



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Evaluación de la producción de
glicosaminoglicanos a partir de células
troncales de pulpa dental**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A (N)

Jesús Giovanni Rodríguez Martínez

Director

Dr.

Raúl Rosales Ibáñez

Dictaminadores

Mtra.

Rosario Morales De la Luz

Lic

Tomas Ernesto Villamar Duque



Los Reyes Iztacala, Edo. de México

15/10/2021



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.

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo, paciencia y sacrificio todos estos años: Esperanza Martínez Pineda y David Rodríguez Zarraga gracias por haberme dado la oportunidad de tener una educación de calidad.

A mis asesores que con su conocimiento y apoyo me guiaron en esta investigación: Dr. Raúl Rosales Ibáñez, Biol. Tomás Ernesto Villamar Duque, M.C. Arely Montserrat González González, M.C. Rosario Morales De la Luz, Mtro. Alonso Reyes Matute, Dr. Álvaro Edgar González Aragón Pineda, CD. Amairany Rodríguez Navarrete, Dr. Fernando Hernández Sánchez y Dr. Julio Cesas Sánchez Pech.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, gracias por haberme dado la oportunidad de formarme dentro de sus aulas.

A mi compañero José Luis Lara Cedeño por haberme ayudado en la obtención de los órganos dentales.

Contenido

| | |
|--|----|
| Abreviaturas..... | i |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Marco teórico..... | 2 |
| 2.1. Cartílago | 2 |
| 2.2. Cartílago hialino | 2 |
| 2.3. Cartílago fibroso | 10 |
| 2.4. Cartílago elástico | 10 |
| 2.5. Crecimiento del cartílago..... | 11 |
| 2.6. Patologías del cartílago articular | 11 |
| 2.7. Técnicas convencionales para el tratamiento de los defectos del cartílago | 18 |
| 2.8. Ingeniería tisular | 21 |
| 2.8.1. Células troncales..... | 22 |
| 2.8.1.1. Células troncales bucales..... | 27 |
| 2.8.2. Biomateriales..... | 35 |
| 2.8.3. Biomoléculas o Factores de crecimiento o <i>Growth factors (GF, por sus siglas en inglés)</i> | 37 |
| 3. Justificación..... | 41 |
| 4. Hipótesis y Objetivos | 42 |
| 5. Materiales y métodos..... | 43 |

| | |
|--|----|
| 5.1. Cultivo celular | 43 |
| 5.2. Pase celular | 45 |
| 5.3. Fabricación y caracterización de los andamios | 47 |
| 5.4. Metabolismo celular | 48 |
| 5.5. Inmunofenotipo..... | 52 |
| 5.6. Inducción condrogénica..... | 55 |
| 5.7. Tinción Azul Alcían | 57 |
| 5.8. Tinción Safranina O..... | 58 |
| 6. Resultados..... | 60 |
| 7. Discusión | 70 |
| 8. Conclusiones..... | 74 |
| 9. Bibliografía..... | 75 |
| 10. Información suplementaria | 96 |

Abreviaturas

| | |
|-----------------|---|
| <i>AR</i> | Artritis Reumatoide |
| <i>BFP-ASCs</i> | Células Troncales Mesenquimales de la Almohadilla Grasa de Bichat |
| <i>BMP</i> | Proteínas Morfogenéticas Óseas |
| <i>BSA</i> | Albúmina de Suero Bovino |
| <i>CD</i> | Cúmulo de Diferenciación |
| <i>CS</i> | Condroitin Sulfato |
| <i>DAPI</i> | 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride |
| <i>DePDLSCs</i> | Células Troncales del Ligamento Periodontal de Dientes Deciduos |
| <i>DFSCs</i> | Células Troncales del Folículo Dental |
| <i>DMEM</i> | Medio de Eagles Modificado por Dulbecco |
| <i>DPSCs</i> | Células Troncales de la Pulpa Dental |
| <i>DS</i> | Dermatán Sulfato |
| <i>EGF</i> | Factor de Crecimiento Epidérmico |
| <i>FBS</i> | Suero Fetal Bovino |
| <i>FGF</i> | Factor de Crecimiento de Fibroblastos |
| <i>GAG</i> | Glicosaminoglicano |
| <i>GMSCs</i> | Células Troncales de la Encía |
| <i>HA</i> | Ácido hialurónico |
| <i>HS</i> | Heparán sulfato |

| | |
|--------------------------------|---|
| <i>IGF</i> | Factor de crecimiento similar a la insulina |
| <i>iPS</i> | Células troncales pluripotentes inducidas |
| <i>JBMMSCs</i> | Células Troncales Mesenquimales de Médula Ósea Mandibular |
| <i>KS</i> | Queratán sulfato |
| <i>MTT</i> | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazolium bromuro |
| <i>NGF</i> | Factor de crecimiento nervioso |
| <i>OA</i> | Osteoartritis |
| <i>PBS</i> | Tampón Fosfato Salino |
| <i>PCL</i> | Policaprolactona |
| <i>PDGF</i> | Factor de crecimiento derivado de las plaquetas |
| <i>PDLSCs</i> | Células Troncales del Ligamento Periodontal |
| <i>PLGA</i> | Ácido polilactico-co-glicolico |
| <i>SC</i> | Célula Troncal |
| <i>SCAPs</i> | Células Troncales de la Papila Apical |
| <i>SGSCs</i> | Células Troncales Derivadas de Glándulas Salivares |
| <i>SHEDs</i> | Células Troncales de Dientes Deciduos Exfoliados |
| <i>SMSCs</i> | Células Troncales Sinoviales |
| <i>TGFB β</i> | Factor de crecimiento transformante β |
| <i>VEGF</i> | Factor de crecimiento endotelial vascular |

1.Introducción

El cartílago articular es un tejido conectivo aneural, alinfático y avascular, que esta constituido fundamentalmente por un solo tipo de células conocidas como condrocitos. Las células están rodeadas por una matriz extracelular, que incluye colágeno tipo II, IX, XI, VI, XIV, proteínas de enlace, proteoglicanos y agua que le dan al tejido sus propiedades de resistencia a la compresión y que permite un movimiento deslizante sin fricción. Debido a que el cartílago soporta cargas repetitivas a lo largo de la vida es muy sensible al daño.¹ Sin embargo, el cartílago tiene una escasa capacidad de autorreparación. Las lesiones en el cartílago habitualmente son el principio de la degeneración articular y eventualmente conduce a enfermedades articulares degenerativas como la osteoartritis (OA).² La OA, es una enfermedad que se caracteriza por un deterioro progresivo y pérdida del cartílago articular con cambios nocivos en toda la articulación.³ La OA es una de las principales causas de dolor y discapacidad a nivel mundial, a medida que aumenta la población también crece la prevalencia de la OA. La sintomatología de la OA incluye dolor, rigidez y pérdida de la función en las articulaciones principalmente en rodillas y caderas.⁴ Las terapias actualmente disponibles no han podido reconstruir de forma duradera el cartílago que se pierde durante la OA. La ingeniería tisular amplia la visión terapéutica al ofrecer el potencial de restaurar tanto la estructura como la función del cartílago articular perdido.⁵ La ingeniería tisular puede proporcionar soluciones innovadoras mediante el uso de células troncales, andamios biodegradables y factores de crecimiento con el fin de diseñar *in vitro* un tejido sustituto funcional para reparar, regenerar o mejorar la función del cartílago articular lesionado *in vivo*.^{6,7}

2. Marco teórico

2.1. Cartílago

El término cartílago deriva de la palabra latina "*cartilago*", y del griego "*chondros*".⁸ Es un tejido conectivo altamente especializado que recubre las articulaciones diartrodiales, está compuesto por una matriz rica en colágeno y proteoglicanos y un tipo de célula única: el condrocito.⁹ Durante la gestación el cartílago proporciona la estructura para los elementos esqueléticos que se desarrollan a través de la osificación endocondral. Sin embargo, en el adulto la distribución del cartílago es más restringida.¹⁰ Este tejido exhibe propiedades mecánicas notables y una larga durabilidad, pese a que tiene poco volumen. Su naturaleza excepcional proporciona a las articulaciones una superficie que amalgama baja fricción, alta lubricación, absorción de impactos y resistencia al desgaste durante el transcurso de la vida de una persona.¹¹ El cartílago es un tejido avascular, aneural y alinfático que se nutre mediante difusión desde el líquido sinovial y el hueso subcondral.¹² Según las características de la matriz extracelular, el cartílago se puede dividir en tres tipos diferentes:¹³ **Cartílago hialino**, del griego *hyalos*, que significa vidrio, es el tipo de cartílago más abundante en el cuerpo humano y que se caracteriza por una matriz extracelular que contiene fibras colágenas tipo II, glicosaminoglicanos y proteoglicanos. **Cartílago elástico**, se asemeja al cartílago hialino, su matriz extracelular contiene pocas fibras de colágeno tipo II y presenta fibras elásticas abundantes. **Cartílago fibroso**, se caracteriza por una matriz extracelular constituida en su mayoría por fibras de colágeno tipo I.^{14,15}

2.2. Cartílago hialino

El cartílago hialino o cartílago articular (Figura 1) es el tipo de cartílago más abundante en el cuerpo humano, en estado fresco se observa de color gris azulado semitransparente. Se distribuye en todas las superficies de las articulares diartrodiales,

tabique nasal, partes de las costillas, árbol traqueobronquial, igualmente, encontramos un tipo especial de cartílago hialino en los huesos en crecimiento.^{9, 16,17}

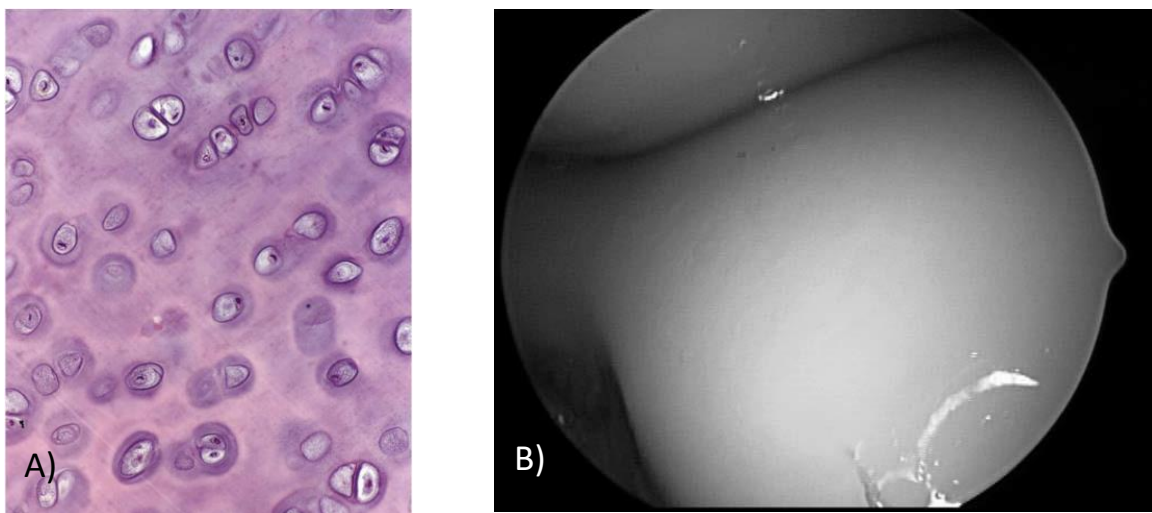


Figura 1. – **A)** Microfotografía de cartílago hialino. Tomada de Junqueira L.C, Carneiro José. (2015). **B)** Fotografía macroscópica del cartílago articular de rodilla humana. Tomada de Williams, Riley J. (2007).

Estructura del cartílago hialino

La macroestructura del cartílago hialino se describe en cuatro capas distintas (Figura 2):

Capa superficial o tangencial: Esta zona constituye del 10-20% del cartílago, está formada a su vez por dos capas: **la capa superficial** (lamina splendens), que es una lámina de pequeñas fibras sin condrocitos y cuyas fibras de colágeno se disponen en forma paralela a la superficie articular; y **la capa celular** que consiste de condrocitos pequeños y aplanados con fibras de colágeno orientadas tangencialmente a la superficie articular. La capa superficial es responsable del movimiento de deslizamiento y la lubricación.^{1,18}

Capa de transición o intermedia: Representa del 40-60% del volumen total de cartílago. Los condrocitos son esféricos y de baja densidad, las fibras de colágeno son gruesas y se organizan oblicuamente, y están distribuidas de forma aleatoria. Esta capa proporciona resistencia a las fuerzas de compresión.^{1,19}

Capa profunda: Constituye el 30-40% del cartílago. Los condrocitos son grandes y esféricos y se agrupan en columnas y las fibras de colágeno se disponen perpendicularmente a la superficie articular.¹ Esta capa es responsable de la resistencia a las fuerzas de compresión.²⁰

Capa de cartílago calcificado: Esta zona está separada de la capa profunda por una línea de flujo o marca de marea (tidemark).^{11,21} En esta zona, los condrocitos son escasos e hipertróficos. La capa calcificada fija el cartílago al hueso, anclando las fibras de colágeno de la zona profunda al hueso subcondral.^{1,19}

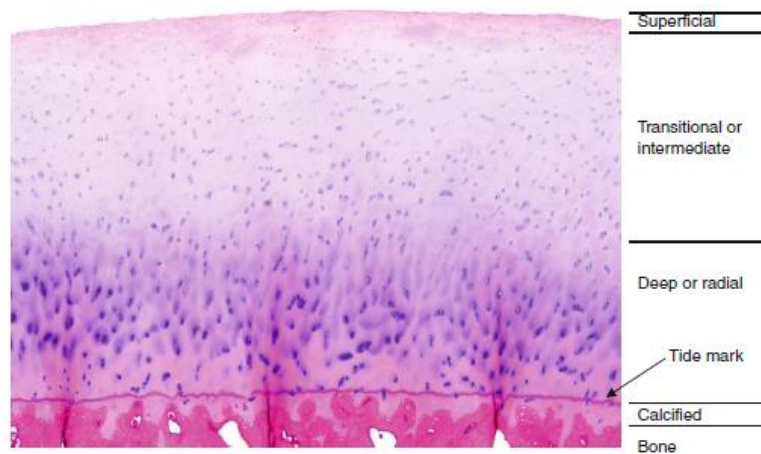


Figura 2. - Sección transversal de una articulación normal muestra cuatro zonas de cartílago articular. Tomada de Shetty Asode Ananthram. (2014).

Componentes del cartílago hialino

En el cartílago hialino (Figura 3) las células representan el 5-10% del volumen total del tejido y el 90-95% restante lo ocupa la matriz extracelular. Del volumen total ocupado por la matriz extracelular el agua contribuye con el 60-80%, 15-20% se les atribuye a las fibras de colágeno, los proteoglicanos representan alrededor del 10%, y finalmente las proteínas multiadhesivas representan el 5%.^{1,6, 22, 23,24,25}

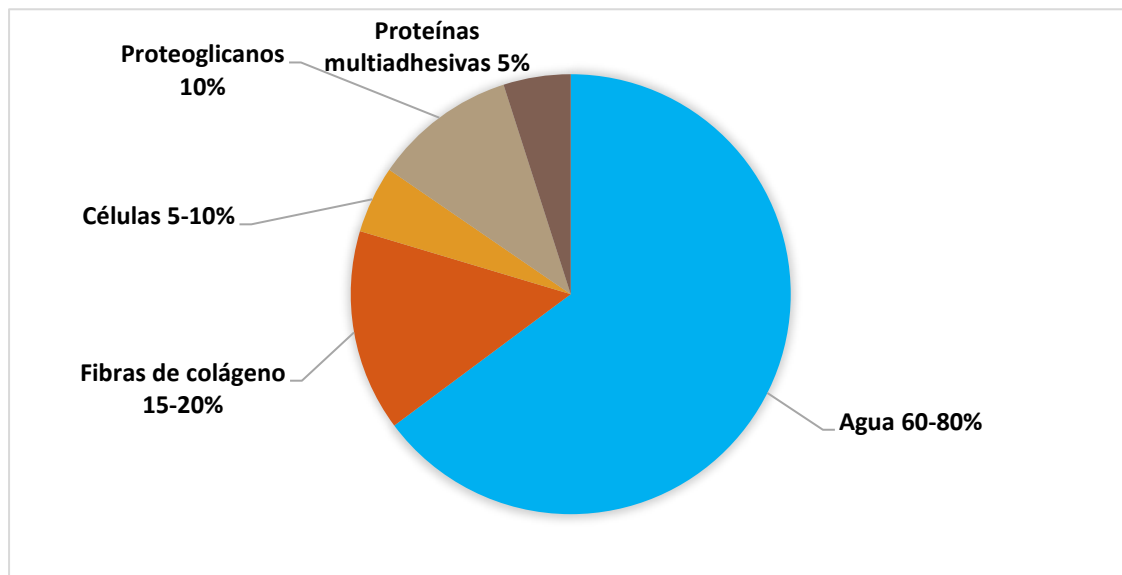


Figura 3. - Composición molecular del cartílago hialino.

Células del cartílago

Condroblastos

El condroblasto (Figura 4A) es una célula inmadura precursora del condrocito, que aún no está rodeada por la matriz extracelular,²² y tiene morfología ovalada o fusiforme con un núcleo prominente de cromatina laxa (eucromático). En el plano ultraestructural presenta aparato de Golgi, retículo endoplasmático, mitocondrias, así como vesículas de secreción.^{16,}

26

Condrocitos

Los condrocitos (Figura 4B) son células maduras del cartílago rodeadas por la matriz extracelular.^{9,11,27} Los condrocitos difieren en tamaño y forma según las diferentes zonas estructurales del cartílago.^{18,19,20,28} En el plano ultraestructural presentan un núcleo prominente, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias, gotas lipídicas, glucógeno y vesículas de secreción. Los condrocitos que sufren división mitótica se organizan en pequeños grupos atrapados en lagunas llamados grupos isógenos.^{9,10,16, 25,26}

Los condrocitos establecen un microambiente especializado que los rodea, siendo responsables de la síntesis y renovación de la matriz extracelular del cartílago.^{19, 26} Desafortunadamente, los condrocitos tienen una capacidad limitada para la reparación intrínseca. El daño que sufre el cartílago por trauma o degeneración es una fuente importante de morbilidad.¹¹

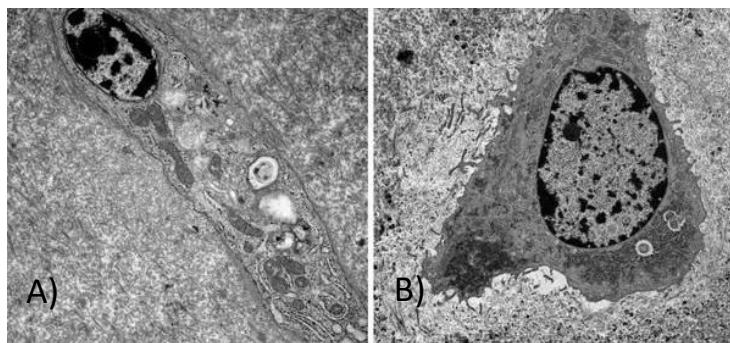


Figura 4.- Células del cartílago articular **A)** Condrolasto. **B)** Condrocito. Tomada de Thomas M. Link. (2011).

Matriz extracelular

La matriz extracelular del cartílago es una estructura tridimensional que se compone principalmente de agua, fibras de colágeno, glicosaminoglicanos y proteoglicanos proporcionando el soporte para las células y la resistencia estructural.^{6, 22, 23, 24, 29}

Regiones:

La matriz pericelular es una región estrecha que rodea completamente al condrocito, contiene colágeno tipo VI, proteoglicanos, glicoproteínas y otras proteínas no colágenas. Esta región sirve como un transmisor de señales bioquímicas y biomecánicas para el condrocito.^{30,31}

La matriz territorial (Figura 5), esta región envuelve completamente la matriz pericelular contiene fibras de colágeno que forman una red fibrilar alrededor de cada condrocito.³²

La matriz interterritorial es la más grande de todas las regiones (Figura 5), representa más del 90% de la masa total de la matriz,^{11,18} está compuesta de fibras de colágeno tipo II, es rica en proteoglicanos, separa las células y la matriz territorial.³³

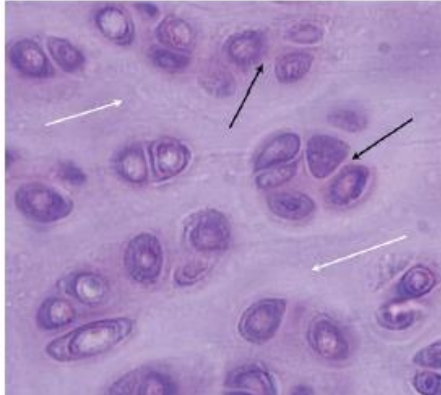


Figura 5.- Las flechas negras señalan la matriz territorial y las blancas, la matriz interterritorial. Tomada de Brusco Herminia A. (2014).

Fibras

El colágeno es la principal proteína de la matriz extracelular. De hecho, el colágeno es la proteína más abundante en los mamíferos, en el ser humano el colágeno representa un tercio de la proteína total. La familia del colágeno la integran 28 miembros.³⁴ En el cartílago el colágeno representa aproximadamente el 60% del peso seco.¹⁹ De entre todos los tipos de colágeno, el más abundante en el cartílago hialino es el colágeno tipo II (+90%), aunque también contiene otros tipos de colágeno: colágeno tipo III (-10%), colágeno tipo IX (1%), colágeno tipo XI (3%), colágeno tipo VI (<1%, matriz pericelular) y colágeno tipo X que se encuentra solo en el cartílago hipertrófico, en la capa calcificada.²¹ Estas fibras de colágeno proporcionan al cartílago articular importantes propiedades mecánicas^{25,35, 36, 37} (Figura 6).

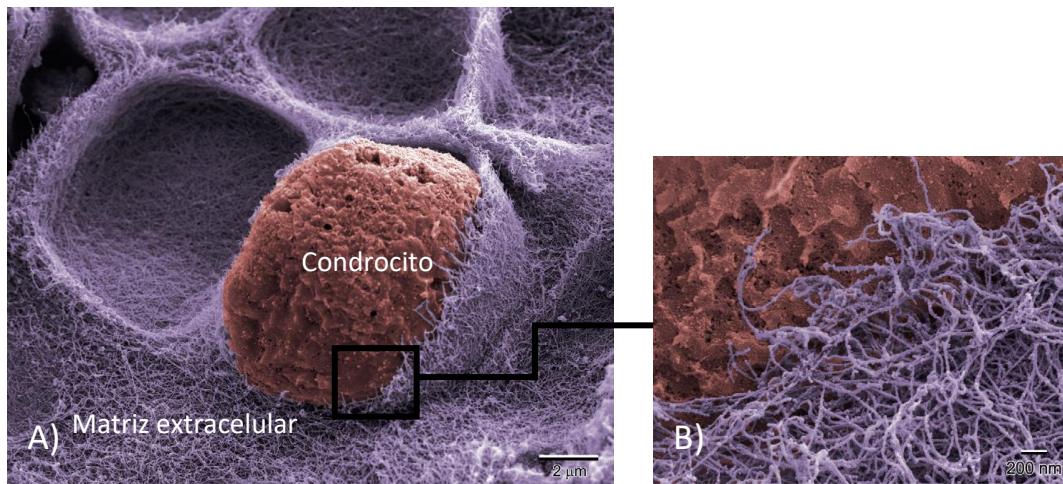


Figura 6.- Micrografía electrónica de barrido (SEM). **A)** Un condrocito se encuentra en su laguna rodeado de una fina matriz fibrilar. 5000 ×. **B)** Se muestra una vista ampliada de las fibras de colágeno en la matriz. 25,000 ×. Tomada de Ovalle, W.K. Nahirney, P.C. (2013).

Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos o glucosaminoglucanos (GAGs) son polisacáridos lineales, constituidos por disacáridos que consisten en un aminoazúcar (glucosamina que está N-acetilada o N-sulfatada o N-acetilgalactosamina) y un ácido urónico (ácido glucurónico o ácido idurónico) o galactosa.³⁸ Los disacáridos están unidos uno al otro formando largas cadenas no ramificadas menos el ácido hialurónico que es un GAG no sulfatado, todos los demás se unen de forma covalente a diversas proteínas, formando proteoglicanos.³⁹

Los glicosaminoglicanos son el principal componente estructural de la matriz extracelular. Además, participan en otras funciones biológicas importantes como: la hemostasia, respuesta inmune e inflamatoria, adhesión celular, morfogénesis, crecimiento celular, migración y diferenciación celular.^{40, 41, 42} En el cartílago articular encontramos 6 glicosaminoglicanos: heparán sulfato, condroitín sulfato 4 y 6, dermatán sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico. Los glicosaminoglicanos poseen carga negativa, lo que provoca que se repelan entre sí mientras que al mismo tiempo atraen iones y agua, participando de esta manera en las propiedades mecánicas y la hidratación de la matriz extracelular.^{21, 38}

Proteoglicanos

Los proteoglicanos (Figura 7) consisten en una proteína central con cadenas de glicosaminoglicanos unidas covalentemente.³⁸ El cartílago contiene varios proteoglicanos en su matriz extracelular que son críticos para el mantenimiento de su función normal. Estos incluyen agregano, versicano, decorina, biglucano, fibromodulina y lumicano.^{19, 21, 43,44} De los que acabamos de mencionar el agregano es el principal proteoglicano en el cartílago articular es el más grande y abundante, posee más de 100 cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato. Además, el agregano también tiene la capacidad de asociarse con el ácido hialurónico para formar grandes agregados de proteoglicanos.^{45,46,47}

Las funciones de los proteoglicanos en el cartílago articular son principalmente para proporcionar resistencia mecánica y atraer agua. Durante las condiciones fisiológicas de carga el cartílago se comprime, el agua se desplaza y debido a esto la concentración de proteoglicanos aumenta focalmente.⁴⁷ Cuando la carga se disipa los proteoglicanos atraen cationes tales como el sodio (Na^+) y agua. Esto ocurre debido a la carga negativa de los glicosaminoglicanos presentes en los proteoglicanos.⁴⁸ El ingreso de agua hace que la matriz extracelular se hinche y expanda,⁴⁹ esta característica es fundamental para las propiedades biomecánicas del cartílago, por lo tanto, mediante procesos osmóticos, los proteoglicanos atraen agua hacia el cartílago. Esto proporciona al cartílago la capacidad de absorber y distribuir la carga mecánica sobre la superficie de la articulación.^{50,51} Los otros proteoglicanos son más pequeños que el agregano, sin embargo, pueden estar presentes en cantidades similares.⁴⁷

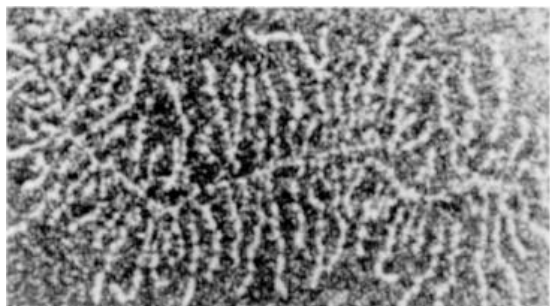


Figura 7. - Micrografía electrónica de un agregado de proteoglicanos. Tomada de Tomada de Williams, Riley J. (2007).

