mineralized structures. *Nat Commun* 9: 2145, 2018.
35. Abdalla Abdal-hay, Abdel Salam Hamdy, Khalil Abdelrazek Khalil, Ju Hyun Lim, A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly (vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants, *Materials Science and Engineering: C*, 49: 681-690, 2015.
36. Abdalla Abdal-hay, Abdel Salam Hamdy, Ju Hyun Lim, Facile preparation of titanium dioxide micro/nanofibers and tubular structures by air jet spinning, *Ceramics International*, 40(10): 15403-15409, 2014.
37. Altamirano A., Vargas N., Vázquez F., Vargas T., Montesinos J., Alfaro E., Álvarez M., 2016: Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA/Hidroxiapatita. *ODOVTOS-Int. J. Dental Sc.*, 18(3): 39-50, 2016.
38. P. U. P. A. Gilbert, Mike Abrecht, Bradley H. Frazer; The Organic-Mineral Interface in Biominerals. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 59(1): 157–185, 2005.
39. Zuluaga, F.: Algunas aplicaciones del ácido poli-L-láctico. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 37(142): 125-142, 2013.
40. Gang Chen, Jinlong Chen, Bo Yang, Lei Li, Xiangyou Luo, Xuexin Zhang, Lian Feng, Zongting Jiang, Mei Yu, Weihua Guo, Weidong Tian. Combination of aligned PLGA/Gelatin

electrospun sheets, native dental pulp extracellular matrix and treated dentin matrix as substrates for tooth root regeneration, *Biomaterials*, 52: 56-70, 2015.

41. Ashraf R, Sofi HS, Akram T, Rather HA, Abdal-hay A, Shabir N, et al. Fabrication of multifunctional cellulose/TiO₂/Ag composite nanofibers scaffold with antibacterial and bioactivity properties for future tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res Part A*. 108(4): 947–62, 2020.

42. Serna C. L, Rodríguez de S. A, Albán A. F. Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *Ing y Compet*. 5(1): 16, 2011.

43. Se-Jeong Kim and Eun Mi Kim and Masaya Yamamoto and Hansoo Park and Heungsoo Shin. Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Advanced Healthcare Materials*, 9(23): 2000608, 2020.

44. Guerado, E., Díaz-Martín, A., Arrabal, M. P., Cifuentes, M., Andrades, J. A., & Becerra, J. Células madre e ingeniería tisular ósea . Bases celulares y perspectivas terapéuticas. 362–374, 2003.

45. Astashkina A, Mann B, Grainger DW. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacol Ther*. 134(1): 82-106, 2012.

46. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32(4): 266-277, 2017.

47. Yang, M., Zhang, H., Gangolli, R. Advances of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Dental Tissue in Craniofacial Tissue Engineering. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 9(3): 150-161, 2014.

48. Mitsiadis, T. A., Graf, D. Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 87(3): 199-211, 2009.

49. Barros, A. P. D. N. De, Takiya, C. M., Garzoni, L. R., Leal-ferreira, M. L., Chiarini, L. B., Meirelles, M. N., Borojevic, R., Rossi, M. I. D. Osteoblasts and Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Control Hematopoietic Stem Cell Migration and Proliferation in 3D In Vitro Model. 5(2): [09093](#), 2010

50. Torizal, F. G., Horiguchi, I., Sakai, Y. Physiological Microenvironmental Conditions in Different Scalable Culture Systems for Pluripotent Stem Cell Expansion and

Differentiation. TOBEJ 13: 41-54, 2019.

51. Korneva, J. V, Karalkin, P. A., Gladkaya, I. S., Gryadunova, A. A. (2017). The Scalable Standardized Biofabrication of Tissue Spheroids from Different Cell Types Using Nonadhesive Technology. 3D Printing and Additive Manufacturing 4(1): 53-60, 2017.

52. Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. In vitro models to test orthopedic biomaterials in view of their clinical application in osteoporotic bone. Int J Artif Organs. 27(8):658-63, 2004.