Agua

El agua representa entre el 60% y 80% de la masa del cartílago siendo el componente más abundante.^{6, 22, 23,24} La mayor parte del agua está contenida dentro del espacio intrafibrilar creado por las fibras de colágeno, y el resto está alojada en el espacio intracelular y el espacio poroso de la matriz.¹¹ Gracias al flujo de agua que pasa a través del cartílago, se ayuda a que difundan los nutrientes hacia los condrocitos.¹⁹

2.3. Cartílago fibroso

El cartílago fibroso o fibrocartílago (Figura 8), se caracteriza por tener una matriz extracelular con gran cantidad de fibras de colágeno. Los condrocitos se encuentran dispersos individualmente o en grupos isógenos, y alineados en la matriz fibrosa. Este cartílago se encuentra comúnmente en los discos intervertebrales, sínfisis del pubis, meniscos, articulación esternoclavicular, articulación temporomandibular, articulación de la muñeca, tendones y ligamentos. Tiene como función amortiguar las fuerzas mecánicas.^{9, 17,25, 52, 53,54,55}

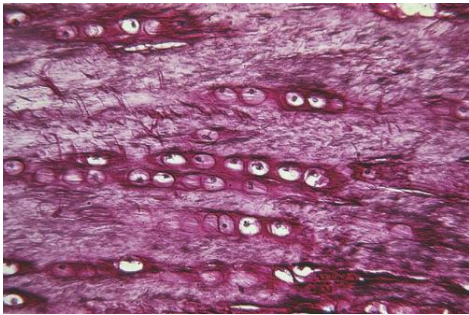


Figura 8.- Microfotografía de fibrocartílago. Tomada de Tomada de Junqueira L.C, Carneiro José. (2015).

2.4. Cartílago elástico

El cartílago elástico se caracteriza por la presencia de abundantes fibras elásticas en su matriz extracelular (Figura 9). Los condrocitos son similares a los del cartílago hialino, y están alojados en lagunas dispuestas aisladamente o en grupos isógenos. Este tipo de cartílago se localiza en el pabellón auricular, conducto auditivo externo, trompa de Eustaquio y cartílagos laríngeos (epiglotis, corniculados y cuneiformes) y tiene como función proporcionar elasticidad y flexibilidad a las estructuras antes mencionadas.^{9,25, 53, 54, 55, 56}

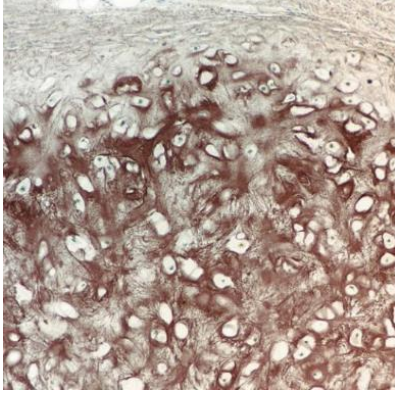


Figura 9.- Microfotografía de cartílago elástico.
Tomada de Ross Michael H. (2013).

2.5. Crecimiento del cartílago

El crecimiento de cartílago puede surgir de manera no uniforme en distintas regiones,⁵⁷ pudiendo ocurrir en dos modos distintos: crecimiento intersticial y crecimiento aposicional.¹⁷

Crecimiento intersticial

Durante el proceso de crecimiento intersticial, los condrocitos se dividen originando de dos a cuatro células dentro de las lagunas. A medida que los condrocitos secretan matriz nueva se van separando unos de otros y el tamaño del cartílago aumenta.⁵⁴

Crecimiento aposicional

Durante el crecimiento aposicional, los condroblastos sintetizan matriz extracelular nueva sobre la superficie del cartílago aumentando de esta manera la masa del tejido. Por lo tanto, el cartílago también crece a partir del pericondrio por adición de sucesivas capas de matriz en la periferia.⁵⁵

2.6. Patologías del cartílago articular

Osteoartritis

La osteoartritis (OA), véase Figura 10, es una enfermedad articular crónica degenerativa que se caracteriza por un deterioro progresivo y pérdida del cartílago articular con cambios estructurales y funcionales en toda la articulación.³

La OA es una de las principales causas de dolor, pérdida de la función articular y discapacidad su incidencia está aumentando debido al incremento de la obesidad y el envejecimiento de la población.^{58,59} A nivel internacional la prevalencia de la OA varía ampliamente según la edad, el sexo y las articulaciones afectadas de la población estudiada.⁶⁰

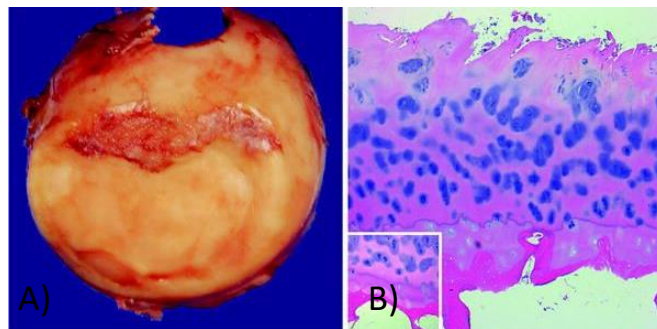


Figura 10.- Características de la osteoartritis. **A)** Fotografía macroscópica fisuras y destrucción del cartílago articular con hueso subcondral expuesto. **B)** Microfotografía fisuras, clonación de condrocitos y una reducción de proteoglicanos y duplicación de la tidemark. Tomada de Thomas M. Link. (2011).

Prevalencia en México

No hay datos actualizados sobre la prevalencia de la OA en México, el dato más actual corresponde al año 2013 que estimó que la prevalencia de la OA es de 10.5% siendo más frecuente en mujeres (11.7%) que en hombres (8.71%) con variaciones importantes en cada uno de los estados.⁶¹

Clasificación.

La osteoartritis se clasifica como primaria (idiopática) y secundaria. En la OA primaria no existe una causa predisponente, mientras que, en la OA secundaria existe una patología predisponente.⁶²

Etiología

La osteoartritis tiene una etiología multifactorial, que se produce debido a la interacción entre los factores sistémicos y locales.⁶³

Factores de riesgo sistémicos

Raza

La raza parece influir en el desarrollo de la osteoartritis. Por ejemplo, la osteoartritis de cadera es más frecuente en occidentales que en chinos, no obstante, la OA de rodilla es más frecuente en chinos que en occidentales y la prevalencia de la OA en las articulaciones de la mano es más común en occidentales que en chinos.⁶⁴ Sin embargo, las implicaciones de la raza en el desarrollo de la osteoartritis no están del todo claras, ya que pueden influir otros factores como el socioeconómico y el estilo de vida.⁶⁵

Edad

Está universalmente aceptado que con el aumento de la edad también conlleva un aumento en la prevalencia e incidencia de osteoartritis ya que durante el transcurso de los años se combinan diversos factores de riesgo y junto con los cambios biológicos que ocurren con el envejecimiento pueden hacer que una articulación sea más susceptible a sufrir daño.⁶³

Género

En cuestión de diferencia de género, la OA se diagnostica con mayor frecuencia en mujeres que en hombres.⁶⁶

Cambios hormonales

Al parecer los estrógenos tienen un rol en la homeostasis articular. Sin embargo, durante el inicio de la menopausia comienzan las alteraciones en la estructura y función en las articulaciones, por lo tanto, esto sugiere un vínculo entre el aumento en la prevalencia de la OA en la menopausia.⁶⁷

Genética

La genética de esta enfermedad es compleja ya que probablemente están involucrados múltiples genes.⁶⁸

Densidad ósea

El aumento de la densidad ósea es un factor de riesgo para el desarrollo de la OA lo que sugiere que existe una asociación entre ambos, aunque este factor no está del todo claro.⁶⁹

Nutrición

Las vitaminas tienen propiedades antioxidantes y la disminución de la ingesta estos micronutrientes podrían estar asociada con la OA.^{70, 71}

Factores de riesgo locales

Lesiones en las articulaciones

Las fracturas de la superficie articular, dislocaciones previas, ruptura de los ligamentos y meniscos, pueden aumentar el riesgo de desarrollar OA.^{63, 64}

Obesidad

Se ha demostrado que existe una relación entre la obesidad y el aumento en la prevalencia e incidencia de la OA, igualmente, esta condición influye de manera negativa en la evolución de la enfermedad.⁷²

Ocupación

El uso repetitivo de algunos grupos de articulaciones durante el desarrollo de las actividades laborales se asocia con la osteoartritis.⁶⁴ Sin embargo, el factor de riesgo ocupacional más común para la OA es el trabajo físico pesado.⁷³

Deportes

Practicar deportes en donde las articulaciones son sometidas a altos niveles de impacto y carga torsional aumentan el riesgo de sufrir lesiones y el posterior desarrollo de osteoartritis.⁷⁴

Biomecánica

Una biomecánica adversa en la cual el cartílago tiene que soportar un sobreesfuerzo mecánico que extralimita su resistencia normal, predispone al cartílago a la osteoartritis.⁷⁵ La anatomía o función anormal de la articulación como la incongruencia de la superficie articular, displasia, mala alineación, inestabilidad articular, debilidad muscular y desigualdad en la longitud de las extremidades también aumentan el riesgo de OA.^{63,64,76}

Síntomas

Los síntomas de la OA incluyen:⁷⁷

- El dolor se describe típicamente como exacerbado por la actividad y aliviado por el descanso, profundo, no localizado, generalmente de comienzo insidioso, en un estado avanzado de la enfermedad puede ocurrir con el reposo y durante la noche
- Función reducida de la articulación
- Inestabilidad articular
- Rigidez
- Deformidad
- Inflamación
- Crepitación
- Angustia psicológica que se relaciona con el dolor

Cambios en los tejidos articulares durante la evolución de la osteoartritis

Existen una variedad de cambios histológicos y bioquímicos en el cartílago y tejidos articulares durante el desarrollo de la osteoartritis (Tabla 1).⁷⁸

| | |
|--|---|
| • | Aumento del contenido de agua con hinchazón de la matriz extracelular |
| • | Aumento de la actividad anabólica y catabólica de los condrocitos (MMP*, agreginasas y otras proteasas) |
| • | Producción de óxido nítrico, DAMP*, alarminas y citoquinas y quimiocinas proinflamatorias |
| • | Disminución del contenido de proteoglicanos |
| • | Desarrollo de fibrilaciones superficiales |
| • | Interrupción de la red de colágeno |
| • | Condroptosis y desarrollo de conglomerados de condrocitos |
| • | Hipertrofia de condrocitos |
| Cambios en el cartílago calcificado y la unión osteocondral | |
| • | Penetración del cartílago calcificado por canales vasculares con elementos neurales |

| | |
|--|---|
| • | Expansión de la zona del cartílago calcificado con avance en el cartílago articular |
| • | Duplicación de la marca de marea (tidemark) |
| • | Nueva formación de hueso en la unión osteocondral |
| Cambios óseos | |
| • | Aumento de la placa cortical e incremento de la remodelación del hueso esponjoso subcondral |
| • | Aumento del grosor de la placa cortical |
| • | Masa ósea esponjosa subcondral disminuida y alteraciones en la arquitectura |
| • | Formación de osteofitos |
| • | Desarrollo de lesiones de médula ósea |
| • | Formación de quistes óseos |
| • | Desgaste óseo (contorno óseo alterado) |
| *DAMP, patrones moleculares asociados al daño; MMPs, metaloproteinasas de la matriz. | |

Tabla 1. Cambios en la matriz del cartílago y la función de los condrocitos. Tomada de Goldring, SR, (2016).

Manejo de la osteoartritis

El objetivo del tratamiento de la osteoartritis es mejorar la calidad de vida de los pacientes. Para llegar a cumplir este objetivo se utilizan diferentes enfoques terapéuticos como la terapia farmacológica, terapia no farmacológica y los procedimientos quirúrgicos. La terapia farmacológica incluye la administración de analgésicos por vías sistémicas como el acetaminofén (paracetamol), ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, celecoxib, codeína, tramadol, oxicodona y morfina, igualmente, se pueden usar los analgésicos tópicos e inyecciones intraarticulares de ácido hialurónico y glucocorticoides.⁷⁹ La terapia no farmacológica consiste en educar al paciente mediante la modificación del estilo de vida, modular la carga de la articulación afectada, ortesis, plantillas, dieta y ejercicio. Los ejercicios que se deberán incluir son aeróbicos, de fortalecimiento muscular y de flexibilidad.⁸⁰ Los procedimientos quirúrgicos se recomiendan en pacientes cuya evolución de la enfermedad no es tratable con métodos no quirúrgicos: las opciones quirúrgicas incluyen lavado/desbridamiento, corrección con osteotomía y artroplastia, por mencionar algunos.⁸¹

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, inflamatoria, autoinmune que afecta principalmente a las articulaciones. Entre sus manifestaciones incluyen inflamación de las articulaciones, rigidez, sensibilidad y diversas deformidades. Igualmente, la AR se asocia con manifestaciones extraarticulares en los ojos, pulmones, corazón y otros órganos.⁸²

Artritis idiopática juvenil

La artritis idiopática juvenil es un grupo de enfermedades crónicas muy comunes en la infancia de etiología desconocida y que causa principalmente artritis periférica provocando dolor, rigidez, hinchazón, disminución de la movilidad y puede afectar a otros órganos.⁸³

Espondiloartropatías

Las espondiloartropatías son un grupo de artritis inflamatorias.⁸⁴ Este grupo de enfermedades aparecen en personas con predisposición genética y se inician por factores ambientales, principalmente agentes infecciosos. Entre sus manifestaciones, producen oligoartritis y entesopatías periféricas o axiales.⁸⁵

Artritis Séptica

Son infecciones de las articulaciones, que pueden ser monoarticular u oligoarticulares.⁸⁶ Los agentes etiológicos más comunes de todos los casos de artritis séptica son las bacterias, siendo el *Staphylococcus aureus* la más común.⁸⁷ Igualmente, los hongos se han visto implicados en articulaciones infectadas de pacientes con factores predisponentes que deprimen el sistema inmune.⁸⁸ Los parásitos de todas las divisiones parasitarias se han asociado con artritis.⁸⁹ Y finalmente los virus son reconocidos como causantes de artralgia aguda y artritis.⁹⁰

Gota

Artritis causada por la deposición de cristales de urato monosódico en las articulaciones. La manifestación clínica incluye artritis aguda, artropatía destructiva crónica y acumulación de cristales de urato monosódico.⁹¹

Costocondritis

Inflamación del cartílago que conecta las costillas con el esternón. Siendo una de las causas de dolor en la pared anterior del tórax⁹²

Hernia discal

Condición durante la cual parte del disco intervertebral se desplaza de su posición habitual pudiendo comprimir estructuras nerviosas causando dolor.⁹³

Condromalacia

Patología caracterizada por la degeneración progresiva de la superficie del cartílago articular y el hueso subcondral.⁹⁴

Osteocondritis disecante de rodilla

Trastorno idiopático que se caracteriza por la separación de la superficie articular de un fragmento de cartílago y hueso subcondral con progresión posterior a la osteoartritis.⁹⁵

Condromatosis sinovial

Patología caracterizada por la formación de nódulos de cartílago hialino dentro del tejido conectivo de la membrana sinovial de las articulaciones, bolsas y vainas de los tendones.⁹⁶

Tumores del cartílago

Los condromas corresponden al grupo de tumores de cartílago benignos, estos incluyen encondroma, osteocondroma, condroblastoma, condio perióstico, fibroma condromixoide. Los condrosarcomas son tumores malignos con diferenciación condroide hialina. Se dividen en primarios, secundarios, desdiferenciados, de células claras, de células mesenquimales y periostales.⁹⁷

2.7. Técnicas convencionales para el tratamiento de los defectos del cartílago

Estimulación de médula ósea

Esta técnica consiste en crear aberturas múltiples en el hueso subcondral para provocar una hemorragia y acceder a la médula ósea a través de la cual las células troncales migran al sitio de la lesión y forman nuevo tejido (Figura 11).⁹⁸ Sin embargo, la respuesta de reparación es muy variable y el tejido que se forma es fibrocartilaginoso, de naturaleza distinta al cartílago hialino.⁹⁹ Esta técnica se recomienda para pacientes menores de 40 años y con defectos < 4cm².¹⁰⁰

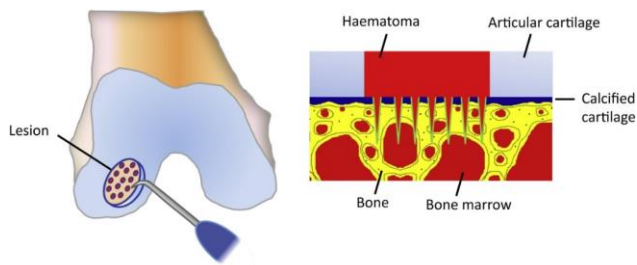


Figura 11.- Representación de la técnica de estimulación de médula ósea. Tomada de Hunziker E.B. (2015).

Autoinjertos osteocondrales

Técnica que consiste en extraer e implantar cilindros osteocondrales en el defecto del cartílago (Figura 12). Es recomendada para lesiones menores a 2.5 cm² en pacientes menores de 50 años, pero puede realizarse para lesiones más grandes.¹⁰¹ El área donante del injerto idealmente debe estar sometida a un estrés bajo, con características similares a las del sitio receptor.¹⁰² Sin embargo, aunque existe una mejoría clínica, entre sus inconvenientes se encuentran la falta de integración periférica del cartílago, la formación de tejido fibrohialino, la creación artificial de lesiones adicionales y la cantidad de tejido autólogo disponible.^{99,101,102}

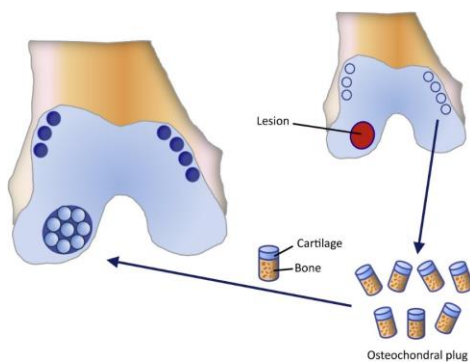


Figura 12.- Representación de la técnica de trasplante osteocondral. Tomada de Hunziker E.B. (2015).

Aloinjerto osteocondral

Técnica que implica la transferencia de cilindros osteocondrales de un donante con un tamaño compatible con los defectos.¹⁰³ Esta técnica tiene el potencial de reconstruir grandes defectos, se recomienda para lesiones con áreas mayores de 2 a 4cm².^{104,105} Entre sus desventajas se encuentran ineludiblemente los problemas inmunológicos.⁹⁹

Implantación de condrocitos autólogos.

La implantación de condrocitos autólogos (Figura 13) implica la obtención de una pequeña porción de cartílago, los condrocitos se aíslan de la matriz extracelular y se expanden *in vitro*. La cantidad final de condrocitos expandida se introducen directamente en el defecto. El objetivo de este implante es formar una nueva capa de cartílago articular.⁹⁹ Esta técnica se recomienda para el tratamiento de defectos mayores de 2 cm².¹⁰⁶

Variaciones de la técnica a lo largo del tiempo:

- Primera generación implicó el uso de un parche perióstico autólogo para mantener a las células en el defecto.
- Segunda generación usó una membrana de colágeno de tipo I / III.
- Tercera generación realiza siembra y cultivo de condrocitos en andamios 3D antes de la implantación, y se denomina implantación autógena de condrocitos inducida por matriz.¹⁰⁶

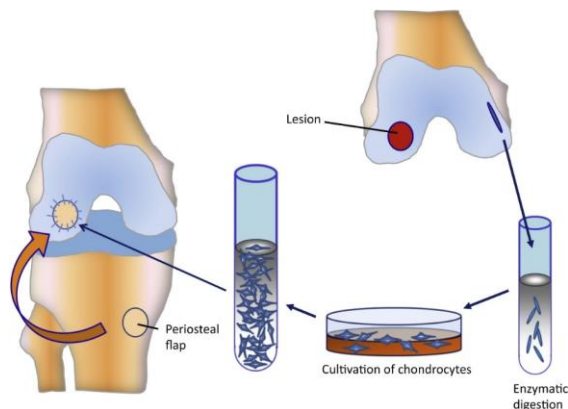


Figura 13.- Representación de la técnica de implantación de condrocitos autólogos. Tomada de Hunziker E.B. (2015).

Artroplastia

Acto quirúrgico que tiene por objetivo reconstruir o reemplazar una articulación (Figura 14).¹⁰⁷ Este procedimiento quirúrgico está indicado para personas con osteoartritis avanzada.¹⁰⁸ La tasa de éxito de la artroplastia es considerable a los 10 años, siendo del 84-100%.¹⁰⁹ La artroplastia es ampliamente aceptada como una de las intervenciones quirúrgicas más efectiva para mejorar la calidad de vida de los pacientes, aliviando el dolor y recuperando la función.¹¹⁰

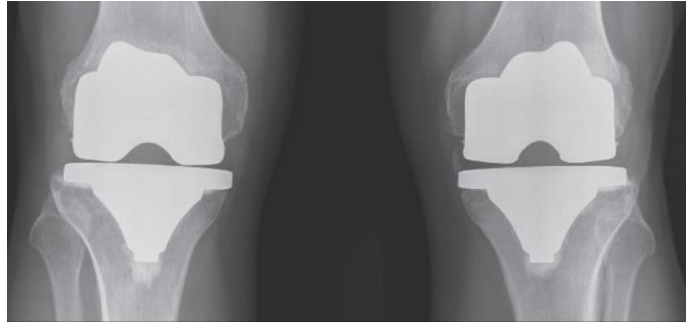


Figura 14.-Artroplastia total bilateral de rodilla. Tomado de Hunter, D. (2014).

Los tratamientos actuales para la reparación del cartílago en OA, son insatisfactorios a largo plazo y finalmente fallan. Por lo tanto, se necesitan desarrollar nuevas estrategias para la reparación del cartílago.¹¹¹

2.8. Ingeniería tisular

En 1993 R. Langer y JP. Vacanti definen la ingeniería tisular como *“un campo multidisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida con el objetivo de desarrollar sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de los tejidos”*.¹¹² Este novedoso campo surgió en el año 1988 en respuesta a la necesidad de reconstruir tejidos que han sido deteriorados o dañados por diversos factores como: enfermedades, traumatismos, quemaduras y anomalías congénitas.¹¹³ La ingeniería tisular se basa en la obtención de **células troncales** para la implantación; inducir la diferenciación de las células troncales usando **factores de crecimiento**; y proporcionar soporte a las células en crecimiento mediante una **matriz o andamio temporal biocompatible**.¹¹⁴ A esta combinación de células troncales, factores de crecimiento y andamios se le conoce como la tríada de la ingeniería tisular (Figura 15).¹¹⁵

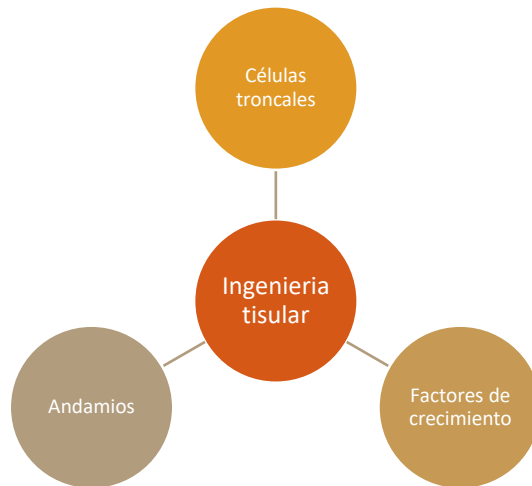


Figura 15.-Triada de la ingeniería tisular.

A continuación, daremos revisión de cada uno de los componentes de la ingeniería tisular.

2.8.1. Células troncales

Las células troncales o *stem cell* (SC, por sus siglas en inglés) se refieren a una población de células indiferenciadas que son capaces de replicarse durante largos periodos de tiempo mediante mitosis y que tiene la capacidad única de diferenciarse en distintos tipos de células especializadas.¹¹⁶ La principal función de las células troncales en el organismo son mantener y reparar los tejidos en los que residen.¹¹⁷ Las células troncales fueron descritas por primera vez por Alexander Friedenstein en 1976 a partir de médula ósea.¹¹⁸ Las células troncales pueden aislarse de una amplia variedad de tejidos como médula ósea,^{118, 119, 120} cordón umbilical,^{119, 121, 122} placenta,^{123,124} hígado,^{125,126} tejido adiposo,^{127,128,129} membrana sinovial,^{130,131} líquido amniótico,^{132,133} córnea,^{134,135} páncreas,^{136,137} corazón,^{138,139} pulmón,^{140,141} piel,^{142,143} músculo,^{144,145} cerebro,^{146,147} e incluso tejidos orales.^{148,149,150,151,152,267}

Crterios mínimos para definir a las células troncales

El International Society for Cellular Therapy propone tres criterios mínimos para definir las células troncales.¹⁵³

- En primer lugar, las células troncales deben ser adherentes al plástico cuando se mantiene en condiciones de cultivo estándar.
- En segundo lugar, el $\geq 95\%$ de la población debe expresar las moléculas de superficie CD73, CD90, CD105, y carecer de la expresión ($\leq 2\%$ positivas) de las moléculas de superficie CD14, CD34, CD45, CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR.
- En tercer lugar, multipotencialidad, las células deben ser capaces de diferenciarse en osteocitos, adipocitos y condrocitos en condiciones estándar de diferenciación *in vitro*.

Morfología y ultraestructura de la célula troncal

In vitro las células troncales muestran en su mayoría una morfología similar a fibroblastos o fusiformes (huso alargado). En el nivel ultraestructural encontramos núcleos grandes, irregulares y polimorfos preponderantemente eucromáticos, nucléolos sobresalientes, retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias, lisosomas, vacuolas y gránulos de glucógeno.^{154,155,156} Las células troncales de pulpa dental DPSC son un ejemplo (Figura 16).

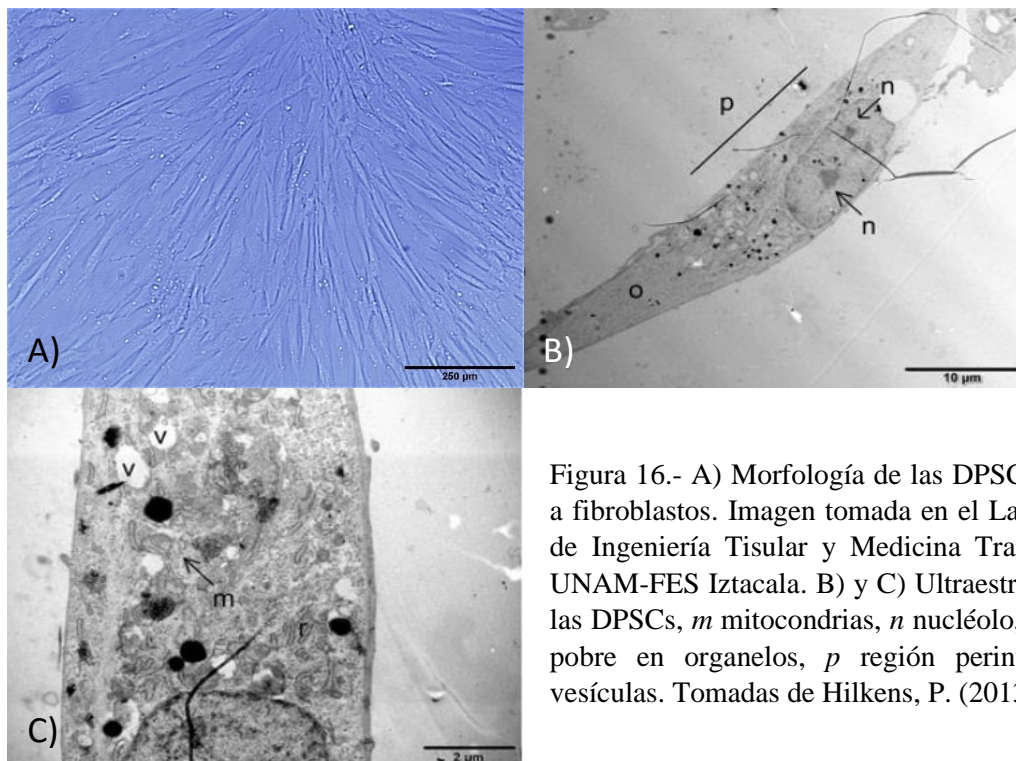


Figura 16.- A) Morfología de las DPSCs similar a fibroblastos. Imagen tomada en el Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional, UNAM-FES Iztacala. B) y C) Ultraestructura de las DPSCs, *m* mitocondrias, *n* nucléolo, *o* región pobre en organelos, *p* región perinuclear, *v* vesículas. Tomadas de Hilkens, P. (2013).

Proliferación

Las células troncales pueden dividirse durante largos periodos de tiempo, sin embargo, Leonhard Hayflick en 1965 estableció que el número de duplicaciones que puede sufrir una célula eucarionta en cultivo está limitado a aproximadamente 50 ± 10 divisiones, después, la tasa de proliferación disminuye hasta que las células finalmente entran en un estado senescente.¹⁵⁷ La tasa de proliferación de las células troncales varía dependiendo de la fuente del tejido de donde se aíslan,^{158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165} la edad del donante,^{166,167} y las condiciones de cultivo.¹⁶⁸

Las células troncales sufren dos tipos de división celular:

Simétrica. La división simétrica produce dos células troncales idénticas. El objetivo de la división simétrica es la proliferación celular.¹⁶⁹

Asimétrica. La división asimétrica origina a dos células con diferentes destinos: una célula diferenciada y una célula troncal.¹⁶⁹

Inmunomodulación

Las células troncales influyen en la respuesta inmune adaptativa e innata, suprimiendo la proliferación de los linfocitos T, linfocitos B, la maduración de las células dendríticas, inhibiendo la proliferación y citotoxicidad de las células NK, y promoviendo la generación de linfocitos T reguladores.¹⁷⁰

Clasificación

Las células troncales las podemos clasificar según el origen y su potencialidad.¹⁷¹

Clasificación basada en el origen.

Embrionarias

Las células troncales embrionarias se derivan de la masa celular interna de un blastocito, son células troncales pluripotentes que se caracterizan por las propiedades únicas de diferenciación y autorrenovación.¹⁷² Las células troncales embrionarias expresan varios

marcadores de superficie. Dichos marcadores incluyen los factores de transcripción Oct-3/4 y Nanog; antígenos embrionarios específicos de estadio-3 y 4 (SSEA3 y SSEA4); CD9, CD24, CD29, CD90, CD117, CD133, CD324, CD326 y los marcadores TRA-1-60, TRA-1-81.^{173,174,175}

Ventajas

- Capacidad de expansión ilimitada *in vitro*.¹⁷²
- Potencial de diferenciarse en todos los tipos de células de un organismo adulto.¹⁷²

Desventajas

- Tienen potencial tumorogénico.¹⁷⁶
- Pueden desencadenar una respuesta inmune.¹⁷⁶
- Existen controversias éticas, religiosas y políticas porque involucra la destrucción de embriones humanos.¹⁷⁷
- Requieren de células alimentadoras para mantener el crecimiento en un estado no diferenciado.¹⁷⁸

Adultas

Las células troncales adultas son células multipotentes que se encuentran confinadas a un órgano o tejido específico en el organismo maduro, son capaces de autorrenovarse y de diferenciarse en células especializadas para reemplazar las células senescentes o deterioradas manteniendo los tejidos sanos y reparando los tejidos lesionados asegurando así la homeostasis del tejido.¹⁷⁹

Ventajas

- Fuentes de fácil acceso.¹⁸⁰
- Aislamiento más simple.¹⁸¹
- Inmunológicamente compatibles cuando son autólogas.¹⁷⁶
- No tienen potencial tumorogénico.¹⁷⁶
- No plantean preocupaciones éticas, religiosas y políticas importantes.¹⁷⁷

Desventajas

- Numero bajo de células en los tejidos.¹⁸¹
- Capacidad de diferenciación menor en comparación con las células embrionarias.¹⁸²

- Procedimiento de recolección a menudo invasivo.¹⁸²
- Capacidad limitada de autorrenovación.¹⁸³

Clasificación basada en el potencial de diferenciación

Totipotentes

Las células troncales totipotentes en general tienen el potencial de generar a un organismo completo, tiene la capacidad de formar todos los tejidos intra y extraembrionarios durante el crecimiento y el desarrollo. Pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).¹⁷¹ En los mamíferos, los cigotos y las células producidas en las primeras divisiones son células totipotentes.¹⁸⁴

Pluripotentes

Las células troncales pluripotentes son células derivadas del blastocisto, poseen la facultad de formar todos los tejidos intraembrionarios, pero no los tejidos extraembrionarios como la placenta o la membrana amniótica. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en células especializadas que se derivan de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).¹⁸⁵

Multipotentes

Las células troncales multipotentes son células capaces de diferenciarse en todos los linajes celulares de los tejidos en los que residen, solo pueden dar lugar a células que pertenecen a una misma capa germinal (ectodermo, mesodermo o endodermo) es decir, pueden producir solo células de una familia de células estrechamente relacionadas, pero no pueden formar todos los linajes celulares. Su capacidad de diferenciación es limitada, pero son las células troncales más investigadas en ingeniería tisular.^{186,187}

Oligopotentes

Las células troncales oligopotentes son capaces de dar lugar a un subconjunto de células especializadas más restringido que las células troncales multipotentes, tienen la

capacidad de diferenciarse en solo unos pocos linajes celulares produciendo dos o más tipos de células estrechamente relacionadas.^{188,189}

Unipotentes

Las células troncales unipotentes tienen la capacidad de diferenciarse a un único tipo de célula.¹⁹⁰

Células troncales pluripotentes inducidas (iPS, por sus siglas en inglés)

Las células troncales pluripotentes inducidas (iPS) son células troncales pluripotentes generadas artificialmente a partir de células somáticas adultas que han sido genéticamente reprogramadas a través de la expresión ectópica de factores de transcripción Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Las células troncales pluripotentes inducidas son similares a las células troncales embrionarias en cuanto a su morfología, proliferación, marcadores de superficie, y su potencial de diferenciación en las tres capas germinales. Sin embargo, poseen las mismas desventajas como el potencial tumorigénico.^{191,192,193}

2.8.1.1. Células troncales bucales

Las células troncales bucales (Figura 17) (Tabla 2), son células que se obtienen a partir de tejidos bucales, pueden aislarse utilizando técnicas de cultivo por explante o digestión enzimática.^{155,194,195,196}

Células Troncales de la Pulpa Dental o *Dental Pulp Stem Cells (DPSCs, por sus siglas en inglés)*

La presencia de células troncales de la pulpa dental (DPSCs) fue confirmada por primera vez por Gronthos *et al.* en el año 2000, habiéndolas obtenido a partir de terceros molares incluidos.¹⁴⁸ La pulpa dental representa una fuente atractiva de células troncales debido al fácil acceso del sitio de recolección, tienen una tasa de proliferación considerable, exhiben una capacidad de diferenciación multipotencial y se ha demostrado que pueden interactuar con los biomateriales.¹⁹⁷ Además, pueden sobrevivir por largos periodos de

tiempo *in vitro*, Suchánek *et al.* reportaron que las DPSCs lograron 60 pases,¹⁹⁸ mientras que Alraies *et al.* lograron >80 pases durante más de 280 días en cultivo.¹⁹⁹ También, se pueden criopreservar y almacenar sin que pierdan su capacidad de diferenciación.²⁰⁰ En relación con los nichos en que residen las DPSCs en la pulpa dental, estos incluyen la zona rica en células, una población celular perivascular y una población dentro del estroma pulpar.²⁰¹ Varios estudios han cultivado y caracterizado DPSCs reportando múltiples características como su adherencia al sustrato de la placa de cultivo, morfología similar a fibroblastos, una tasa de proliferación considerable, la expresión positiva de una amplia gama de marcadores fenotípicos CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, SSEA-4, STRO-1, Oct-4 y Nanog, junto con la expresión negativa de marcadores hematopoyéticos CD14, CD34 y CD45, y capacidad de diferenciación osteogénica, odontogénica, adipogénica, condrogénica y neurogénica en condiciones de inducción apropiadas.^{148,155,158,195,200,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213} Sin embargo, algunas investigadores han reportado la expresión positiva del marcador CD34 en las DPSCs,^{214,215,216,217} y otros estudios han reportado que el potencial condrogénico de las DPSCs es inferior comparado con otras células troncales por ejemplo las células troncales de medula ósea (BMMSCs, por sus siglas en inglés) y las células troncales sinoviales (SMSCs, por sus siglas en inglés), estas últimas tienen un alto potencial condrogénico.^{158,165,218}

Células Troncales de Dientes Deciduos Exfoliados o *Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous teeth (SHEDs, por sus siglas en inglés)*

Las células troncales de dientes deciduos exfoliados (SHEDs,) fueron identificadas por Miura *et al.* en el 2003 a partir de tejido pulpar usando un método similar al de Gronthos.¹⁴⁹ Los dientes deciduos tienen la ventaja de ser una fuente de células troncales accesibles que se pueden obtener de una forma no invasiva debido a la exfoliación natural de los dientes, pudiendo recolectarlos para aislar y cultivar las células troncales de sus restos pulpares siendo un método que no plantea preocupaciones éticas.²¹⁹ De hecho, el tejido de pulpa dental decidual parece ser una fuente ideal de células troncales para la ingeniería tisular.²²⁰

Múltiples investigaciones han demostrado que las SHEDs se adhieren al sustrato de la placa de cultivo, tienen una forma fibroblastoide y poseen una mayor tasa de proliferación

en comparación con las BMSCs y DPSCs, igualmente expresan una amplia variedad de marcadores fenotípicos CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, SSEA-4, STRO-1, Oct-4 y Nanog, y los marcadores hematopoyéticos de células troncales CD34 y CD45 se expresan débilmente, finalmente muestran un potencial de diferenciación en múltiples linajes celulares como el adipogénico, osteogénico, odontogénico, neurogénico y condrogénico.^{149,158,207,219,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231} Sin embargo, al igual que las DPSCs el potencial condrogénico de las SHEDs es inferior comparado con las BMSCs y SMSCs, aunque muestran un potencial condrogénico mayor que el de las DPSCs.¹⁵⁸

Células Troncales del Ligamento Periodontal o *Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSCs, por sus siglas en inglés)*

Las células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs) se identificaron y caracterizaron inicialmente por Seo *et al.* en el 2004 a partir de ligamento periodontal de dientes extraídos.¹⁵⁰ Las PDLSCs son candidatas para la ingeniería tisular ya que son fácilmente accesibles y se pueden obtener de tejidos biológicos descartados.²³² Las PDLSCs son similares a otras células troncales ya que tienen forma fibroblastoide, adherencia al sustrato de la placa de cultivo, expresan marcadores de superficie CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, SSEA-3/4, STRO-1, Oct-4 y Nanog, no expresan marcadores hematopoyéticos CD14, CD34, CD45 y HLA-DR, y poseen el potencial de diferenciación osteogénico, adipogénico, condrogénico y cementogénico.^{150,213,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242} Choi *et al.* en el 2013 demostraron que las PDLSCs sometidas a inducción condrogénica después del tratamiento con factores de crecimiento TGF- β 3 y BMP-6 potencializan la expresión de glicosaminoglicanos, genes y proteínas condrogénicas, pudiendo ser una opción para usarse en la ingeniería tisular del cartílago.²³² Guo JB *et al.* y Ansari *et al.* reportaron que la expresión de moléculas condrogénicas era mayor en las PDLSCs inducidas en comparación con las DPSCs y BMMSCs.^{237,239}

Diferentes investigadores también han aislado con éxito células troncales del ligamento periodontal de dientes deciduos (DePDLSCs, por sus siglas en inglés), y las compararon con sus contrapartes permanentes.^{243,244,245,246} Song *et al.* Khoshhal *et al.*

concluyeron que no hay diferencias significativas en la tasa de proliferación o diferenciación entre ambas poblaciones;^{243,244} mientras que Silverio *et al.* Ji *et al.* concluyeron que las DePDLSCs tienen una mayor tasa de proliferación.^{245,246}

Células Troncales del Folículo Dental o *Dental Follicle Stem Cells (DFSCs, por sus siglas en inglés)*

Las células troncales del folículo dental (DFSCs) fueron aisladas por Morszeck *et al.* en 2005 a partir de folículos de terceros molares humanos incluidos.¹⁵² Las DFSCs en cultivo se adhieren a la superficie del sustrato de la placa de cultivo, tienen una forma similar a los fibroblastos y muestran expresión positiva para los marcadores CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, 146, CD166, STRO-1, Notch-1, Nanog, Oct-4 y dan negativo para los marcadores CD14, CD25, CD28, CD34 y CD45, son células multipotentes demostrando una capacidad de diferenciación en linajes osteogénico, cementogénico, adipogénico, condrogénico y neurogénico y en comparación con las DPSCs muestran una mayor tasa de proliferación.^{205,207,213,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256}

Células Troncales de la Papila Apical o *Stem Cells from Apical Papilla (SCAPs, por sus siglas en inglés)*

Sonoyama *et al.* en 2006 aislaron por primera vez las células troncales de la papila apical (SCAPs) a partir de terceros molares permanentes inmaduros.¹⁵¹ Las SCAPs muestran características similares a otras poblaciones de células troncales como su morfología fibroblastoide, la adherencia a la superficie de la placa de cultivo, la expresión positiva de marcadores fenotípicos CD13, CD24, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, SSEA-4, STRO-1, Oct-3/4 y Nanog junto con la expresión negativa de marcadores hematopoyéticos CD14, CD34 y CD45, poseen potencial de diferenciación en linajes celulares tales como osteogénico, odontogénico, condrogénico, adipogénico y neurogénico, y además, muestran una mayor tasa de proliferación en comparación con las DPSCs.^{151,205,214,257,258,259,260,261,262,263,264,265} Las SCAPs se derivan de un tejido en desarrollo,

por lo tanto, las SCAPs son una población única de células troncales, representando una fuente de células troncales superiores para la ingeniería tisular.^{151,257,266}

Células Troncales Mesenquimales de la Encía o *Gingival Mesenchymal Stem Cells (GMSCs, por sus siglas en inglés)*

Las células troncales mesenquimales de la encía (GMSCs), fueron aisladas por primera vez por Zhang *et al.* en 2009 a partir de tejido gingival.²⁶⁷ Las principales ventajas de esta fuente de células troncales parecen ser la capacidad de obtener una gran cantidad sin la necesidad de sacrificar un diente de manera irreversible, son de fácil acceso y se pueden obtener con técnicas mínimamente invasivas. Las GMSCs se identificaron como células adherentes al plástico con una morfología fibroblastoide, con respecto a los marcadores fenotípicos, expresan positivamente CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, STRO-1, SSEA-4, Oct-4, al mismo tiempo carecen de la expresión de marcadores CD14, CD34, CD45 y HLA-DR, y por último son células multipotentes al tener la capacidad de diferenciarse en linajes celulares tales como adipogénico, osteogénico y condrogénico.^{213,218,268,269,270,271,272} Otabe *et al.* reportaron que después de la inducción condrogénica las GMSCs expresaron un mayor nivel de agregano (un proteoglicano) en comparación con las DPSCs. Sin embargo, la expresión de agregano de las GMSCs es inferior a las SMSCs.²¹⁸ Yang *et al.* reportaron que las PDLSCs expresaron mayores niveles de genes relacionados con la diferenciación condrogénica como el agregano y el colágeno tipo II en comparación con las GMSCs.²⁷¹

Células Troncales Mesenquimales de la Almohadilla Grasa de Bichat o *Adipose-derived Stromal Cells from Bichats fat pad (BFP-ASCs, por sus siglas en inglés)*

El tejido adiposo representa una fuente de células troncales atractiva por su accesibilidad y disponibilidad, se puede obtener con métodos mínimamente invasivos y con menos molestias para el paciente. Además, el tejido adiposo generalmente se descarta después de procedimientos quirúrgicos estéticos.²⁷³ Las células troncales adiposas se describieron por primera vez en el año 2001 por Patricia A. Zuk *et al.*²⁷⁴ Posteriormente, en 2010, Elisabet Farre-Guasch *et al.* aislaron las células troncales mesenquimales de la almohadilla grasa de Bichat (BFP-ASCs).²⁷⁵ Las BFP-ASCs son adherentes al plástico y

expresan marcadores fenotípicos de células troncales característicos como CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166, mientras que no expresan los marcadores CD14, CD34, CD45 y HLA-DR, y además, son células multipotentes al poder diferenciarse en linajes como osteogénico, adipogénico y condrogénico.^{275,276,277,278,279,280,281,282}

Células Troncales Mesenquimales de Médula Ósea Mandibular o *Jaw Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (JBMMSCs, por sus siglas en inglés)*

Las células troncales de médula ósea (BMMSCs), como se mencionó anteriormente, fueron las primeras células troncales en ser identificadas por Friedenstein *et al.*¹¹⁸ Debido a que son el tipo de célula troncal más investigada, representan una fuente accesible de células troncales por la relativa facilidad con que se obtienen mediante un aspirado medular, y a su potencial de proliferación *in vitro*, se han convertido en el estándar de oro para ser usadas con fines terapéuticos.²⁸³

Matsubara *et al.* aislaron y caracterizaron por primera vez las células troncales mesenquimales de médula ósea mandibular (JBMMSCs) en el año 2005.²⁸⁴ Igualmente, diversos investigadores demostraron que las JBMMSCs son adherentes al sustrato de la placa de cultivo, tienen una morfología típica fibroblástica, expresan los marcadores de células troncales CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 y CD166 y son negativas para los marcadores CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR, son células que tienen capacidad de diferenciación multipotente en linajes celulares como osteogénico, adipogénico, condrogénico, neurogénico y vasculogénico.^{284,285,286,287,288}

Células Troncales Derivadas de Glándulas Salivares o *Salivary Gland-derived Stem Cells (SGSCs, por sus siglas en inglés)*

Las células troncales derivadas de las glándulas salivares (SGSCs), comparten similitud con otras poblaciones de células troncales, se describen como células adherentes al plástico con una morfología fibroblastoide, expresan positivamente marcadores fenotípicos de células troncales CD13, CD29, CD44, CD49f, CD73, CD90, CD105, LGR5, STRO-1, OCT-4, igualmente, son negativas para los marcadores CD34, CD45, CD117, CD133 y HLA-DR, son células troncales multipotentes al demostrar la capacidad de

diferenciación osteogénica, adipogénica, condrogénica, así como algo a resaltar es su potencial de diferenciación a linaje hepatogénico y en células acinares.^{289,290,291,292,293,294} El fácil acceso, la baja morbilidad en el sitio donante y su potencial de diferenciación hacen de las SGSC otra fuente prometedora para la ingeniería tisular.^{289,290,291}

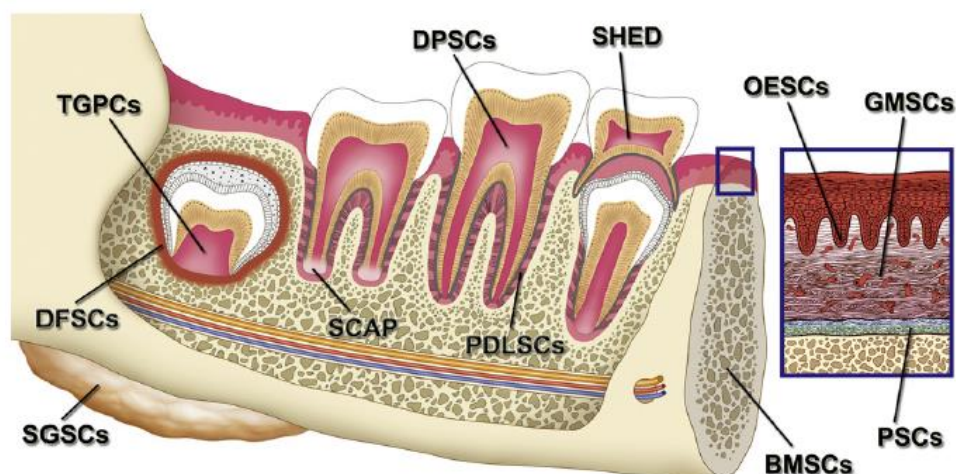


Figura 17.- Nichos de células troncales en la región bucal. Tomada de Egusa H, Sonoyama W. (2012). **DPSCs**: células troncales de la pulpa dental; **SHEDs**: células troncales de dientes deciduos exfoliados; **PDLSCs**: células troncales del ligamento periodontal; **DFSCs**: células troncales del folículo dental; **SCAPs**: células troncales de la papila apical; **GMSCs**: células troncales mesenquimales de la encía; **BMSCs**: células troncales mesenquimales de médula ósea; **SGSCs**: células troncales derivadas de glándulas salivares; **PSCs**: células troncales del periostio; **OESCs**: células troncales del epitelio oral; **TGPCs**: células progenitoras del germen dental.

| Tabla 2.- Características de células troncales bucales. | | | | | |
|---|------------------------------|---|--|--|---|
| Células troncales | Nichos | Marcadores positivos | Marcadores negativos | Potencial de diferenciación | Referencia |
| DPSCs | Pulpa de dientes permanentes | CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, SSEA-4, STRO-1, Oct3/4, SOX2, Nanog | CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR | osteogénico, odontogénico, adipogénico, condrogénico y neurogénico | 148,155, 158,195, 200,202, 203,204, 205,206, 207,208, 209,210, 211,212, 213 |
| SHEDs | Pulpa de dientes deciduos | CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, SSEA-4, | CD11b, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR | adipogénico, osteogénico, odontogénico, neurogénico y condrogénico | 149,158, 207,219, 221,222, 223,224, 225,226, |

| | | | | | |
|-----------------|--|---|--|---|---|
| | | STRO-1, Oct-4, Nanog | | | 227,228, 229,230, 231 |
| PDLSCs | Ligamento periodontal | CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, SSEA-3/4, STRO-1, Oct-4, Nanog | CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR | osteogénico, adipogénico, condrogénico y cementogénico | 150,213, 232,233, 234,235, 236,237, 238,239, 240,241, 242 |
| DFSCs | Folículo de dientes en desarrollo | CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, 146, CD166, STRO-1, Notch-1, Nanog, Oct-4 | CD11b, CD14, CD19, CD25, CD28, CD34, CD45 y HLA-DR | osteogénico, cementogénico, adipogénico, condrogénico y neurogénico | 205,207, 213,247, 248,249, 250,251, 252,253, 254,255, 256 |
| SCAPs | Papila apical de dientes en desarrollo | CD13, CD24, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, SSEA-4, STRO-1, Oct-3/4, Nanog | CD11b, CD14, CD19, CD34, CD 45 y HLA-DR | osteogénico, odontogénico, condrogénico, adipogénico, angiogénico y neurogénico | 151,205, 257,258, 259,260, 261,262, 263,264, 265,288 |
| GMSCs | Encía | CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, STRO-1, SSEA-4, Oct-4 | CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR | adipogénico, osteogénico y condrogénico | 213,218, 268,269, 270,271, 272 |
| BFP-ASCs | Almohadilla Grasa de Bichat | CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 | CD14, CD34, CD45 y HLA-DR | osteogénico, adipogénico y condrogénico | 275,276, 277,278, 279,280, 281,282 |
| JBMMSCs | Médula Ósea Mandibular | CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 y CD166 | CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR | adipogénico, condrogénico, neurogénico y vasculogénico | 284,285, 286,287, 288 |
| SGSCs | Glándulas salivares | CD13, CD29, CD44, CD49f, CD73, CD90, CD105, LGR5, STRO-1, OCT-4 | CD34, CD45, CD117, CD133 y HLA-DR | osteogénico, adipogénico, condrogénico, hepatogénico y células acinares | 289,290, 291,292, 293,294 |

2.8.2. Biomateriales

Un biomaterial es un material destinado a interactuar con sistemas biológicos.²⁹⁵ Los biomateriales son un componente indispensable en la ingeniería tisular ya que se utilizan para fabricar estructuras conocidas como andamios.¹¹⁵

Un andamio (*Scaffold* en inglés) se define como "un soporte, vehículo de entrega o matriz para facilitar la migración, unión o transporte de células o moléculas bioactivas utilizadas para reemplazar, reparar o regenerar tejidos".²⁹⁶ En otras palabras, el andamio es una plantilla que interactúa con las células proporcionando soporte mecánico temporal y un entorno 3D, que guía la organización, proliferación y la diferenciación celular, donde las células pueden producir un tejido *de novo*.²⁹⁷ Por lo tanto, para tener éxito los andamios deben ser "biomiméticos", imitando las características más importantes de la matriz extracelular, y de igual forma regular el comportamiento celular.²⁹⁸

Para ser usados en la ingeniería tisular, los andamios deben cumplir ciertos criterios:

Biocompatibilidad. *In vivo* el andamio no debe provocar una respuesta dañina.²⁹⁹

Biodegradabilidad. El andamio debe ser degradable en el organismo y eventualmente debe ser reemplazado por un nuevo tejido.³⁰⁰

Propiedades mecánicas. Idealmente, el andamio debe tener propiedades mecánicas consistentes con el sitio anatómico en el que se va a implantar y debe ser lo suficientemente fuerte como para permitir su manipulación.³⁰¹

Propiedades de superficie. El andamio debe de promover la adhesión celular, la migración y la proliferación.²⁹⁸

Arquitectura. Los andamios deben tener una estructura de poro 3D interconectada para asegurar la colonización celular y para facilitar la difusión de nutrientes y oxígeno a las células junto con la eliminación de desechos.¹¹⁵

Clasificación

De acuerdo con el material, los andamios se clasifican en cuatro grupos: polímeros (sintéticos y naturales), cerámicos, metales y híbridos.³⁰²

Polímeros

Polímeros sintéticos

Los andamios más comunes en uso son polímeros como el ácido poliglicólico (PGA),^{303,304} ácido poliláctico (PLA),^{305,306} ácido polilactico-co-glicolico (PLGA),^{307,308} policaprolactona (PCL),^{309,310} polietilenglicol (PEG),^{311,312} polidioxanona (PDO),³¹³ poli (sebacato de glicerol) (PGS).^{314,315} Entre las ventajas de estos polímeros se incluyen, propiedades físicas y mecánicas predecibles y reproducibles, y biodegradabilidad. Además, las propiedades como la porosidad, tiempo de degradación y características mecánicas se pueden controlar para adaptarse a funciones específicas, se pueden producir en grandes cantidades y almacenar por un tiempo prolongado.³¹⁶ Entre las desventajas encontramos que muchos polímeros sintéticos se degradan por hidrolisis generando productos que aumentan la acidez local lo que pueden ser perjudicial para las células, otra desventaja es que carecen de sitios de adhesión celular y requieren modificaciones químicas para mejorar la adhesión celular.³¹⁷

Polímeros naturales

También se usan andamios diseñados a partir de materiales naturales tales como el colágeno,^{318,319,320} gelatina,^{321,322} elastina,^{323,324} fibrinógeno,^{325,326} ácido hialurónico,^{327,328} quitosano,^{329,330} alginato,^{331,332} agarosa,^{333,334} y dextrano.^{335,336} Las ventajas de los polímeros naturales incluyen la biocompatibilidad, biodegradabilidad, se derivan de recursos renovables, y promueven la adhesión y crecimiento celular.¹¹⁵ Sin embargo, entre las desventajas, resulta difícil la fabricación de andamios a partir de polímeros naturales con estructuras homogéneas y reproducibles pudiendo exhibir variaciones de lote a lote, tienen limitadas propiedades mecánicas y pueden inducir una respuesta inmune indeseable si no están completamente libres de impurezas.^{115,337}

Cerámicos

Igualmente se han utilizado materiales inorgánicos como alúmina,^{338,339} fosfato tricálcico (TCP),^{340,341} hidroxiapatita (HA),^{342,343,344} fosfato de calcio bifásico,^{345,346} y biovidrio.^{347,348,349} Las cerámicas se han utilizado ampliamente en la reparación y reemplazo de los tejidos duros del cuerpo debido a su similitud con el hueso.¹¹⁵ Entre sus ventajas exhiben biocompatibilidad, resistencia mecánica, actividad antimicrobiana, y resistencia al

cambio de pH y a altas temperaturas. Sin embargo, tienen algunas desventajas como son su fragilidad, dificultad para diseñarlos e implantarlos y dificultad para controlar la tasa de degradación.³⁵⁰

Metales

Los biomateriales metálicos se utilizan ampliamente para diversos fines, por ejemplo, en el reemplazo de articulaciones y como implantes dentales.³⁵¹ En aplicaciones de ingeniería tisular se utilizan andamios metálicos diseñados a partir de titanio,^{352,353} acero inoxidable,³⁵⁴ tantalio,³⁵⁵ y magnesio.^{356,357} Estos biomateriales demuestran excelentes propiedades mecánicas como un alto módulo de Young y resistencia a la compresión. Por otro lado, entre sus desventajas encontramos que no son biodegradables y que pueden liberar iones metálicos indeseables.^{358,359} Sin embargo, el magnesio es biodegradable y libera iones que son fundamentales para el ser humano.³⁶⁰

Híbridos o compuestos

Estos andamios son diseñados a partir de una combinación de dos o más biomateriales.³⁶¹ Los andamios híbridos poseen biocompatibilidad y propiedades mecánicas superiores en comparación con los andamios puros. Además, también promueven la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular.^{362,363,364,365,366,367}

2.8.3. Biomoléculas o Factores de crecimiento *Growth factors* (GF, por sus siglas en inglés)

Los factores de crecimiento son un grupo de polipéptidos o proteínas que se unen a receptores celulares ubicados en la membrana celular y que regulan procesos biológicos como el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular.³⁶⁸

Pincipales factores de crecimiento.

Factor de crecimiento transformante β o *Transforming growth factor β* (TGF β , por sus siglas en inglés)

La familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) incluye las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento y diferenciación (GDF), la familia de factores neurotróficos derivados de la glía (GDNF), sustancia inhibidora mülleriana (MIS), nodal y actinas. Estos factores están implicados en el desarrollo y mantenimiento de varios órganos y participan en diversas funciones celulares como la proliferación, diferenciación y la migración.^{369,370,371,372}

Los factores TGF- β 1 y TGF- β 3 se han utilizado ampliamente para inducir la diferenciación condrogénica de las células troncales^{232,373,374,375,376,377,378} y tienen un efecto beneficioso sobre los condrocitos *in vitro*, mantienen el fenotipo y estimulan la síntesis de la matriz extracelular.^{379,380}

Proteínas morfogenéticas óseas o *Bone Morphogenetic Proteins (BMP, por sus siglas en inglés)*

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) pertenecen a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), se han identificado aproximadamente 20 miembros de la familia que están implicadas en diferentes procesos biológicos que incluyen el desarrollo embrionario, hematopoyesis, neurogénesis, y la diferenciación de varios tejidos musculoesqueléticos, incluidos huesos y cartílago. Además, participan en la quimiotaxis, apoptosis, proliferación, diferenciación celular y la homeostasis de los tejidos.^{381,382,383,384,385} Varios estudios reportan que las isoformas BMP2, BMP4, BMP6 y BMP7 inducen la diferenciación condrogénica de las células troncales. Por lo tanto, la evidencia indica que las BMP desempeñan un papel importante en la diferenciación condrogénica, lo que las convierte en herramientas importantes para la ingeniería tisular del cartílago.^{232,386,387,388,389}

Factor de crecimiento de fibroblastos o *Fibroblast growth factor (FGF, por sus siglas en inglés)*

La familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) lo incluyen al menos 23 miembros distintos identificados en humanos. Están involucrados en el desarrollo embrionario, la excitabilidad eléctrica de las células, el metabolismo, migración celular, diferenciación y proliferación celular ya que estimulan y mejoran la tasa de autorrenovación en las células troncales, y en la edad postnatal funcionan como factores homeostáticos.^{390,391,392,393} Entre los FGF se sabe que los FGF-2, FGF-8 y FGF-18 tienen un

papel importante en la homeostasis del cartílago.^{394,395,396} Por otro lado, muchos estudios han investigado el efecto de los FGF-2 y FGF-18 en la diferenciación condrogénica de células troncales.^{397,398,399,400,401,402}

Factor de crecimiento similar a la insulina o *Insulin-like growth factor (IGF, por sus siglas en inglés)*

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) consisten en dos polipéptidos relacionados, IGF-I e IGF-II que comparten similitud con la proinsulina. Los IGF participan en el desarrollo embrionario y en la biología de las células troncales al estimular la proliferación y diferenciación.^{403,404,405,406,407} El factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) induce la diferenciación condrogénica de las células troncales, pero se potencia cuando se usa en combinación con los TGF- β 1 y TGF- β 3.^{232,408,409}

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas o *Platelet-derived growth factor (PDGF, por sus siglas en inglés)*

En la actualidad la familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) consiste en cinco isoformas (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD).⁴¹⁰ El PDGF está presente en altas concentraciones en las plaquetas teniendo un papel importante en la cicatrización, es un potente factor de proliferación y quimiotáctico para las células de origen mesenquimal, que incluyen células troncales, fibroblastos, osteoblastos y condroblastos.^{411,412,413,414}

Factor de crecimiento endotelial vascular o *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF, por sus siglas en inglés)*

La familia del VEGF incluye siete miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF (factor de crecimiento placentario). El VEGF participa en la vasculogénesis durante el desarrollo embrionario, en el adulto participa en la angiogénesis y linfangiogénesis. Además, toma parte en el crecimiento y reparación del tejido.^{415,416,417} La angiogénesis es indispensable para la ingeniería tisular, ya que para que tenga éxito es necesaria una vascularización adecuada para el transporte de oxígeno y nutrientes hasta las

células.⁴¹⁸ Por esta razón, el VEGF se usa como un inductor de la diferenciación de las células troncales en células endoteliales.^{419,420,421,422}

Factor de crecimiento nervioso o *Nerve growth factor (NGF, por sus siglas en inglés)*

El factor de crecimiento nervioso (NGF) pertenece a la familia de las neurotrofinas.³⁷¹ Este factor tiene efectos sobre el crecimiento, supervivencia y la diferenciación de neuronas del sistema nervioso central y periférico, y sobre varias células no neuronales.^{423,424,425,426,427} Por esta razón, el NGF se ha investigado en la diferenciación neuronal de células troncales posibilitando su uso en el tratamiento de enfermedades neuronales y para reparar el daño neurológico.^{428,429,430,431,432,433}

Factor de crecimiento epidérmico o *Epidermal growth factor (EGF, por sus siglas en inglés)*

La familia del EGF incluye al factor de crecimiento transformante α (TGF- α , por sus siglas en inglés), anfiregulina, cripto, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento del virus de la viruela (SPGF, por sus siglas en inglés), varias heregulinas, epigen, epirregulina y β -celulina.^{371,434,435} Este factor de crecimiento se ha investigado en la cicatrización de lesiones como úlceras venosas, úlceras de pie diabético, quemaduras, heridas quirúrgicas y traumáticas.^{436,437,438,439,440} En cuanto a la investigación con células troncales se demostró que el EGF mejora la tasa de proliferación de las células troncales.^{441,442,443}

3. Justificación

La regeneración de las lesiones del cartílago articular son uno de los problemas más desafiantes de la medicina a debido a la escasa capacidad intrínseca de este tejido para repararse.⁴⁴⁴ Las lesiones del cartílago articular que no penetran al hueso subcondral no se reparan de manera natural.⁴⁴⁵ El tratamiento como la estimulación de médula ósea,⁹⁸ forma un tejido fibrocartilaginoso de naturaleza distinta al cartílago articular,⁹⁹ mientras el implante de condrocitos autólogos⁹⁹ y los autoinjertos osteocondrales,¹⁰¹ aportan un tejido de mejor calidad, pero implican la extracción de cartílago sano. Los aloinjertos osteocondrales,¹⁰³ se obtienen de un donador lo que conlleva a problemas inmunológicos inevitables.⁹⁷ De esta manera la mayoría de estos enfoques no permite la reparación del cartílago articular a largo plazo.⁴⁴⁴ Por lo tanto, se necesitan desarrollar nuevas estrategias de reparación del cartílago.¹¹¹ Las células troncales bucales son probables candidatas para usarse con un enfoque de ingeniería tisular en el desarrollo de nuevos tratamientos para la reparación del cartílago en la osteoartritis (OA). Este tipo de células troncales son fácilmente accesibles y se pueden encontrar en los tejidos biológicos descartados, poseen una gran capacidad de proliferación y multipotencialidad.^{148,149,150,151,197,218,219,232,396}

4. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- Es posible la expresión de glicosaminoglicanos por las células troncales mesenquimales obtenidas de pulpa dental humana después de haber sido inducidas con medio condrogénico.

Objetivos

Objetivo general:

- Inducción a linaje condrogénico de células troncales de la pulpa dental y evaluar cualitativamente la expresión de glicosaminoglicanos.

Objetivos específicos:

- Cultivo heterogéneo de células de pulpa dental.
- Evaluar el metabolismo celular de las células troncales bucales en andamios de PLC:PLGA.
- Caracterización por inmunofluorescencia para detectar la presencia y ausencia de marcadores de células troncales.
- Realizar la inducción de células troncales de la pulpa dental hacia linaje condrogénico en andamios de PCL:PLGA.
- Evaluar cualitativamente la producción de glicosaminoglicanos en células troncales de pulpa dental inducidas hacia linaje condrogénico.

5. Materiales y métodos

El presente estudio fue aprobado por la comisión de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM (CE/FESI/012017/1098). El consentimiento informado previo por escrito se entregó a cada uno de los donantes.

5.1. Cultivo celular

1. Se extrajeron terceros molares humanos de 5 pacientes sistémicamente sanos (16 a 22 años). Solo se seleccionaron órganos dentales sanos, sin enfermedad periodontal y sin caries. Antes de la extracción se realizó antisepsia de toda la cavidad oral mediante un enjuague bucal para reducir la microbiota bucal.
2. Los dientes extraídos se almacenaron en frascos recolectores estériles de 150 ml con medio de transporte (solución fisiológica estéril con antibióticos y antimicótico al 1% penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y anfotericina B 5 µg/ml Sigma-Aldrich). Los frascos fueron colocados en una hielera con gel refrigerante, para ser transportados al Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional ubicado en la clínica Odontológica Cuauhtepac de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (Figura 18 A).
3. Una vez en el laboratorio, a los dientes se les realizaron 5 lavados por 3 minutos cada uno con medio de transporte y se colocaron en frascos recolectores estériles nuevos con medio de transporte y se almacenaron en refrigeración a 4°C durante 24 hrs.
4. Transcurridas las 24 hrs los dientes se cortaron alrededor de la unión cemento-esmalte mediante el uso de un disco de carburo a baja velocidad para exponer la cámara pulpar; el enfriamiento se realizó con solución salina estéril (Solución CS Pissa) (Figura 18 B, C). Cada diente fragmentado se colocó en un tubo de 50 ml (Biologix) nuevo con medio de transporte. A los dientes que no estaban completamente formados no se les realizó ningún corte.
5. A partir de este paso, se trabajó en condiciones asépticas: en una cabina de flujo laminar (Telstar Bio II Advance) previamente limpiada con alcohol etílico al 70% y expuesta a luz ultravioleta durante 20 minutos.

6. Los dientes se colocaron en cajas Petri estériles (Figura 18 D). Para el aislamiento del tejido pulpar se utilizaron cucharillas de dentina (Hu-Friedy) y pinzas estériles, separando suavemente el tejido pulpar de la corona, y mediante limas endodóncicas estériles (Densply), el tejido pulpar restante se separó de los conductos radiculares (Figura 18 E). Todo el tejido pulpar aislado se colocó en cajas Petri estériles (Figura 18 F).
7. Al tejido pulpar se le realizó fragmentación mecánica mediante una hoja de bisturí del #15 (Figura 18 G). Los trozos de tejido se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml.
8. Mediante micropipetas al tejido pulpar se le colocaron 1000 μ l de solución enzimática previamente preparada y filtrada (Figura 18 H), misma que contenía 3 mg/ml de Colagenasa I (Collagenase from clostridium histolyticum, Sigma-Aldrich), y 4 mg/ml de Dispasa (Dispase II, Sigma-Aldrich), por mililitro de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Low-Glucose, Biowest).
9. Los tejidos pulpares en solución enzimática se colocaron en una incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 ° C durante 15 minutos.
10. Se inactivó la solución enzimática agregando medio de cultivo, el cual contiene medio **DMEM** bajo en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium Low-Glucose, Biowest), adicionado con Suero Bovino Fetal (FBS, Biowest) al 10%, y antibióticos con antimicótico al 1% (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 μ g/ml, anfotericina B 5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) en una proporción 1:1.
11. Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos a 24°C (figura 18 I) en una centrifuga Sigma 2-16KL.
12. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* o pastilla celular (sedimento que contiene las células) en 500 μ l de medio de cultivo (Figura 18 J), pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo para homogeneizar la suspensión celular.
13. Con la ayuda de micropipetas la suspensión celular se sembró en cajas de cultivo tipo T (Figura 18 K) de 25 cm² (Nunclon).
14. A la caja de cultivo se les agregó 5 ml de medio DMEM bajo en glucosa, adicionado con suero bovino fetal (FBS, Biowest) al 10%, y antibióticos con antimicótico al 1%

(penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml, anfotericina B 5µg/ml, Sigma-Aldrich).

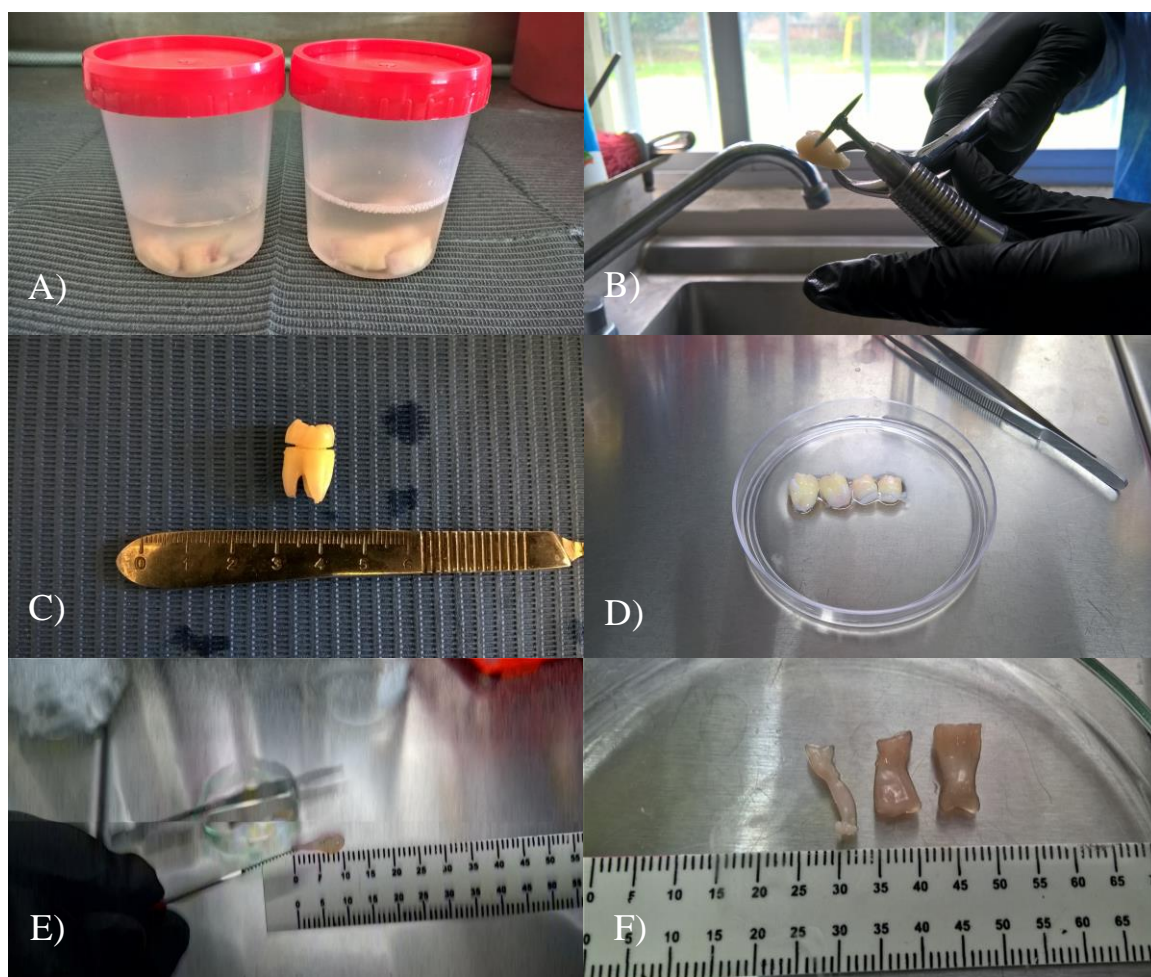
15. Las cajas de cultivo se colocaron en incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 ° C (Figura 18 L).
16. El medio de cultivo fue cambiado cada 3 días hasta alcanzar una confluencia del 80%. El medio antiguo se trató como un desecho biológico.

5.2. Pase celular

1. Después de alcanzar la confluencia del 80% se desechó el medio de cultivo de las cajas del cultivo primario.
2. Se lavó el cultivo celular agregando 3 ml de **PBS** (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biowest), se descartó el PBS e inmediatamente se agregaron 3 ml de enzima (TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red). Se colocó la caja de cultivo en la incubadora (Binder CB 150-UL) a 37 ° C durante 3-5 minutos hasta que las células se despegaron. Las células separadas debían verse redondas y refractar la luz alrededor de su membrana; aunque algunas células pudieron permanecer agrupadas.
3. Se agregaron 3 ml de medio de cultivo bajo en glucosa (DMEM) para inhibir la enzima y luego se transfirió la solución a un tubo cónico de 15 ml (Biologix). Posteriormente se colocó el tubo en la centrifuga (Sigma 2-16 KL) a 1000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante para obtener el *pellet* celular en la parte inferior del tubo cónico de 15 ml y se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo, pipeteando suavemente para homogeneizar la suspensión celular.
4. Con micropipetas la solución celular se sembró en varias cajas de cultivo tipo T de 25 cm² (Nunclon). Las cajas de cultivo se colocaron en incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 ° C durante 20 minutos.
5. Se agregaron a cada una de las cajas 4 ml de medio de cultivo bajo en glucosa DMEM, adicionado con Suero Bovino Fetal (FBS, Biowest) al 10%, antibióticos con antimicótico al 1% (penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml, anfotericina B 5µg/ml, Sigma Aldrich).

6. Las cajas de cultivo se colocaron en incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 °.
7. El medio de cultivo fue cambiado cada 3 días, hasta alcanzar una confluencia del 80%.

Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia, se repitió el protocolo de pase celular que acabamos de describir para el sembrado celular de cada uno de los ensayos en el presente estudio. Previo a los ensayos se determino el número de células directamente bajo el microscopio óptico de campo claro de contraste de fases (Leica DM IL LED) mediante la cámara Neubauer (Improved) siguiendo las recomendaciones del fabricante.



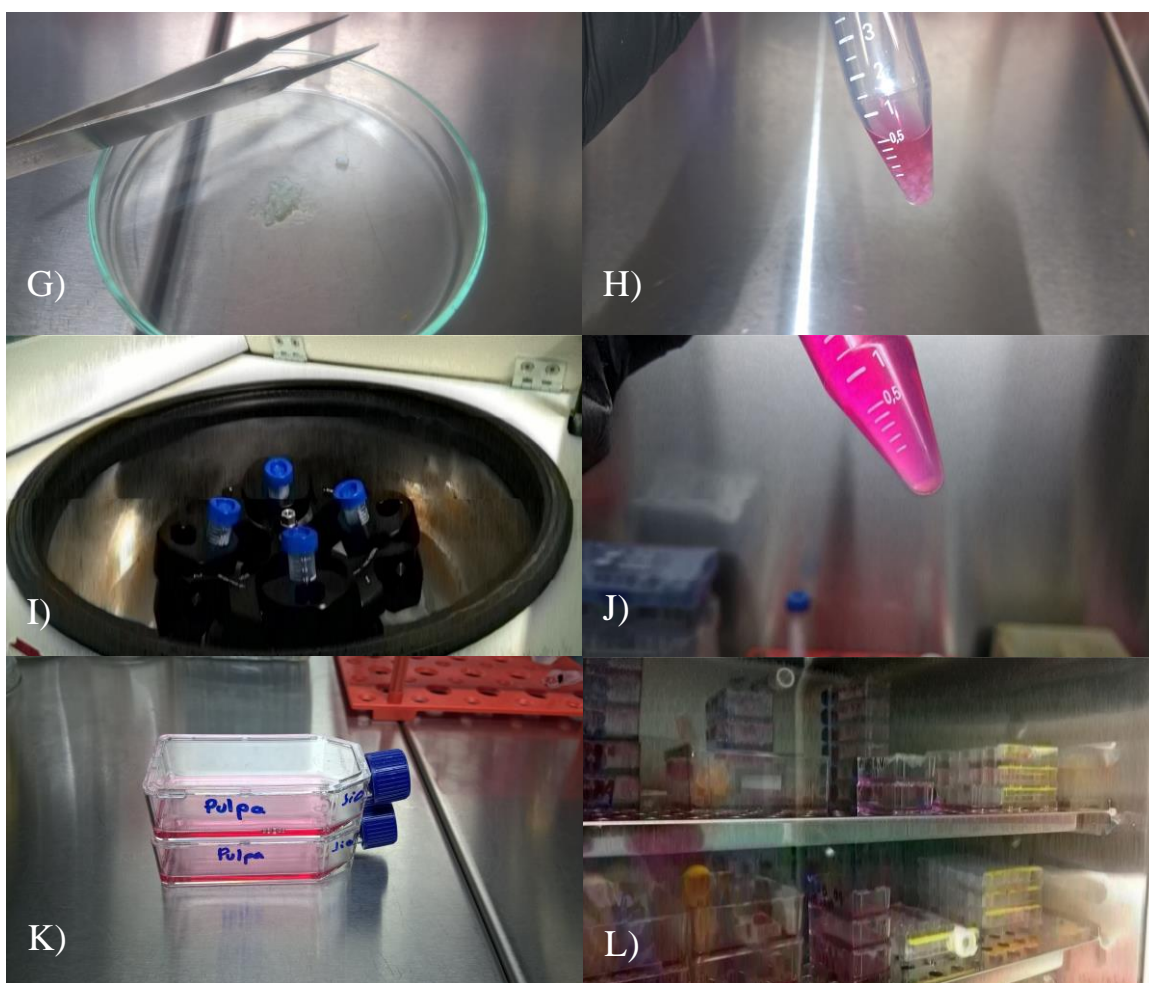


Figura 18.- Pasos para el aislamiento y cultivo de células troncales de pulpa dental (DPSCs). **A)** órganos dentales descontaminados. **B)** El órgano dental se sujeta con el fórceps #23 y se procede a cortar con un disco de diamante. **C)** Ranura horizontal en la unión cemento-esmalte. **D)** Dentro de la cabina de flujo laminar los órganos dentales se colocaron en cajas Petri estériles. **E)** Aislamiento de pulpas dentales con limas endodóncicas. **F)** Pulpas dentales aisladas. **G)** Fragmentación mecánica del tejido pulpar. **H)** Tejido pulpar en solución enzimática. **I)** Centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos. **J)** Obtención del *pellet* o pastilla celular. **K)** Sembrado en cajas de cultivo de 25 cm². **L)** Las cajas de cultivo se colocaron en incubadora con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 ° C.

5.3. Fabricación y caracterización de los andamios

La fabricación y caracterización de los andamios de PCL:PLGA fue realizada por el Dr. Fernando Hernández Sánchez y el M.C Julio Cesar Sánchez Pech del Centro de Investigación

Científica de Yucatán (CICY). Los materiales, métodos y resultados se muestran en información suplementaria.

5.4. Metabolismo celular

La medición de la actividad metabólica celular juega un papel fundamental en todas las formas de cultivo celular. El metabolismo celular se define como la suma de todos los procesos bioquímicos que producen o consumen energía.⁴⁴⁶ Los ensayos basados en el metabolismo celular se usan ampliamente para identificar si ciertos compuestos tienen efectos citotóxicos que eventualmente conducen a la muerte celular, por lo tanto, estos ensayos únicamente miden el metabolismo de las células vivas.⁴⁴⁷

Para evaluar la actividad metabólica celular se realizaron los ensayos colorimétricos por absorbancia Alamar Blue y MTT. Para ambos ensayos se utilizaron andamios de PCL:PLGA (90:10) y (80:20). Previamente desinfectados con luz ultravioleta durante 60 minutos por cada uno de sus lados en la cabina de flujo laminar (Telstar Bio II Advance).

Sembrado en placa de cultivo de 96 pozos para los ensayos Alamar Blue y MTT

1. Después de alcanzar la confluencia (80%) se desechó el medio de cultivo de uno de los pozos de la placa de cultivo.
2. Inmediatamente se lavó el cultivo celular agregando 2 ml de PBS, se descartó el PBS y se agregaron 2 ml de enzima (TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red). Se colocó la placa de cultivo en la incubadora (Binder CB 150-UL) a 37 ° C durante 3 minutos y se observó bajo el microscopio para verificar si quedaban células adheridas restantes.
3. Se añadieron 2 ml de medio de cultivo bajo en glucosa (DMEM, Low-Glucose, Biowest), adicionado con suero bovino fetal (FBS, Biowest) al 10% para inhibir la enzima y luego se transfirió la solución a un tubo cónico de 15 ml (Biologix) y se colocó en la centrifuga (Sigma 2-16 KL) a 1000 rpm durante 10 min.
4. Se descarta el sobrenadante para obtener el *pellet* celular en la parte inferior del tubo y se resuspendió en 4 ml de medio de cultivo (DMEM, Low-Glucose, Biowest),

- adicionado con suero bovino fetal (FBS, Biowest) al 10% y antibióticos con antimicótico al 1%, pipeteando suavemente para homogeneizar la suspensión celular.
- Para ambos ensayos se sembraron aproximadamente 5×10^3 células por pozo en placas de 96 pozos (TPP, Techno Plastic Products) (Figura 19) de la siguiente manera: células en pozo, células en andamios de PCL:PLGA (90:10) y PCL:PLGA (80:20), para los tres tiempos 3, 7 y 10 días. Las células en pozo sirvieron como grupo control y las células en cada uno de los andamios sirvieron como grupos experimentales. Todos los grupos control y experimentales se realizaron por duplicado.
 - Las placas de cultivo se colocaron en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O_2 y 5% de CO_2 a $37^\circ C$ durante 20 minutos, esto para que las células se adhieran a la superficie de los pozos y a los andamios.
 - Finalmente se agregaron a cada uno de los pozos 200 μl de medio de cultivo (DMEM, Low-Glucose, Biowest), adicionado con suero bovino fetal (FBS, Biowest) al 10% y antibióticos con antimicótico al 1% y se colocó dentro de la incubadora a $37^\circ C$ durante 48 horas.

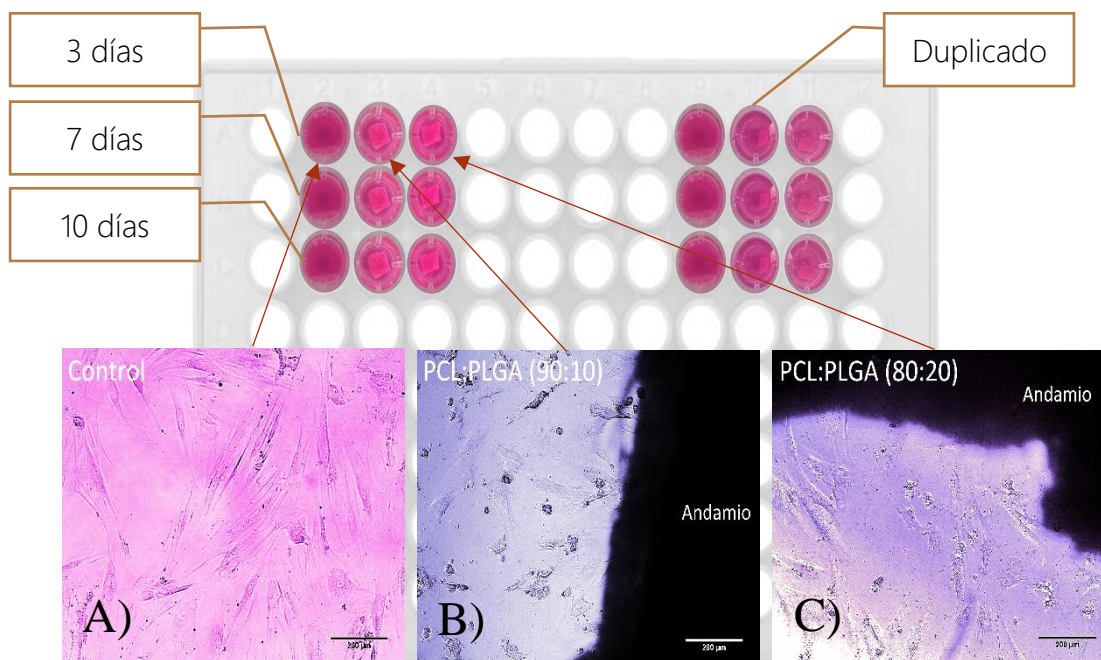


Figura 19.-Sembrado en placa de cultivo de 96 pozos para los ensayos Azul de Alamar y MTT por cada uno de los tiempos a evaluar. **A)** células en pozo, **B)** y **C)** se aprecian células sobre la superficie de la placa de cultivo aun lado de los andamios. Imágenes tomadas con el microscopio invertido Leica de campo claro 10x del Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional. Barra: 200 μm

Azul de Alamar

Azul de Alamar es un ensayo colorimétrico ampliamente usado para determinar la viabilidad celular. Dentro de las células viables, el Azul de Alamar experimenta una reducción. Debido a la acción de enzimas mitocondriales, el colorante resazurina azul, débilmente fluorescente, se transforma en resorufina rosa altamente fluorescente. La cantidad de resorufina producida es proporcional al número de células viables que se pueden cuantificar. Este ensayo es de un solo paso, sensible, seguro, no tóxico para las células y rentable.^{448,449}

Procedimiento

1. Se prepararon 2000 μ l de una “solución de trabajo” al 10 %, agregando 1800 μ l de DMEM a 200 μ l de Azul de Alamar (alamarBlue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen™) en un tubo cónico de 15 ml (Biologix).
2. El medio de cultivo de los pozos seleccionados para este ensayo se desechó con la ayuda de micropipetas.
3. Se apagó la luz de la cabina de flujo laminar y se colocaron 100 μ l de la solución de trabajo por pozo.
4. Las placas de cultivo se cubrieron con papel aluminio para protegerla de la luz y se colocaron en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 ° durante 4 horas.
5. Con la ayuda de micropipetas se separó la solución de Alamar Blue en una nueva placa de cultivo de 96 pozos.
6. Esta última placa de cultivo se colocó en el lector de placas equipado con un filtro de 562-630 nm (Biotek Elx808), en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (IPN-Cinvestav).
7. El ensayo se evaluó a 3, 7 y 10 días por duplicado.

MTT

El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazolium bromuro) es un colorante que determina la capacidad de las células viables para convertir las sales de tetrazolio solubles en agua que son fácilmente absorbidas por las células vivas y reducidas por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogena. Esta reacción convierte las sales amarillas de tetrazolio en cristales de formazán de color azul que pueden disolverse en un disolvente orgánico y cuya concentración puede determinarse espectrofotométricamente. La cantidad de formazán que resulta de esta reacción depende del número de células y su viabilidad.^{449,450}

Procedimiento

1. Se prepararon 2000 μ l de una “solución de trabajo MTT” al 10% agregando 1800 μ l de DMEM sin rojo fenol con 200 μ l de MTT (Cell Proliferation Kit I, Roche) a un tubo cónico de 15 ml (Biologix).
2. El medio de cultivo de los pozos seleccionados para este ensayo se desecho con la ayuda de micropipetas e inmediatamente se lavó con PBS.
3. Se apagó la luz de la cabina de flujo laminar y se colocaron 100 μ l de la solución de trabajo MTT por pozo.
4. Las placas de cultivo se resguardaron de la luz con papel aluminio y se colocaron en incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 ° durante 3 hrs.
5. Se agregaron 100 μ l de isopropanol (incluido en el kit) para disolver el formazán azul y las placas de cultivo se colocaron nuevamente en la en la incubadora durante toda la noche.
6. Al día siguiente la solución de MTT se separó en una placa de cultivo de 96 pozos colocando 100 μ l por pozo.

7. Esta última placa de cultivo se colocó en el lector de placas equipado con un filtro de 562-630 nm (Biotek Elx808), en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (IPN-Cinvestav).
8. El ensayo se evaluó a 3, 7 y 10 días por duplicado.

5.5. Inmunofenotipo

Las células troncales de la pulpa dental se caracterizaron por inmunofluorescencia para detectar la presencia o ausencia de marcadores CD44, CD90, STRO-1, CD45 y CD34.

El uso de anticuerpos para identificar la localización de antígenos en células es una de las herramientas más importantes en biología celular. Cuando se identifica en qué células reside un antígeno, se adquiere información crucial sobre el antígeno y sus funciones potenciales.⁴⁵¹ La técnica implica la detección de epítomos celulares específicos con un anticuerpo y un sistema de marcaje apropiado.⁴⁵²

Para que la inmunorreacción antígeno-anticuerpo se observe en el microscopio, el anticuerpo debe tomar una etiqueta: enzima, fluoróforo, oro coloidal o biotina.⁴⁵³ En el presente estudio utilizamos una etiqueta de fluoróforo que se puede visualizar directamente en un microscopio de fluorescencia.

Procedimiento:

Sembrado en placa de cultivo de 24 pozos

1. Para analizar la expresión de marcadores de superficie se sembraron aproximadamente 5×10^3 células por pozo en una placa de 24 pozos (TPP, Techno Plastic Products) (Figura 20). Los anticuerpos CD34 y CD45 sirvieron como controles negativos y los marcadores CD44, CD90 y STRO-1 sirvieron como controles positivos.
2. La placa de cultivo se colocó en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 ° C durante 20 minutos para que las células se adhieran al sustrato de la placa.
3. A cada uno de los pozos se les agregaron 1000µl de medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium Low-Glucose, Biowest), adicionado

con Suero Bovino Fetal (FBS, Biowest) al 10%, antibióticos con antimicótico al 1% (penicilina 100U/ml, estreptomina 100µg/ml, anfotericina B 5µg/ml, Sigma-Aldrich).

4. La placa de cultivo se colocó en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 °C durante 48 horas.

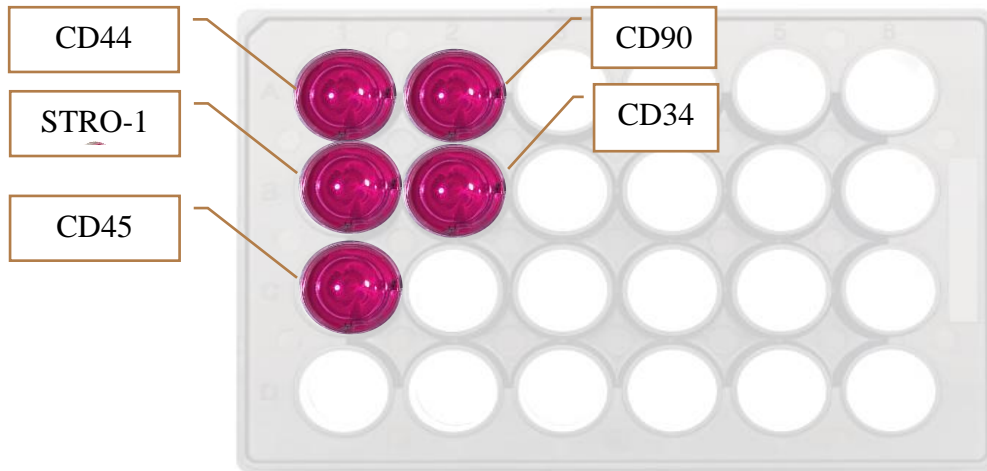


Figura 20.-Sembrado en placa de cultivo de 24 pozos para el ensayo de inmunofenotipo.

Inmunofluorescencia

1. Transcurridas las 48 horas el medio de cultivo se retiró y se lavaron las células 3 veces con PBS-Tween 1X (Sigma-Aldrich), durante 2 minutos cada lavado.
2. Las células se fijaron agregando 500 µl de formalina al 10% (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos.
3. Con la ayuda de micropipetas se retiró la formalina y se lavaron las células 3 veces con PBS-Tween 1X, 2 minutos cada lavado.
4. Las células se permeabilizaron durante 20 minutos con 500 µl Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.025%.
5. Con la ayuda de micropipetas se retiró el Triton X-100 y se agregaron 500 µl de BSA (Bovine Serum Albumin, Santa Cruz) al 1% en PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered

- Saline, Biowest) para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo durante 30 minutos.
6. Se retiró la BSA y se lavaron las células 3 veces con PBS-Tween 1X, 2 minutos cada lavado.
 7. Para la realización de los siguientes pasos se apagó la luz de la cabina de flujo laminar.
 8. Se agregaron 100µl del anticuerpo primario antihumano CD44 (Santa Cruz) diluido en BSA 1:100µl, 100µl de anticuerpo primario antihumano Stro-1 (Santa Cruz) diluido en BSA 1:100µl, 100µl de anticuerpo primario antihumano CD90 (R&D SYSTEMS) diluido en BSA 1:100µl, 100µl de anticuerpo primario antihumano CD34 (Santa Cruz) diluido en BSA 1:100µl y 100µl de anticuerpo primario antihumano CD45 (Santa Cruz) diluido en BSA 1:100µl. La placa de cultivo se resguardó de la luz con papel aluminio y se colocó en refrigeración a 4°C durante toda la noche.
 9. Se descartó la solución con los anticuerpos primarios y se lavaron las células 3 veces con PBS-Tween 1X, 2 minutos cada lavado.
 10. Se agregaron 100µl de anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 (ThermoFisher) diluido en PBS 3:300µl para los marcadores CD44, STRO-1 y CD34, 100µl de anticuerpo secundario Donkey anti-sheep IGG NorthernLights NL557 (R&D SYSTEMS) para el marcador CD90 diluido en solución bloqueadora 1:100µl, 100µl de anticuerpo secundario FITC-Donkey antimouse IgG (Jackson) para el marcador CD45, la placa de cultivo se resguardo de la luz con papel aluminio durante 1 hora a temperatura ambiente.
 11. Se agregaron 100µl de DAPI ((4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride Invitrogen™) diluido en PBS 1:500µl por pozo para teñir los núcleos durante 5 minutos.
 9. Se lavaron las células con agua destilada y se observaron en microscopio confocal Nikon A1R+ STORM ubicado en el Instituto de Investigaciones Biomedicas, C.U, UNAM y en microscopio de epifluorescencia ZEISS Scope.A1 ubicado en en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Cinvestav, IPN.

5.6. Inducción condrogénica

Las células troncales pueden diferenciarse en condrocitos en condiciones de cultivo específicas. Para la inducción condrogénica se utilizó MesenCult™-ACF Chondrogenic Differentiation Medium (StemCell™) #05455 (Figura 21) que consta de un medio basal de 95 ml #05456 y un suplemento de 5 ml #05457.⁴⁵⁴



Figura 21.-Kit de diferenciación condrogénica. Tomado de STEMCELL TECHNOLOGIES.

Sembrado en placa de cultivo de 24 pozos para la inducción condrogénica

1. Para la inducción condrogénica se sembraron aproximadamente 5×10^3 células por pozo en forma de micromasa en placas de 24 pozos (TPP, Techno Plastic Products) (Figura 22) de la siguiente manera: células en pozo, células en andamio de PCL:PLGA (90:10) y células en andamio de PCL:PLGA (80:20) con tratamiento inductor (medio inductor), finalmente, células en andamio de PCL:PLGA (90:10) y células en andamio de PCL:PLGA (80:20) sin tratamiento inductor (medio de cultivo DMEM). Las células en pozo, las células en cada uno de los andamios sin tratamiento inductor sirvieron como grupos control y las células en cada uno de los andamios con tratamiento inductor sirvieron como grupos experimentales. Todos los grupos se realizaron por duplicado.
2. La placa de cultivo se colocó en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O_2 y 5% de CO_2 a $37^\circ C$ durante 20 minutos para que las células se adhieran a los andamios y al sustrato de la placa.
3. A cada uno de los pozos se les agregaron 1000 μ l de medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium Low-Glucose, Biowest), adicionado con Suero Bovino Fetal (FBS, Biowest) al 10%, antibióticos con antimicótico al 1% (penicilina 100U/ml, estreptomina 100 μ g/ml, anfotericina B 5 μ g/ml, Sigma-Aldrich).

4. La placa de cultivo se colocó en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 °C durante 72 horas.

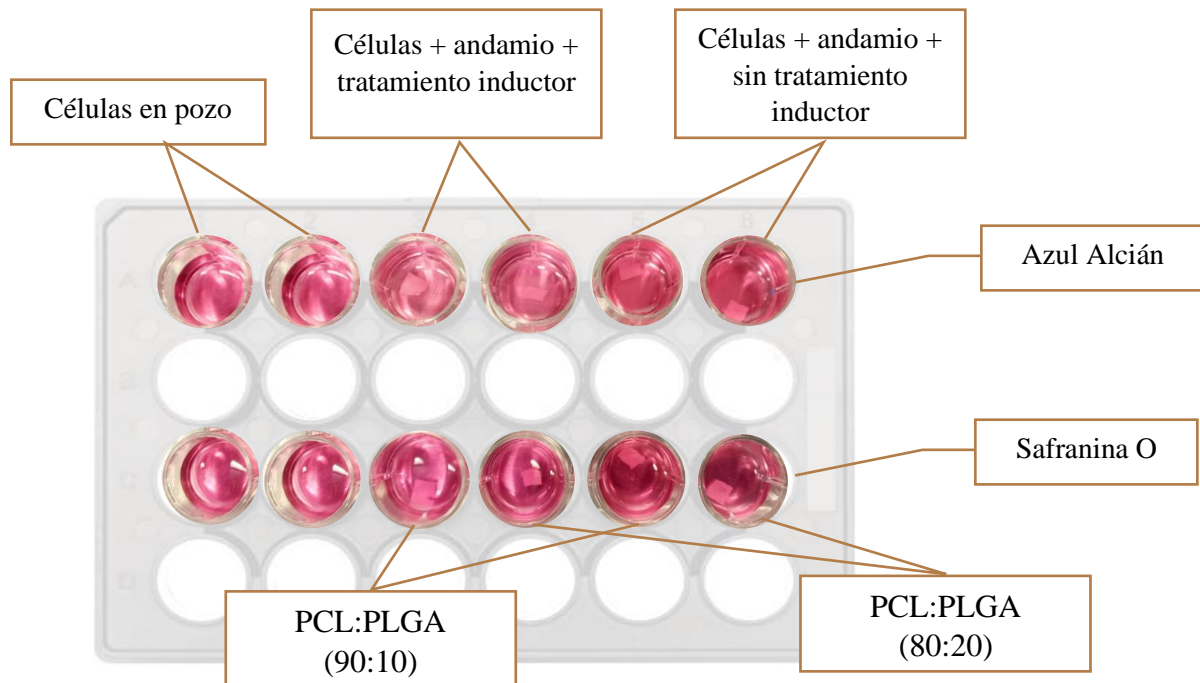


Figura 22.-Sembrado en placa de cultivo de 24 pozos para el ensayo de inducción condrogénica y tinción.

Inducción

1. Se descongeló el suplemento de diferenciación condrogénico MesenCult™ -ACF 20X Chondrogenic Differentiation Supplement, 5 ml (STEMCELL™) a temperatura ambiente.
2. Para preparar el medio de diferenciación condrogénico en un tubo de 50 ml se agregó 1 ml de suplemento por cada 19 ml de medio basal MesenCult™-ACF Chondrogenic Differentiation Basal Medium, (STEMCELL™).
3. A los pozos se les descartó el medio de cultivo e inmediatamente se les agregaron 500µl ml de PBS (Phosphate Buffered Saline, Biowest).

4. Se descartó el PBS y se agregaron 500µl ml de DMEM a las células en pozo (grupo control).
5. Se agregaron 500µl de medio de diferenciación condrogénica MesenCult™ -ACF a cada pozo de células con andamios (grupos experimentales).
6. Se colocó la placa de cultivo en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37° C durante 7 días.

Día 7:

1. Se cambió el medio a los grupos control y experimentales.
2. La placa de cultivo se colocó en la en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37° C durante 7 días.

Día 14:

1. Se cambió el medio a los grupos control y experimentales.
2. La placa de cultivo se colocó en la en la incubadora (Binder CB 150-UL) con una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37° C durante 7 días.

Día 21:

1. Una vez transcurrido el tiempo de inducción según lo recomendado por el fabricante el cultivo celular se usó para los siguientes ensayos.

5.7. Tinción Azul Alcían

El azul alcían es un colorante de carácter básico utilizado ampliamente para demostrar la presencia de glicosaminoglicanos sulfatados. El azul alcían es un derivado de las ftalocianinas y tiñe de color azul debido a la presencia de cobre.^{455,456,457}

Procedimiento

Para realizar la tinción se utilizó el kit de tinción azul alcian (Alcian Blue Staining Kit #8378, ScienCell™, USA) (Figura 23).

1. Se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos.
2. Se lavaron cuidadosamente las células con PBS durante 2 minutos.
3. Fijación en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Se retiró el paraformaldehído y se lavó por 5 minutos con agua destilada.
5. Se agregan 500µl de ácido acético al 3% (Cat.#8378c) durante 3 minutos.
6. Se retiró el ácido acético y se agregaron 500 µl de azul alcian al 1% (Cat.#8378a) durante 60 minutos a temperatura ambiente.
7. Se lavó con agua destilada por 5 minutos para retirar el colorante.
8. Finalmente, se observó con el microscopio óptico de campo claro de contraste de fases (Leica DM IL LED) con un aumento de 4x.



Figura 23.- Kit de tinción Azul Alcian ScienceCell™.

5.8. Tinción Safranina O

La safranina O, también conocido como rojo básico 2, es un tinte catiónico que se une específicamente con elementos de cargas negativas como los proteoglicanos y glicosaminoglicanos, los cuales están presentes en la matriz extracelular del cartílago articular.^{457,458,459}

Procedimiento

Para realizar la tinción se utilizó el kit de tinción de safranina O (Safranin O Staining Kit #8348, ScienCell™, USA) (Figura 24).

1. Se transfirieron 20 mg del colorante Safranina O (Cat.#8348a) en un tubo cónico de 50 ml.
2. Se agregaron 20 ml de agua destilada y se agitó suavemente para hacer la solución de Safranina O al 0.1%.
3. Se filtro la solución de Safranina O mediante un papel filtro (Whatman) en un nuevo tubo cónico de 50 ml (el fabricante recomienda usar la solución en un periodo no mayor a un mes).
4. Se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos.
5. Se lavaron cuidadosamente las células con PBS durante 2 minutos.
6. Fijación en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Se retiró el paraformaldehído y se lavó por 5 minutos con agua destilada.
8. Se agregan 500µl de ácido acético al 1% (Cat.#8348c) durante 15 segundos.
9. Se retiró el ácido acético y se agregaron 500µl de Safranina O al 0.1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Se lavó con agua destilada por 5 minutos para retirar el colorante.
11. Finalmente, se observó con microscopio óptico de campo claro de contraste de fases (Leica DM IL LED) con un aumento de 4x.



Figura 24.- Kit de tinción Safranina O ScienCell™.

6. Resultados

Cultivo celular

Se obtuvo el cultivo primario mediante la técnica de digestión enzimática, estos resultados demuestran la eficacia de dicha técnica. Después de 72 horas se realizó el cambio de medio de cultivo para eliminar las células no adherentes y restos de tejido. Las células se observaron bajo microscopio invertido Leica de campo claro para examinar su morfología y adherencia al sustrato de la placa de cultivo, observándose células cuya membrana plasmática crea proyecciones irregulares con morfologías variables: teniendo una forma similar a fibroblastos y células poligonales (Fig. 25A). Después de 3 semanas, las células proliferaron extensamente agrupándose en un gran número formando colonias con una morfología fibroblastoide homogénea, abundante citoplasma y núcleos grandes (Fig. 25B y 25C).

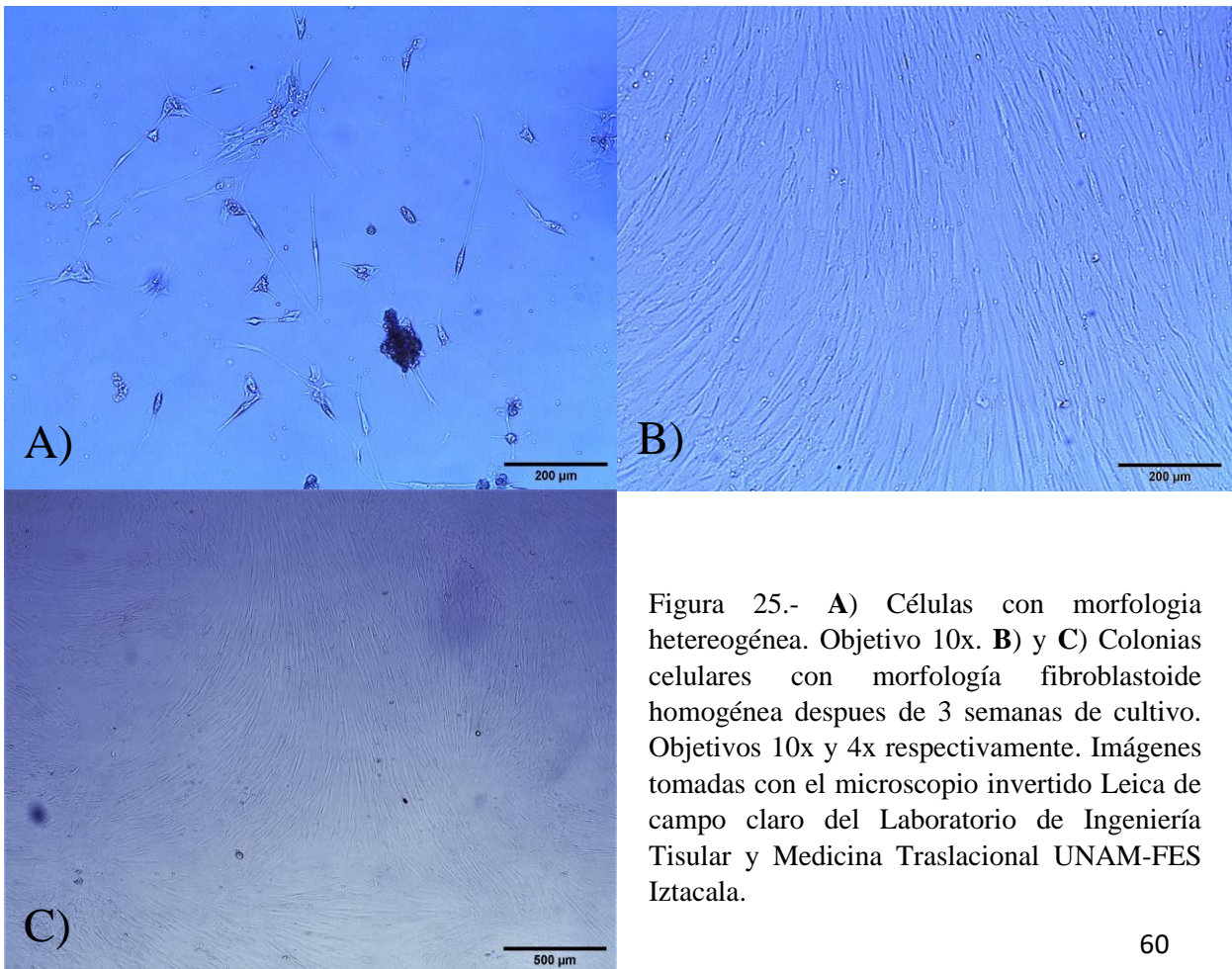


Figura 25.- **A)** Células con morfología heterogénea. Objetivo 10x. **B)** y **C)** Colonias celulares con morfología fibroblastoide homogénea después de 3 semanas de cultivo. Objetivos 10x y 4x respectivamente. Imágenes tomadas con el microscopio invertido Leica de campo claro del Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional UNAM-FES Iztacala.

Metabolismo celular

Ensayo Alamar Blue

Se evaluó cuantitativamente la actividad metabólica *in vitro* de DPSCs cultivadas en diferentes tiempos 3, 7 y 10 días usando el ensayo Alamar Blue. La gráfica (Figura 26), muestra que el metabolismo celular tuvo una tendencia al aumento entre el día 3 y el 7, manteniéndose prácticamente igual hasta el día 10. Los resultados obtenidos muestran que no hay un aumento de la muerte celular en las células sembradas en los andamios de PCL:PLGA en comparación con las células en pozo, lo que descarta la posible toxicidad de los andamios.

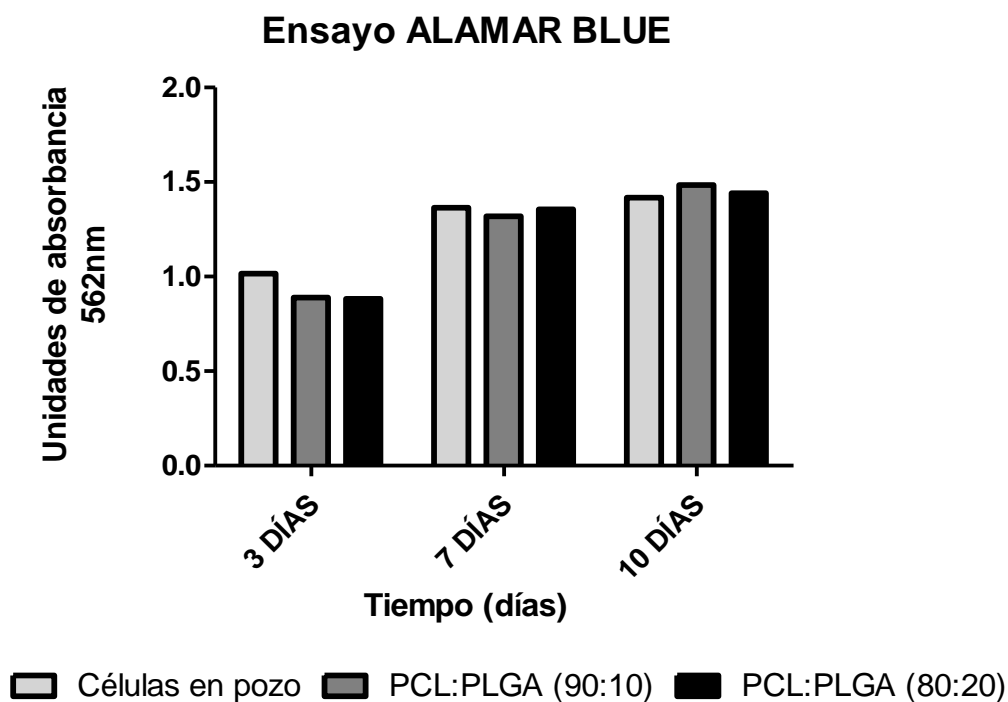


Figura 26.- Gráfica de actividad metabólica celular determinada por ensayo de Alamar Blue después de 3, 7 y 10 días.

Ensayo MTT

La optimización de las condiciones de cultivo para la actividad metabólica *in vitro* de las células troncales de la pulpa dental (DPSCs) cultivadas en diferentes tiempos (3, 7 y 10 días), se evaluó mediante el ensayo MTT. Los resultados (Figura 27) muestran un aumento de la actividad metabólica celular a partir del día 3 al día 10. La actividad metabólica de las DPSCs en pozos fue mayor en los tres tiempos en comparación con las DPSCs en andamios de PCL:PLGA. Por lo que se observa en la gráfica la actividad metabólica de las DPSCs fue mayor en el andamio de PCL:PLGA 80:20 a los 7 y 10 días, en comparación con los andamios PCL:PLGA 90:10.

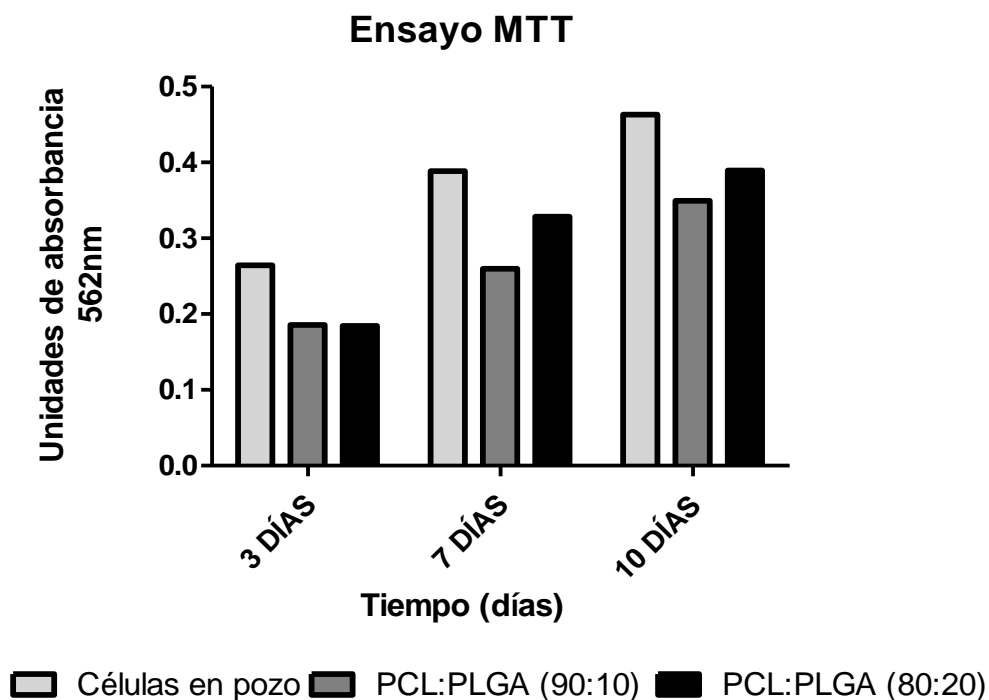


Figura 27.- Gráfica de actividad metabólica celular determinada con el ensayo de MTT después de 3, 7 y 10 días.

Inmunofenotipo

El análisis inmunofenotípico de las DPSCs reveló la expresión positiva para los marcadores mesenquimatosos CD44 (Figura 28 y 29), STRO-1 (Figura 30), CD90 (Figura 31) y reveló la expresión negativa para el marcador leucocitario CD45 (Figura 33) estos resultados indicaron la presencia de células troncales. Sin embargo, las células mostraron expresión positiva del marcador hematopoyético CD34 (Figura 32). Los datos obtenidos sugieren que las poblaciones de DPSCs poseen diversos fenotipos.

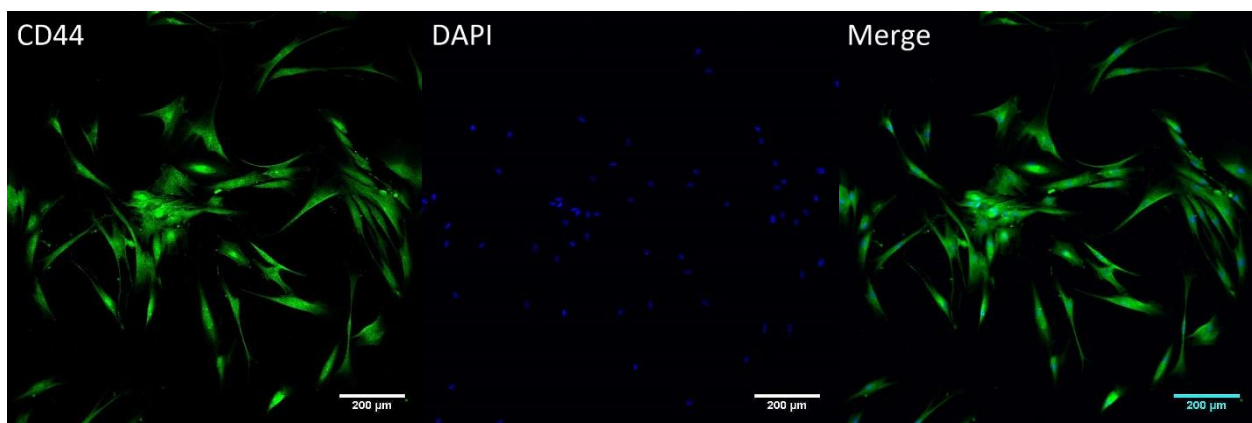


Figura 28.- Análisis de expresión con CD44. Imágenes por inmunofluorescencia 10x, tomadas con el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM, anticuerpo secundario Alexa Fluóor 488, se puede observar la membrana celular (verde) v núcleos teñidos con DAPI (azul).

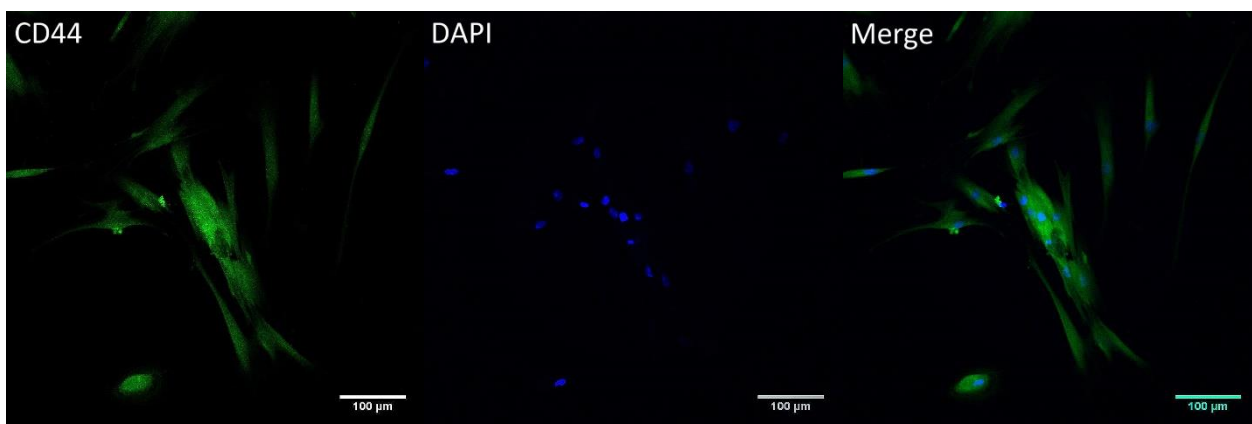


Figura 29.- Análisis de expresión con CD44. Imágenes por inmunofluorescencia 20x, tomadas con el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM, anticuerpo secundario Alexa Fluóor 488, se puede observar la membrana celular (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul).

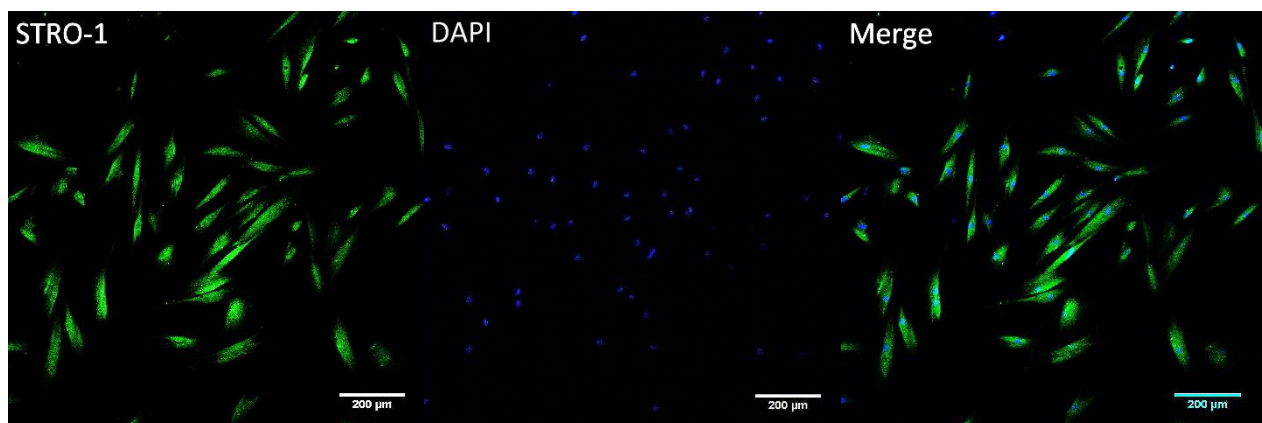


Figura 30.- Análisis de expresión con STRO-1. Imágenes por inmunofluorescencia 10x, tomadas con el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM, anticuerpo secundario Alexa Flúor 488, se puede observar la membrana celular (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul).

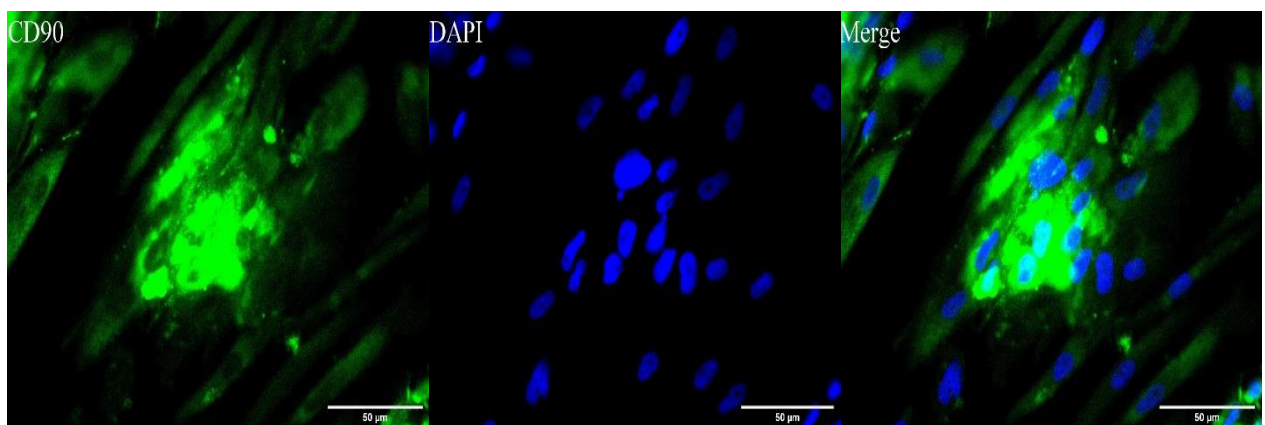


Figura 31 .- Análisis de expresión con CD90. Imágenes por inmunofluorescencia 40x, tomadas con el microscopio de epifluorescencia ZEISS Scope. A1, anticuerpo secundario Alexa Flúor 488, se puede observar la membrana celular (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul).

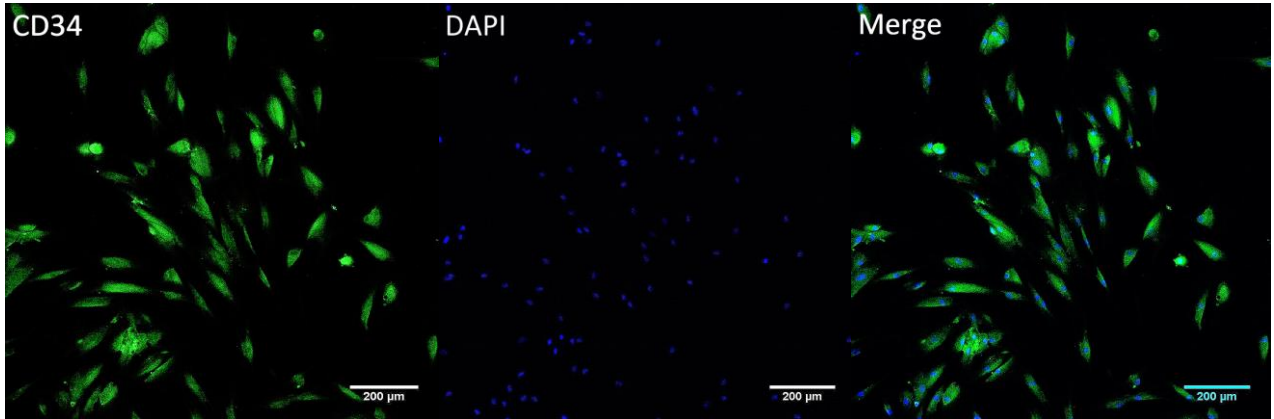


Figura 32.- Análisis de expresión con CD34. Imágenes por inmunofluorescencia 10x, tomadas con el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM, anticuerpo secundario Alexa Flúor 488, se puede observar la membrana celular (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul).

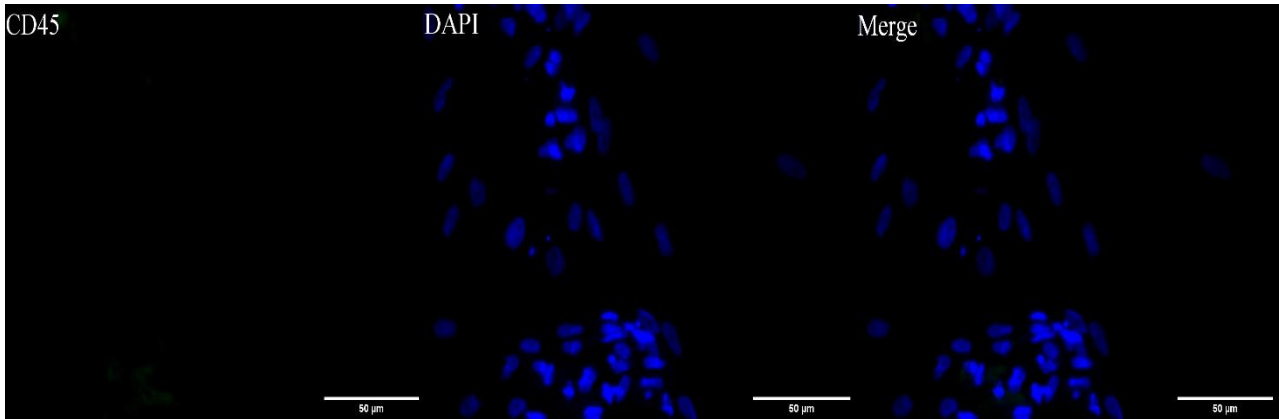
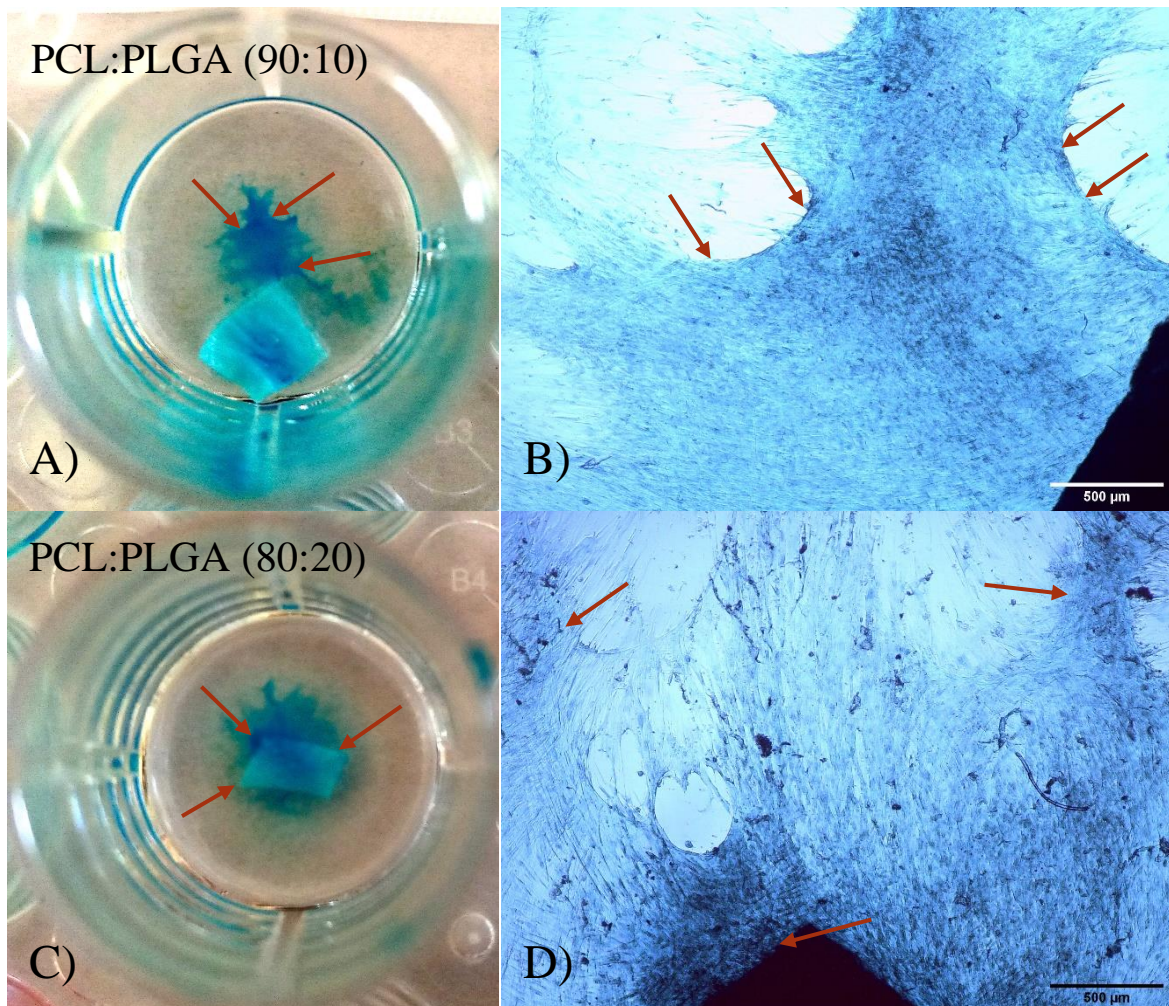


Figura 33 .- Análisis de expresión con CD45. Imágenes por inmunofluorescencia 40x, tomadas con el microscopio de epifluorescencia ZEISS Scope.A1, anticuerpo secundario Alexa Flúor 488, se puede observar que las células fueron negativas para el marcador CD45 y núcleos teñidos con DAPI (azul).

Inducción condrogénica

La evaluación histológica de las DPSCs en el día 21 de la inducción condrogénica confirmó la presencia de glicosaminoglicanos mediante las tinciones azul alcian (Figura 34) y safranina O (Figura 35), lo que demuestra el potencial de diferenciación condrogénica de las DPSCs. Los depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados visualizados con azul alcian, así como los proteoglicanos y glicosaminoglicanos evidenciados por la safranina O, se detectaron con mayor intensidad en todos los grupos con el tratamiento inductor en contraste con los grupos controles.



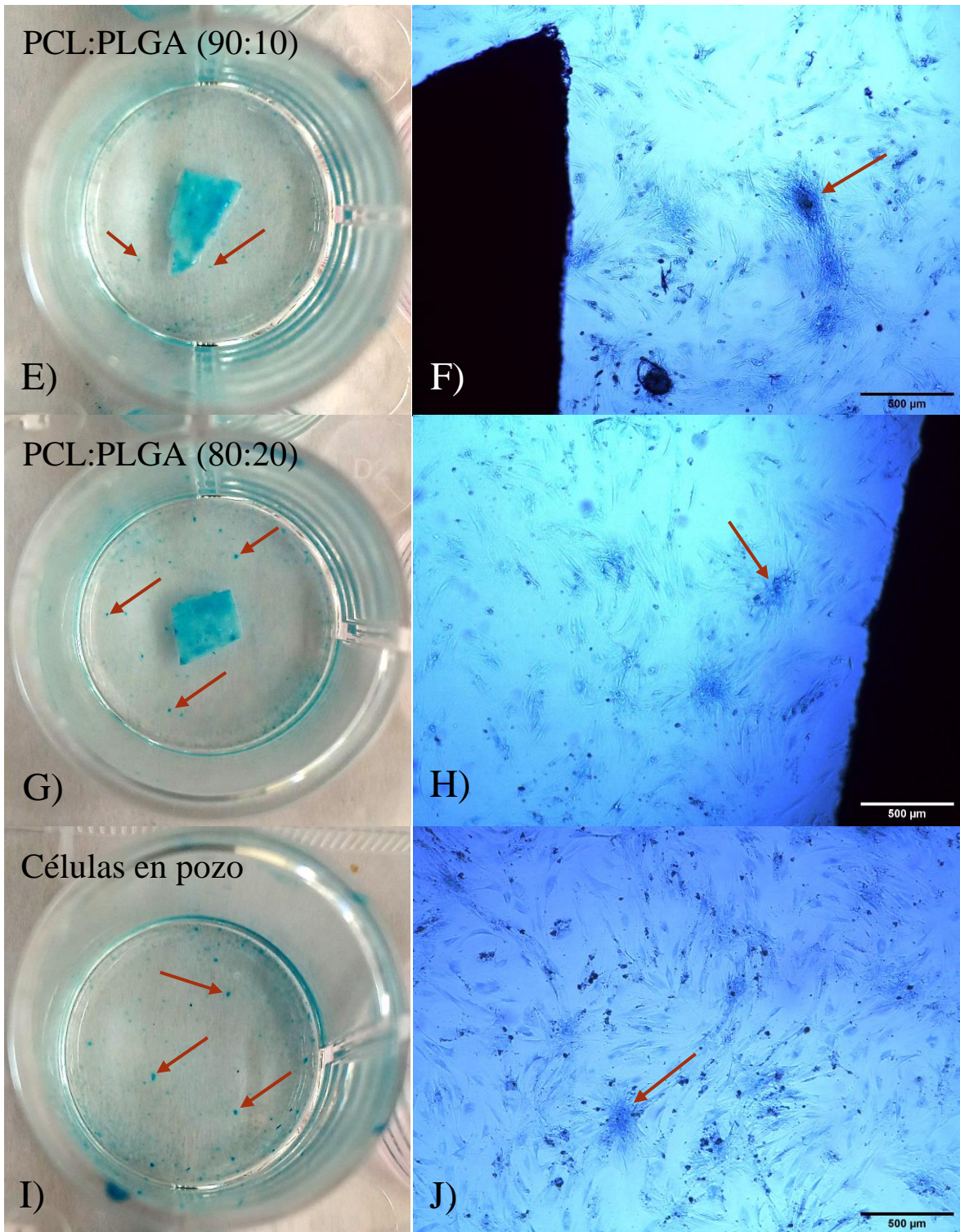
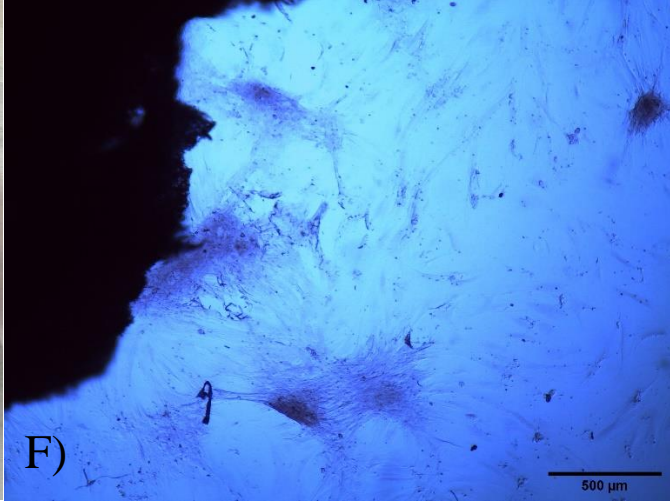
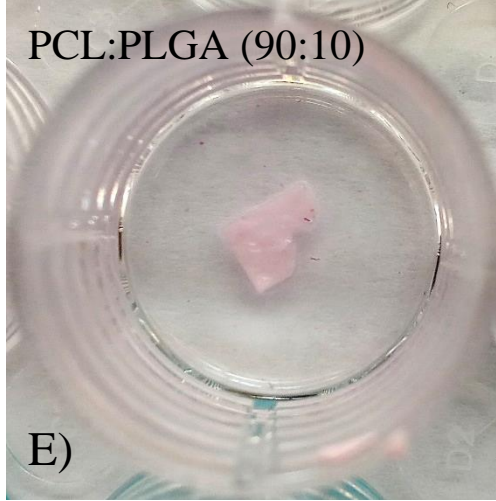
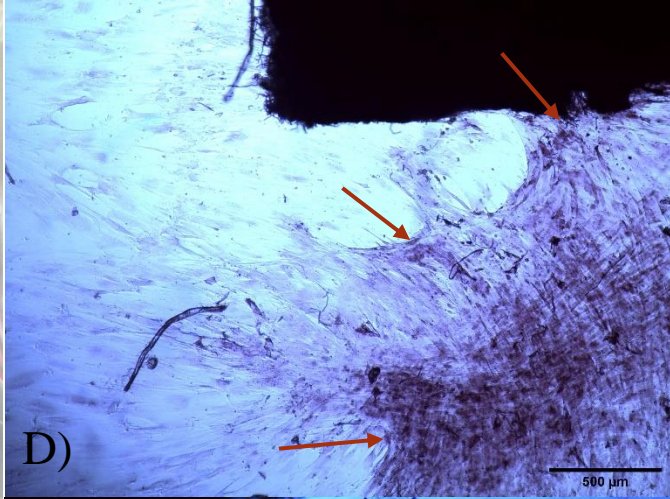
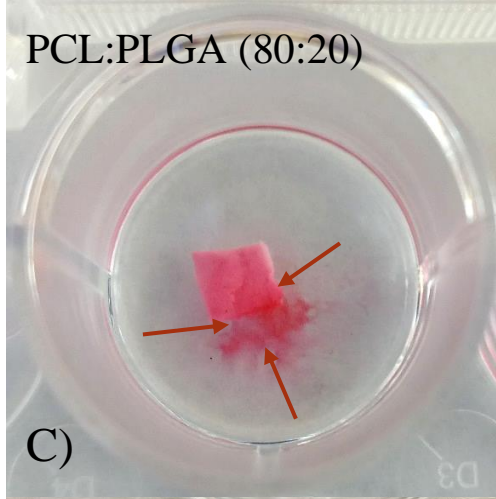
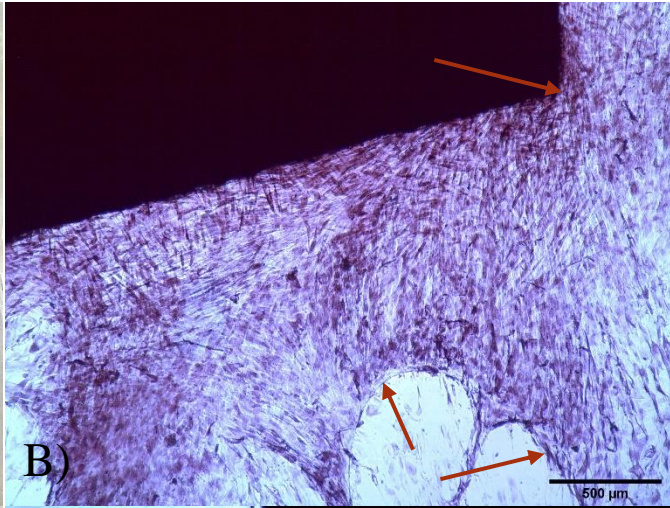
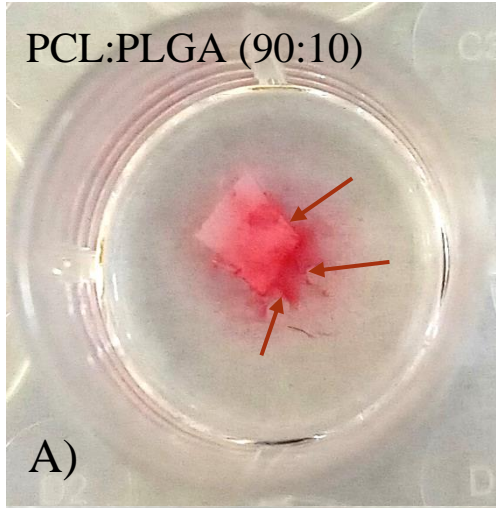


Figura 34.- Imágenes representativas de la tinción de glicosaminoglicanos sulfatados mediante azul alcian después de 21 días de incubación. **A-D** muestran las imágenes macro y microscópicas (4X), en los grupos de andamios con el tratamiento inductor; **E-H** corresponden a los grupos de andamios sin tratamiento inductor, y las imágenes **I-J** corresponden a DPSCs sin tratamiento inductor (grupo control). Las flechas rojas señalan la tinción positiva de glicosaminoglicanos por azul alcian.



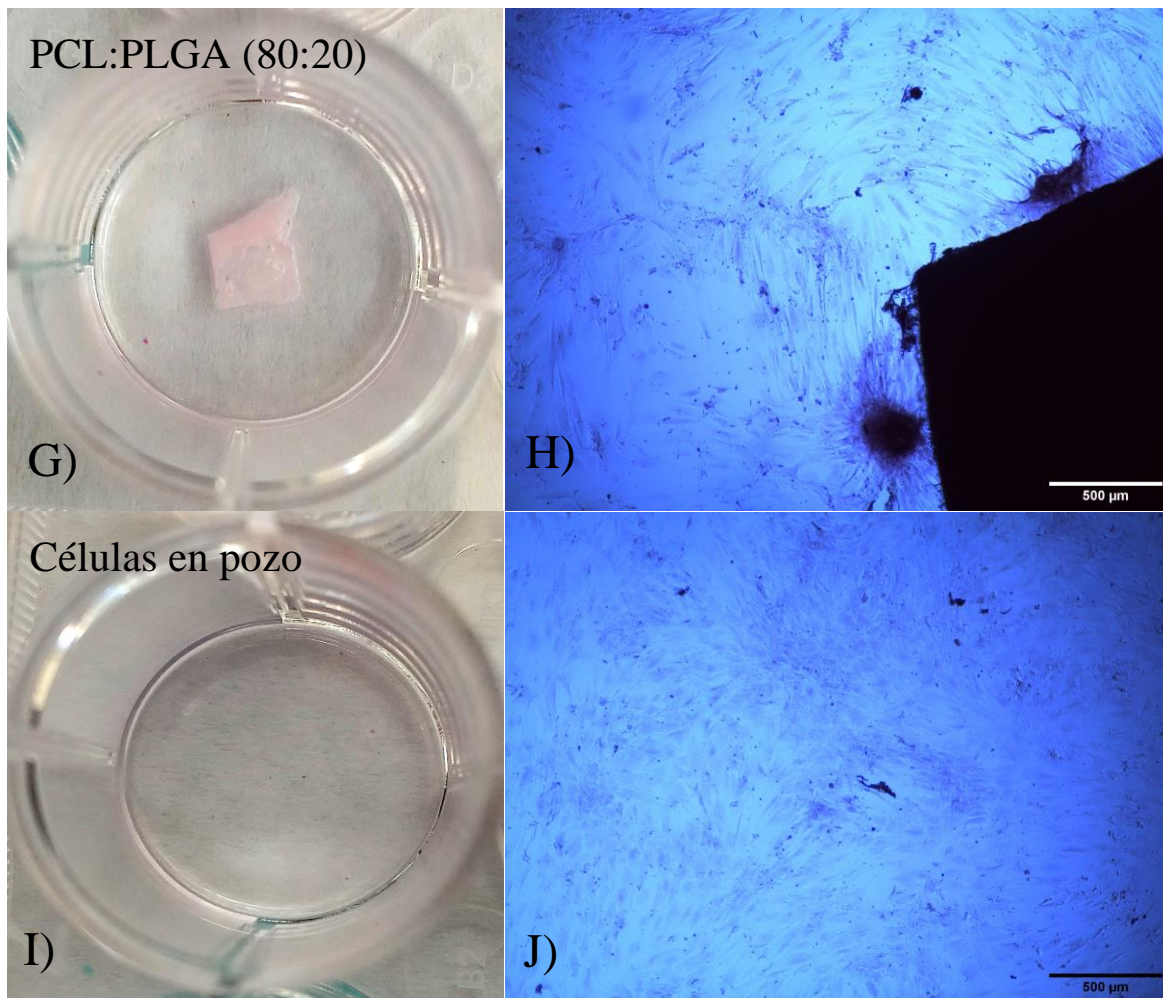


Figura 35.- Imágenes representativas de la tinción de glicosaminoglicanos y/o proteoglicanos mediante safranina O después de 21 días de incubación. **A-D** muestran las imágenes macro y microscópicas (4X), en los grupos de andamios con el tratamiento inductor; **E-H** corresponden a los grupos de andamios sin tratamiento inductor, y las imágenes **I-J** corresponden a DPSCs sin tratamiento inductor (grupo control). Las flechas rojas señalan la tinción positiva de glicosaminoglicanos y/o proteoglicanos por safranina O.

7. Discusión

Ninguna técnica disponible actualmente para el tratamiento de lesiones del cartílago articular ha sido completamente exitosa⁴⁶⁰. La técnica de estimulación de médula ósea produce una respuesta de reparación variable e irreproducible, el tejido que se forma es fibrocartílago mecánicamente inferior, por lo tanto, no es una solución a largo plazo.⁹⁹ Por otro lado, los autoinjertos osteocondrales están limitados debido al tamaño del defecto que se puede tratar y con frecuencia se observa una falta de integración periférica del cartílago.^{101,102} Los aloinjertos osteocondrales pueden reconstruir grandes defectos, pero conllevan inevitablemente a problemas inmunológicos.^{104,105} Finalmente, la implantación de condrocitos autólogos es la terapia celular más utilizada para la reparación del cartílago, y aunque los resultados clínicos son alentadores y en general satisfactorios, la principal limitación de esta técnica es la pérdida del fenotipo de los condrocitos cuando se cultivan y expanden *in vitro*.⁴⁶¹

En la actualidad las células troncales de la pulpa dental (DPSCs) representan una fuente atractiva de células troncales para la ingeniería tisular debido a su fácil acceso, mayor tasa de proliferación y multipotencialidad para diferenciarse en una gran variedad de linajes celulares.⁴⁶² En el presente estudio se describió el protocolo de obtención y caracterización de DPSCs. Utilizamos el método por digestión enzimática, este método de cultivo ha sido utilizado ampliamente para realizar cultivos primarios. Estudios previos han descrito el procedimiento para el aislamiento de las células troncales de tejidos dentales, utilizando enzimas que degradan la matriz extracelular, los resultados concuerdan con estas publicaciones, lo que demuestra la eficacia de esta técnica.^{148,149,150,151,152,155,195,196,202,463} En cuanto a la morfología celular, las DPSCs adherentes al sustrato de la placa de cultivo mostraron durante los primeros días una morfología variable teniendo una forma similar a fibroblastos, células cuboidales o poligonales como se muestra en los resultados (Figura 25A). Sin embargo, después de 3 semanas las células proliferaron extensamente agrupándose en colonias celulares con morfología fibroblastoide, abundante citoplasma y núcleos grandes (Figura 25B y 25C), por lo tanto, nuestros resultados concuerdan con estudios previos que reportan una típica morfología fibroblastoide.^{148,155,158,195,196,202,205,207,208,209,210,213}

El inmunofenotipo de las DPSCs analizado en este estudio reveló la expresión positiva para los marcadores mesenquimatosos CD44, CD90 y STRO-1, así como, la expresión negativa del marcador leucocitario CD45 estos resultados indicaron la presencia de marcadores de células troncales. STRO-1 es un marcador de células troncales ampliamente conocido y ha sido muy utilizado para el reconocimiento y aislamiento de varios tipos de células troncales, incluyendo las de tejidos dentales.^{158,200,210,211,214,216,463,464} Igualmente, el CD44 y CD90 también se expresan ampliamente en las células troncales.^{148,205,209,210,212,213} Gronthos *et al.* fueron los primeros en reportar la expresión positiva del marcador CD44 en las DPSCs.¹⁴⁸

Debido a que el cultivo no se purificó, es decir fue un cultivo heterogéneo también hubo expresión positiva de CD34 que es un marcador característico de células hematopoyéticas. Los criterios mínimos para definir a las células troncales propuestos por el International Society for Cellular Therapy en 2006, establecen que dichas células deben ser negativas para CD34 ($\leq 2\%$ de la población).¹⁵³ Sin embargo, existe evidencia publicada que demuestra la expresión de CD34 en las células troncales, las células CD34+ representan un menor porcentaje de la población celular total.⁴⁶⁵ Bakopoulou *et al.* reportaron que la expresión de CD34 por citometría de flujo de las DPSCs aisladas de terceros molares de sujetos de 16 a 18 años de edad (n=3) fue de 26.87%, 25.12% y 9.37%. También, sus resultados mostraron la expresión de CD34 en las SCAPs en un total 10.55%, 10.19% y 8.77%.²¹⁴ Laino *et al.* encontró que las DPSCs CD34+ representaban 10.09% de la población total, también, asociaron la expresión de CD34, STRO-1 y c-kit para la identificación de una población de DPSCs derivadas de la cresta neural.²¹⁶ Sidney *et al.* establecieron que las células troncales CD34+ están presentes inmediatamente después de la extracción, pero disminuye su cantidad cuando se mantienen en condiciones de cultivo *in vitro*.⁴⁶⁵ Esto concuerda con lo reportado por d'Aquino *et al.* que analizaron la expresión de varios marcadores de DPSCs mediante citometría de flujo, realizados en los días 15, 22, 30 y 36 de cultivo. En ese sentido, estos autores reportan que en el día 15 se confirmó la expresión de CD34 en un número importante de células, en el día 22 las células CD34+ eran más numerosas que en el día 15, en el día 30 las células seguían siendo CD34+ pero en menor cantidad que en el día 22, y en el día 36 la expresión de CD34 fue nula.⁴⁶⁶

Como se mencionó anteriormente en 2006 se establecen los criterios mínimos para definir a las células troncales.¹⁵³ Lin *et al.* cuestionaron esta publicación ya que el International Society for Cellular Therapy no ofrecen una explicación ¿sobre por qué el marcador CD34 debería ser un marcador negativo para las células troncales? Apunta a que la falta de expresión de CD34, se basa en células troncales cultivadas *in vitro* y no en células troncales que residen en sus respectivos nichos. Por lo tanto, la falta de expresión de CD34 es consecuencia del cultivo *in vitro*. Y concluye, con que las células CD34+ permitiría la identificación de una población de células troncales asociadas íntimamente con la vasculatura, proponiendo que las células troncales CD34+ son posiblemente células troncales vasculares.⁴⁶⁷

Estudios anteriores han indicado que las células troncales pueden interactuar con los andamios de PCL:PLGA siendo una opción por considerar en la ingeniería tisular.^{466,468,469,470,471,472,473,474,475} En el presente estudio se realizaron ensayos de actividad metabólica celular para evaluar el efecto citotóxico de los andamios PCL:PLGA (90:10) y (80:20) mediante los ensayos MTT y Alamar Blue. Estudios previos han demostrado que los ensayos MTT y Alamar Blue son confiables y se utilizan ampliamente para determinar la citotoxicidad.^{155,469,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485} Nuestros resultados evidenciaron que los andamios anteriormente mencionados promueven la viabilidad y proliferación celular lo que descarta la posible toxicidad de los mismos, coincidiendo con estudios previos que demuestran que los andamios de PCL:PLGA exhiben propiedades de biocompatibilidad proporcionando un microambiente favorable para la adhesión, migración, proliferación celular y biodegradabilidad.^{469,486,487,488}

En este estudio, se demostró que las DPSCs bajo condiciones de inducción apropiadas experimentan una diferenciación condrogénica, comprobada por la síntesis de los glicosaminoglicanos que se evidenció mediante las tinciones azul alcian y safranina O. Ambas tinciones poseen moléculas de carga positiva capaces de unirse a elemento de carga negativa como los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular del cartílago articular. Lo anterior, concuerda con los resultados de múltiples investigaciones que han reportado la expresión de glicosaminoglicanos de las DPSCs diferenciadas a linaje condrogénico mediante las tinciones azul alcian y safranina

O.^{199,203,206,210,489,490,491,492,493,494,495,496} Sin embargo, nuestros resultados ante la tinción con azul alcian, mostraron que en el grupo control la cantidad de glicosaminoglicanos sulfatados fue similar a la presente en los grupos con andamios, pero menor a la de los grupos inducidos (Figura 34); mientras que la tinción con safranina O reveló que la cantidad de proteoglicanos y/o glicosaminoglicanos fue menor en los grupos con andamio y células en pozo que la presente en los grupos inducidos (Figura 35).

Descartamos que los andamios de PCL:PLGA induzcan la diferenciación condrogénica de las DPSCs ya que la los glicosaminoglicanos sulfatados estuvieron presentes en las DPSCs sembradas en pozo. Una posibilidad que explique la presencia de glicosaminoglicanos sulfatados en el grupo control es la diferenciación espontánea de las DPSCs a linaje condrogénico. Al respecto, Xiao *et al.*, en su investigación reportó la diferenciación espontánea de las DPSCs en múltiples linajes que incluyen el neuronal, vascular, osteogénico y condrogénico, cabe resaltar que realizó un cultivo 3D de las DPSCs en un andamio de matrigel con medio osteoinductor.⁴⁹⁷ Otra posible explicación consiste en que las células pulpares *in vitro* sintetizan de manera natural glicosaminoglicanos sulfatados, de los cuales incluyen el dermatán sulfato, condroitin sulfato y ácido hialurónico⁴⁹⁸ y que también están presentes en el cartílago articular.^{21,38}

Por lo anteriormente discutido la sinergia de las células troncales, andamios y factores de crecimiento probablemente revolucione los tratamientos para las lesiones osteocartilaginosas.

8. Conclusiones

En el presente estudio se demostró que la pulpa dental representa una fuente viable y atractiva de células troncales debido al fácil acceso del sitio de recolección, siendo obtenidas de dientes que normalmente se descartan como residuos biológicos, por lo que no plantea problemas éticos.

La obtención de células troncales por digestión enzimática a partir de pulpa dental fue confirmada. En este sentido, las células derivadas de la pulpa dental mostraron características básicas de células troncales como la adherencia al plástico y una morfología fibroblastoide.

Nuestros resultados visualizaron la expresión positiva de los marcadores CD44, CD90 y STRO-1, asimismo, se constató la expresión negativa del marcador CD45 en las células de pulpa dental, evidenciando la presencia de células troncales de la pulpa dental (DPSCs).

La expresión positiva del marcador CD34 en las DPSCs obtenidas en el presente estudio, podría deberse a la falta de procedimientos de purificación celular, pero concuerda con los antecedentes de células troncales de pulpa dental.

Los ensayos Alamar Blue y MTT demostraron que el andamio PCL:PLGA permite la viabilidad celular, descartando de esta manera la citotoxicidad del andamio. Por lo tanto, este andamio puede ser considerado como un candidato para aplicaciones de ingeniería tisular en el cartílago articular. Sin embargo, se deben realizar estudios adicionales *in vivo* para evaluar otras propiedades de este andamio.

El presente estudio confirma el potencial de diferenciación condrogénico de las células troncales de pulpa dental. De manera general, nuestros resultados proporcionan evidencia sobre la eficacia de la ingeniería tisular que proponemos como un enfoque innovador dirigido a la regeneración del cartílago articular.

Expresiones de gratitud

Esta investigación fue apoyada por Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera (PAPCA) FESI-DIP-PAPCA-2016-14 y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) PAPIIT IA207420. Un especial agradecimiento al Dr.

Fernando Hernández Sánchez y al Dr. Julio Cesas Sánchez Pech del Centro de Investigación Científica de Yucatán por su donación de los andamio de PCL:PLGA.

9. Bibliografía

1. Abhijit M. Bhosale, James B. Richardson (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management, *British Medical Bulletin*, 87 (1), 77–95.
2. Zhang W, Ouyang H, Dass CR, Xu J. (2016). Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Research*.;4:15040.
3. Ali Mobasher, Mark Batt. (2016). An update on the pathophysiology of osteoarthritis, In *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, Volume 59, Issues 5–6, Pages 333-339.
4. Neogi T. (2013). The Epidemiology and Impact of Pain in Osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*.21(9):1145-1153.
5. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K.. (2012). Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell and Tissue Research*. 347(3):613-627.
6. Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. (2009). The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Critical reviews in biomedical engineering*.37(1-2):1-57.
7. Yu Liu, Guangdong Zhou, Yilin Cao. (2017). Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering—Our Experience and Future Directions, *Engineering*, Volume 3, Issue 1,28-35.
8. Raju Vaishya. (2016). The journey of articular cartilage repair, In *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, Volume 7, Issue 3,135-136.
9. Thomas M. Link. (2011). *Cartilage Imaging Significance, Techniques, and New Developments*.Springer.1-10.
10. Archer W., Francis-West P.(2003) The chondrocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:401–404.
11. Williams, Riley J. (2007). *Cartilage Repair Strategies*. Humana press.1-12.
12. Wang, Y., Wei, L., Zeng, L., He, D., & Wei, X. (2012). Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 21(8), 1751-62.
13. Ross Michael H, Pawlina Wojciech. (2013). *Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 6ª edición. Medicapanamericana.198-217.
14. Junqueira L.C, Carneiro José. (2015). *Histología Básica Texto y Atlas*.12ª edición. Medicapanamericana.126-130.
15. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. (2003). Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg*.85A:45-57.
16. Sepulveda Juilio. (2013). *Texto y Atlas de Histología: Biología celular y tisular*. McGraw Hill Interamericana.99-106.
17. Watkins, J., & Mathieson, I. (2009). Connective tissues. *The Pocket Podiatry Guide: Functional Anatomy*, 107–156.
18. Shetty Asode Ananthram, Kim Seok-Jung, Nakamura Norimasa, Brittberg Mats.. (2014). *Techniques in Cartilage Repair Surgery*. Springer Berlin Heidelberg.17-21.
19. Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*, 1(6), 461-8.
20. Ng HY, Alvin Lee KX, Shen YF. (2017). Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. *JSM Bone and Joint Dis* 1(2): 1010
21. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. (2017). Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med*. 36: 413-425.
22. Parvizi Javad, Kim Gregory K. (2010). In *High Yield Orthopaedics*, W.B. Saunders, Philadelphia.40-41,80-81.
23. Cohen NP1, Foster RJ, Mow VC. (1998). Composition and Dynamics of Articular Cartilage: Structure, Function, and Maintaining Healthy State. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*.:28. 4 ,203-215.
24. Kheir Ehab, Shaw David. (2009). Hyaline articular cartilage, In *Orthopaedics and Trauma*:23. 450-455.
25. Ovalle, W.K.Nahirney, P.C. (2013). *Netter's Essential Histology*.Chapter 6 - Cartilage and Bone,Pages 131-156.

26. Brusco Herminia A, Costa Juan J, Loidl César F. (2014). *Histología médico-práctica*. Elsevier, Barcelona, España.133-151.
27. Wilkins R, Cross S, Megson I. (2011). *Oxford Handbook of Medical Sciences*. OUP Oxford.P.P.270.
28. Guo, H., & Torzilli, P. A. (2016). Shape of chondrocytes within articular cartilage affects the solid but not the fluid microenvironment under unconfined compression. *Acta biomaterialia*, 29, 170–179.
29. Gentili Chiara, Cancedda Ranieri. (2009). *Cartilage and Bone Extracellular Matrix,Current Pharmaceutical Design*:15, 12, 1334-1348.
30. Wilusz Rebecca E, Sanchez Johannah, Guilak Farshid. (2014). The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage, In *Matrix Biology*:39, 25-32.
31. Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Haider MA. (2006). The Pericellular Matrix as a Transducer of Biomechanical and Biochemical Signals in Articular Cartilage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068: 498–512.
32. Ulici V., Chen A.F., Cheng A.W.M., Tuan R.S. (2017) *Anatomy: Cartilage*. In:McCarthy J., Noble P., Villar R. (eds) *Hip Joint Restoration*. Springer, Nueva York, NY.
33. Martin R.B., Burr D.B., Sharkey N.A., Fyhrie D.P. (2015) *Skeletal Biology*. In: *Skeletal Tissue Mechanics*. Springer, New York, NY. pp 35-93.
34. Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78, 929-58.
35. Grässel S. (2016) *Collagens in Hyaline Cartilage*. In: Grässel S., Aszódi A. (eds) *Cartilage*. Springer, Cham. pp 23-53.
36. Eyre D. (2001). Collagen of articular cartilage. *Arthritis research*, 4(1), 30-5.
37. Luo, Y., Sinkeviciute, D., He, Y., Karsdal, M., Henrotin, Y., Mobasheri, A., Önnarfjord, P., ... Bay-Jensen, A. (2017). The minor collagens in articular cartilage. *Protein & cell*, 8(8), 560-572.
38. Lindahl U, Couchman J, Kimata K, et al. (2017). *Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans*. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453033/doi:10.1101/glycobiology.3e.017>
39. Frati-Munari, A. C. (2012). Glicosaminoglicanos en las enfermedades vasculares. *Reviews Mex Angiol*, 40, 89–99.
40. Yamada, S., Sugahara, K., & Ozbek, S. (2011). Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study. *Communicative & integrative biology*, 4(2), 150-8.
41. Gandhi N. S. Mancera R. L. (2008). The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design*, 72: 455–482.
42. Zhang Fuming, Zhang Zhenqing, Linhardt Robert J.(2010). Chapter 3 - Glycosaminoglycans, In *Handbook of Glycomics*, edited by Richard D. Cummings and J. Michael Pierce, Academic Press, San Diego,59-80.
43. Roughley PJ. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater*. 30;12:92-101.
44. Roughley P.J. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Research*.;3(6):342-347.
45. Asperg A. (2016) *Cartilage Proteoglycans*. In: Grässel S., Aszódi A. (eds) *Cartilage*. Springer, Cham. pp 1-22.
46. Knudson CB, Knudson W. (2001). Cartilage proteoglycans, In *Seminars in Cell & Developmental Biology*,12, 69-78.
47. Roughley P.J., Lee ER. (1994). Cartilage proteoglycans: Structure and potential functions. *Microsc. Res. Tech.*, 28: 385-397.
48. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, and Yang BB (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 12:19–32.
49. Roughley, P.J., &Mort, J. S. (2014). The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *Journal of experimental orthopaedics*, 1(1), 8.
50. Halloran, J. P., Sibole, S., van Donkelaar, C. C., van Turnhout, M. C., Oomens, C. W., Weiss, J. A., Guilak, F., ... Erdemir, A. (2012). Multiscale mechanics of articular cartilage: potentials and challenges of coupling musculoskeletal, joint, and microscale computational models. *Annals of biomedical engineering*, 40(11), 2456-74.
51. Han, E. H., Chen, S. S., Klisch, S. M., & Sah, R. L. (2011). Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage. *Biophysical journal*, 101(4), 916-24.
52. Benjamin, M., & Ralphs, J. . (2004). *Biology of Fibrocartilage Cells*. *International Review of Cytology*, 1–45.
53. Hu, J. C. Y., & Athanasiou, K. A. (2003). Structure and Function of Articular Cartilage. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*, 73–95.
54. Leslie P. Gartner, James L. Hiatt (2010). *Concise Histology*. Chapter 7-Cartilage and Bone. Elsevier Health Sciences, Pages 74-93.

55. Kierszenbaum, A.L. and Tres, L. (2011). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Elsevier Health Sciences. Pages 128-131.
56. Norton, N.S. (2016). *Netter's Head and Neck Anatomy for Dentistry*. Elsevier Health Sciences, 448.
57. Williams GM, Klisch SM, Sah RL. (2008). Bioengineering Cartilage Growth, Maturation, and Form. *Pediatric Research* 63, 527–534.
58. Johnson VL, Hunter DJ. (2014). The epidemiology of osteoarthritis, In *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*;28, 1, 5-15.
59. Arden N, Nevitt MC. (2006). Osteoarthritis: Epidemiology, In *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*; 20,1, 3-25.
60. Busija Lucy, Bridgett Lisa, Williams Sean, Osborne Richard H., Buchbinder Rachele, March Lyn, Fransen Marlene. (2010). Osteoarthritis, In *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*;24,6, 757-768.
61. Espinosa MA, C. Cajigas JC, Esquivel JA. (2013). Reunión multidisciplinaria de expertos en diagnóstico y tratamiento de pacientes con osteoartritis. *Actualización basada en evidencias. Med Int Mex*;29:67–92.
62. Samson DJ, Grant MD, Ratko TA, et al. *Treatment of Primary and Secondary Osteoarthritis of the Knee*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2007 Sep. (Evidence Reports/Technology Assessments, No. 157.) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK38385/>
63. Zhang, Y., & Jordan, J. M. (2010). Epidemiology of osteoarthritis. *Clinics in geriatric medicine*, 26(3), 355-69.
64. Garstang SV, Stitik TP. (2006). Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil*;85,2–11.
65. Felson DT. (2000). Osteoarthritis new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med*;133:637–9.
66. Price MD, Herndon JH. (2009). Gender differences in osteoarthritis. *Menopause*: 16, 4,624-625.
67. Roman-Blas, J. A., Castañeda, S., Largo, R., & Herrero-Beaumont, G. (2009). Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis research & therapy*, 11(5), 241.
68. Fernández-Moreno, M., Rego, I., Carreira-Garcia, V., & Blanco, F. J. (2008). Genetics in osteoarthritis. *Current genomics*, 9(8), 542-7.
69. Hardcastle, S. A., Dieppe, P., Gregson, C. L., Davey Smith, G., & Tobias, J. H. (2015). Osteoarthritis and bone mineral density: are strong bones bad for joints?. *BoneKEY reports*, 4, 624. doi:10.1038/bonekey.2014.119
70. McAlindon, T. E., Jacques, P., Zhang, Y., Hannan, M. T., Aliabadi, P., Weissman, B., Rush, D., Levy, D. and Felson, D. T. (1996), Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis?. *Arthritis & Rheumatism*, 39: 648–656.
71. Ameye, L. G., & Chee, W. S. (2006). Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis research & therapy*, 8(4), R127.
72. Bliddal, H., Leeds, A. R., & Christensen, R. (2014). Osteoarthritis, obesity and weight loss: evidence, hypotheses and horizons - a scoping review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 15(7), 578-86.
73. Yucesoy, B., Charles, L. E., Baker, B., & Burchfiel, C. M. (2015). Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: a review. *Work (Reading, Mass.)*, 50(2), 261-73.
74. [Buckwalter JA](#). (2003). Sports, Joint Injury, and Posttraumatic Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*;33,10,578–588.
75. Heijink, A., Gomoll, A. H., Madry, H., Drobnič, M., Filardo, G., Espregueira-Mendes, J., & Van Dijk, C. N. (2011). Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 20(3), 423-35.
76. Neogi, T., & Zhang, Y. (2012). Epidemiology of osteoarthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 39(1), 1-19.
77. Hunter, D. J., McDougall, J. J., & Keefe, F. J. (2008). The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 34(3), 623-43.
78. Goldring, SR, Goldring, MB. (2016) Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol*;12(11):632–644.
79. Pereira D, Ramos E, Branco J (2015) Osteoarthritis. *Acta medica portuguesa* 28:99–106
80. Yusuf, E. (2016). Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis. *Current Treatment Options in Rheumatology*. 2: 111–125.
81. Rannou F, Poiraudou S. (2010). Non-pharmacological approaches for the treatment of osteoarthritis, In *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*;24:93-106.
82. Smolen Josef S, Aletaha Daniel, Barton Anne, et al. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*;4: 18001.
83. Ravelli A, Martini A. (2007). Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*;369:767-778.
84. Akgul, O., & Ozgocmen, S. (2011). Classification criteria for spondyloarthropathies. *World journal of orthopedics*, 2(12), 107-15.

85. Kumar, V. (2010). Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional 8 ed. Elsevier.1237-1240.
86. Smith J. W., Chalupa P., Shabaz Hasan M.. (2006). Infectious arthritis: clinical features, laboratory findings and treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:309–314.
87. Shirliff, M. E., & Mader, J. T. (2002). Acute septic arthritis. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 527-44.
88. Cuéllar, M. L., Silveira, L. H., & Espinoza, L. R. (1992). Fungal arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 51(5), 690-7.
89. Peng, S. L. 2002. Rheumatic manifestations of parasitic diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* 31:228-247.
90. Marks M, Marks JL (2016) Viral arthritis. *Clin Med (Lond)* 16:129–134.
91. Edwards N.L. (2008) Gout. In: Klippel J.H., Stone J.H., Crofford L.J., White P.H. (eds) *Primer on the Rheumatic Diseases*. Springer, New York, NY.
92. Brittany Liam B. (2007). Costochondritis, In *Pediatric Clinical Advisor (Second Edition)*, edited by Lynn C. Garfunkel, Jeffrey M. Kaczorowski and Cynthia Christy, Mosby, Philadelphia 139-140.
93. Ngnitewe Massa R, Mesfin FB. (2018) Herniation, Disc. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441822/>.
94. Martin Granizo, Correa Muñoz DC. (2018). Chondromalacia as pathological finding in arthroscopy of the temporomandibular joint: A retrospective study, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*;46, 82-89.
95. F. Accadbled, J. Vial, J. Sales de Gauzy. (2018). Osteochondritis dissecans of the knee, *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*;104,94-105.
96. Zhang Yaxia, Rosenberg Andrew E. (2014). Cartilaginous neoplasms of soft tissue and joints, In *Diagnostic Histopathology*; 20, 200-207.
97. Bovée JV, Hogendoorn PC, Wunder JS, Alman BA. (2010). Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*;10,481–488.
98. Murawski, C. D., Foo, L. F., & Kennedy, J. G. (2010). A Review of Arthroscopic Bone Marrow Stimulation Techniques of the Talus: The Good, the Bad, and the Causes for Concern. *Cartilage*, 1(2), 137-44.
99. Hunziker E.B., Lippuner K., Keel M.J.B., Shintani N. (2015). An educational review of cartilage repair: precepts & practice – myths & misconceptions – progress & prospects, In *Osteoarthritis and Cartilage*;23,334-350.
100. Mirza, M. Z., Swenson, R. D., & Lynch, S. A. (2015). Knee cartilage defect: marrow stimulating techniques. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 8(4), 451-6.
101. Guermazi, Ali and Roemer, Frank W. et al. (2015). State of the Art: MR Imaging after Knee Cartilage Repair Surgery, *Radiology*; 277:1, 23-43.
102. Patil, S., & Tapasvi, S. R. (2015). Osteochondral autografts. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 8(4), 423-8.
103. Nikolaou VS, Giannoudis PV. (2017). History of osteochondral allograft transplantation, In *Injury*;48:1283-1286.
104. Torrie AM, Kesler WW, Elkin J, Gallo RA. (2015). Osteochondral allograft. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*.;8(4):413-422.
105. Gracitelli GC, Meric G, Pulido PA, McCauley JC, Bugbee WD. (2015). Osteochondral Allograft Transplantation for Knee Lesions after Failure of Cartilage Repair Surgery. *Cartilage*.;6(2):98-105.
106. Hinckel BB, Gomoll AH. (2017). Autologous Chondrocytes and Next-Generation Matrix-Based Autologous Chondrocyte Implantation, In *Clinics in Sports Medicine*;6, 2017,525-548.
107. Hunter, D. (2014). Treatment of Osteoarthritis. *Atlas of Osteoarthritis*, 83–100.
108. Gademan, M. G., Hofstede, S. N., Vliet Vlieland, T. P., Nelissen, R. G., & Marang-van de Mheen, P. J. (2016). Indication criteria for total hip or knee arthroplasty in osteoarthritis: a state-of-the-science overview. *BMC musculoskeletal disorders*, 17(1), 463. doi:10.1186/s12891-016-1325-z
109. Cheung S., Ma C.B. (2011) *Clinical Aspects: An Orthopedic Surgeon’s Perspective*. In: Link T. (eds) *Cartilage Imaging*. Springer, New York, NY.
110. Choi, Y. J., & Ra, H. J. (2016). Patient Satisfaction after Total Knee Arthroplasty. *Knee surgery & related research*, 28(1), 1-15.
111. Qi Yiying, Feng Gang, Yan Weiqi. (2012). Mesenchymal stem cell-based treatment for cartilage defects in osteoarthritis;39:5683–5689.
112. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260, 920– 926.
113. Rosales Ibañez Raul. (2012). Ingeniería Tisular en Odontología, *ADM;LXIX*:164-167.
114. Kessler, M. W., & Grande, D. A. (2008). Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis*, 4(1), 28-32.
115. Fergal J. O'Brien. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, In *Materials Today*;14:88-95.
116. Botes W.M., Nöthling Slabbert M., Alessandrini M., Pepper M.S. (2016). Stem Cell Therapy: Accepted Therapies, Managing the Hope of Society, and a Legal Perspective. In: Pham P. (eds) *Stem Cell Processing. Stem Cells in Clinical Applications*. Springer, Cham.
117. Kawanabe, N., Fukushima, H., Ishihara, Y. et al. (2015). Isolation and characterization of SSEA-4-positive subpopulation of human deciduous dental pulp cells *Clin Oral Invest*;19: 363-371.

118. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2:83–92.
119. Secunda, R., Vennila, R., Mohanashankar, A. M., Rajasundari, M., Jeswanth, S., & Surendran, R. (2014). Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*, 67(5), 793-807.
120. Grässel, S., Stöckl, S., & Jenei-Lanzl, Z. (2012). Isolation, Culture, and Osteogenic/Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*, 203–267.
121. Erices, A., Conget, P. and Minguell, J. J. (2000), Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 109: 235–242.
122. Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M. and Davies, J. E. (2005), Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *STEM CELLS*, 23: 220–229.
123. Pelekanos, R. A., Sardesai, V. S., Futrega, K., Lott, W. B., Kuhn, M., & Doran, M. R. (2016). Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (112), 54204.
124. Wu, M., Zhang, R., Zou, Q., Chen, Y., Zhou, M., Li, X., ... Chen, Q. (2018). Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord. *Scientific Reports*, 8(1).
125. Lee, J.-H., Park, H.-J., Kim, Y.-A., Lee, D.-H., Noh, J.-K., Kwon, C. H. D., ... Lee, S.-K. (2012). The Phenotypic Characteristic of Liver-Derived Stem Cells From Adult Human Deceased Donor Liver. *Transplantation Proceedings*, 44(4), 1110–1112.
126. Herrera, M. B., Bruno, S., Buttiglieri, S., Tetta, C., Gatti, S., Deregibus, M. C., Bussolati, B. and Camussi, G. (2006), Isolation and Characterization of a Stem Cell Population from Adult Human Liver. *STEM CELLS*, 24: 2840-2850.
127. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R., et al. (2009). Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *The FASEB Journal*;23:10:3494-3505.
128. Zhu, M., Heydarkhan-Hagvall, S., Hedrick, M., Benhaim, P., & Zuk, P. (2013). Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (79), e50585.
129. Merceron, C., Portron, S., Masson, M., Lesoeur, J., Fellah, B. H., Gauthier, O., ... Vinatier, C. (2011). The Effect of Two- and Three-Dimensional Cell Culture on the Chondrogenic Potential of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells after Subcutaneous Transplantation with an Injectable Hydrogel. *Cell Transplantation*, 20(10), 1575–1588.
130. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. and Luyten, F. P. (2001), Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*, 44: 1928–1942.
131. Harvanová D, Tóthová T, Sarišský M, Amrichová J, Rosocha J.(2011). Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha)*;57(3):119-24.
132. Spitzhorn, L. S., Rahman, M. S., Schwindt, L., Ho, H. T., Wruck, W., Bohndorf, M., Wehrmeyer, S., Ncube, A., Beyer, I., Hagenbeck, C., Balan, P., Fehm, T., ... Adjaye, J. (2017). Isolation and Molecular Characterization of Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Obtained from Caesarean Sections. *Stem cells international*, 2017, 5932706.
133. You, Q., Cai, L., Zheng, J., Tong, X., Zhang, D., & Zhang, Y. (2008). Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 103(2), 149–152.
134. Branch Matthew James, Hashmani Khurram, Dhillon Permesh, D. Rhodri E.Jones ,Dua Harminder Singh,Hopkinson Andrew (2012) Mesenchymal Stem Cells in the Human Corneal Limbal Stroma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*;53(9):5109-5116.
135. Veréb Zoltán, Póliska Szilárd, Albert Réka, Olstad Ole Kristoffer, Boratkó Anita, Csontos Csilla, Moe Morten C., Fackó Andrea, Petrovski Goran (2016) Role of Human Corneal Stroma-Derived Mesenchymal-Like Stem Cells in Corneal Immunity and Wound Healing, *Scientific Reports*,6,26227.
136. Zanini C, Bruno S, Mandili G, Baci D, Cerutti F, Cenacchi G, et al. (2011) Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Pancreatic Islets and Bone Marrow into Islet-Like Cell Phenotype. *PLoS ONE* 6(12): e28175.
137. Seeberger Karen L, Dufour Jannette M, Shapiro Andrew M James, Lakey Jonathan R T, Rajotte Ray V, Korbitt Gregory S (2006) Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium, *Laboratory Investigation*, volume 86, pages 141–153.
138. Jackson, R., Mount, S., Ye, B., Mayfield, A. E., Chan, V., Boodhwani, M., Davies, R. A., Haddad, H., ... Davis, D. R. (2017). Isolation of human explant derived cardiac stem cells from cryopreserved heart tissue. *PloS one*, 12(4), e0176000.
139. Messina Elisa, De Angelis Luciana, Frati Giacomo, et al. (2004) Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine Heart, *Circulation Research*.95:911–921.
140. Jarvinen, L., Badri, L., Wettlaufer, S., Ohtsuka, T., Standiford, T. J., Toews, G. B., Pinsky, D. J., Peters-Golden, M., ... Lama, V. N. (2008). Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts

- inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 181(6), 4389-96.
141. Rolandsson, S., Andersson Sjöland, A., Brune, J. C., Li, H., Kassem, M., Mertens, F., Westergren, A., Eriksson, L., Hansson, L., Skog, I., Bjermer, L., Scheding, S., ... Westergren-Thorsson, G. (2014). Primary mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells. *BMJ open respiratory research*, 1(1), e000027.
 142. Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I., & Ancans, J. (2009). Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*, 58(3), 153-62.
 143. Toma, J. G., McKenzie, I. A., Bagli, D. and Miller, F. D. (2005), Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin. *STEM CELLS*, 23: 727-737.
 144. Alessandri, Giulio et al. (2004), Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages, *The Lancet*, Volume 364, Issue 9448, 1872 – 1883.
 145. Tamaki, T., Uchiyama, Y., Hirata, M., Hashimoto, H., Nakajima, N., Saito, K., Terachi, T., ... Mochida, J. (2015). Therapeutic isolation and expansion of human skeletal muscle-derived stem cells for the use of muscle-nerve-blood vessel reconstitution. *Frontiers in physiology*, 6, 165.
 146. Sanai, Nader et al. (2004), Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration, *Nature* 427, 740 – 744.
 147. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, et al. (1999), Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*. 156(2):333–44.
 148. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS U S A*;97:13625–30
 149. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS U S A*;100:5807-12
 150. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*;364:149-55.
 151. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, et al (2006) Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE* 1(1): e79.
 152. C. Morscbeck, W. Götz, J. Schierholz, F. Zeilhofer, U. Kühn, C. Möhl, C. Sippel, K.H. Hoffmann. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth, *In Matrix Biology*;24(2):155-165.
 153. M Dominici, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* ;8(4):315-317.
 154. Miko M, Danišovič L, Majidi A, Varga I. (2015). Ultrastructural Analysis of Different Human Mesenchymal Stem Cells After in Vitro Expansion: A Technical Review. *European Journal of Histochemistry* : EJM;59(4):2528.
 155. Hilkens, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., ... Bronckaers, A. (2013). Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell and Tissue Research*, 353(1), 65–78.
 156. Páll, E., Florea, A., Sorişău, O., Cenariu, M., Petruşiu, A., & Roman, A. (2015). Comparative Assessment of Oral Mesenchymal Stem Cells Isolated from Healthy and Diseased Tissues. *Microscopy and Microanalysis*, 21(5), 1249-1263.
 157. Hayflick L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Experimental Cell Research*;37, 3,1965,614-636.
 158. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K. (2016). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*;45, 1,124-131.
 159. Kunimatsu R, Nakajima K, Awada T, Tsuka Y, Abe T, Ando K, Hiraki T, Kimura A, Tanimoto K. (2018). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*;501, 1,193-198.
 160. Jin, H. J., Bae, Y. K., Kim, M., Kwon, S. J., Jeon, H. B., Choi, S. J., Kim, S. W., Yang, Y. S., Oh, W., ... Chang, J. W. (2013). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 17986-8001.
 161. Chen JY, Mou XZ, Du XC, Xiang C. (2015). Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*;8,9,739-746.
 162. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. and Bieback, K. (2006), Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *STEM CELLS*, 24: 1294-1301.

163. Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T, Doody M, Venter D, Pain S, Gilshenan K, Atkinson K. (2008). Comparison of Human Placenta- and Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development* 17:6, 1095-1108.
164. Baksh, D., Yao, R. and Tuan, R. S. (2007), Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *STEM CELLS*, 25: 1384-1392.
165. Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K. and Muneta, T. (2005), Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis & Rheumatism*, 52: 2521-2529.
166. Li Y, Charif N, Mainard D, Bensoussan D, Stoltz JF, de Isla N. (2014). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Bio-Medical Materials and Engineering*;24,1,47-52.
167. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*;33, 6,919-926.
168. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevasis, C. N. and Papamichail, M. (2006), Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, 24: 462-471.
169. Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068–1074.
170. Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., Tse, H. F., Fu, Q. L., ... Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*, 7(1), e2062.
171. Kolios G, Moodley Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*;85:3-10.
172. Liang, G., & Zhang, Y. (2012). Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell research*, 23(1), 49-69.
173. Sundberg M, Jansson L, Ketolainen J, Pihlajamäki H, Suuronen R, Skottman H, Inzunza J, Hovatta O, Narkilahti S. (2009). CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*;2,2,113-124.
174. Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience reports*, 35(2), e00191.
175. Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., & Ma, L. (2012). Embryonic stem cell markers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(6), 6196-236.
176. Grompe, Markus (2002) Adult versus Embryonic Stem Cells: It's Still a Tie, *Molecular Therapy*, Volume 6, Issue 3, 303 – 305
177. Lo B, Parham L. (2009). Ethical Issues in Stem Cell Research. *Endocrine Reviews*.;30(3):204-213.
178. Robert Passier, Christine Mummery (2003) Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair, *Cardiovascular Research*, Volume 58, Issue 2, 1 May, Pages 324–335,
179. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. (2012). Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources, In *Journal of Prosthodontic Research*;56,3,151-165.
180. Shen Y, Huang J, Liu L, Xu X, Han C, Zhang G, Jiang H, Li J, Lin Z, Xiong N and Wang T (2016) A Compendium of Preparation and Application of Stem Cells in Parkinson's Disease: Current Status and Future Prospects. *Front. Aging Neurosci.* 8:117.
181. Sampogna Gianluca, Guraya Salman, Forgione Antonello (2015),Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine,*Journal of Microscopy and Ultrastructure*,3,3,101-107.
182. Ali, H., Al-Mulla, F. (2012) Defining umbilical cord blood stem cells. *Stem Cell Discovery*, 2, 15-23.
183. Wiley LA, Burnight ER, Songstad AE (2015) Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases. *Prog Retin Eye Res.* 44C: 15–35
184. Baker CL., Pera MF. (2018). Capturing Totipotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*;22, 1,25-34.
185. Wobus AM, Boheler KR. Boheler. (2005). Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiological Reviews*; 85:2, 635-678.
186. Krampera, M., Franchini, M., Pizzolo, G., & Aprili, G. (2007). Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 5(3), 120-9.
187. Gupta V., Sengupta M., Prakash J., Tripathy B.C. (2017) *Stem Cell Biology and Its Clinical Application*. In: *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. Springer, Singapore.
188. Banerjee E. R. (2014). Looking for the elusive lung stem cell niche. *Translational respiratory medicine*, 2, 7.
189. Stratmann, H. G. (2015). *Stem Cells and Organ Transplantation: Resetting Our Biological Clocks*. *Using Medicine in Science Fiction*, 429–466.

190. Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., & Chandra, R. (2016). Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 134.
191. Takahashi K, Yamanaka S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*;126,4,663-676.
192. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. (2007). *Cell* ;131,5,861 - 872
193. de Lázaro I, Yilmazer A, Kostarelos K. (2014). Induced pluripotent stem (iPS) cells: A new source for cell-based therapeutics?, *Journal of Controlled Release*;185,37-44.
194. Rodríguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramírez, M. D., Meseguer, L., Meseguer-Henarejos, A. B., Marín, N., Martínez, S., ... Moraleda, J. M. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 17(6), e1062-7.
195. Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B., & Aflatoonian, R. (2012). Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (69), 4372.
196. Jang, J. H., Lee, H. W., Cho, K. M., Shin, H. W., Kang, M. K., Park, S. H., & Kim, E. (2016). In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods. *Restorative dentistry & endodontics*, 41(4), 283-295.
197. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. (2008). Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews*;4,1,21-26.
198. Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, Kucerová L. Human dental pulp stem cells—isolation and long term cultivation. (2007). *Acta Medica (Hradec Kralove)*: 50: 195–201.
199. Alraies, A., Alaidaroos, N. Y., Waddington, R. J., Moseley, R., & Sloan, A. J. (2017). Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. *BMC cell biology*, 18(1), 12.
200. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. (2006). Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation. *Tissue Engineering*;12:10, 2813-2823.
201. Sloan AJ, Waddington RJ. (2009), Dental pulp stem cells: what, where, how?. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 19: 61–70.
202. Perry, B. C., Zhou, D., Wu, X., Yang, F. C., Byers, M. A., Chu, T. M., Hockema, J. J., Woods, E. J., ... Goebel, W. S. (2008). Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 14(2), 149-56.
203. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. (2009). Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.67(3),501-506.
204. Spath, L., Rotilio, V., Alessandrini, M., Gambará, G., De Angelis, L., Mancini, M., Mitsiadis, T. A., Vivarelli, E., Naro, F., Filippini, A., ... Papaccio, G. (2009). Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(6B), 1635-44.
205. Ullah I, Subbarao RB, Kim EJ, Bharti D, Jang SJ, Park JS, Shivakumar SB, Lee SL, Kang D, Byun JH, Park BW, Rho GJ. (2016). In vitro comparative analysis of human dental stem cells from a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology. *Life Sciences*;154,39-51.
206. Vasandan, A. B., Shankar, S. R., Prasad, P., Sowmya Jahnavi, V., Bhonde, R. R., & Jyothi Prasanna, S. (2014). Functional differences in mesenchymal stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(2), 344-54.
207. Yildirim Selin, Zibandeh Noushin, Genc Deniz, Ozcan Elif Merve, GokerKamil, Akkoc Tunc. (2016). The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles, *Stem Cells International*; vol. 2016, Article ID 4682875, 15 pages.
208. Ponnaiyan D, Bhat KM, Bhat GS. D. (2012). Comparison of Immuno-Phenotypes of Stem Cells from Human Dental Pulp and Periodontal Ligament, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*;25,1,127-134.
209. Luisi SB, Filho MSA, Pranke P (2017) Isolation, immunophenotypic characterization and pluripotency of dental pulp stem cells. *Dent Oral Craniofac Res* 3.
210. Karbanová J, Soukup T, Suchánek J, Pytlík R, Corbeil D, Mokry J. (2011). Characterization of Dental Pulp Stem Cells from Impacted Third Molars Cultured in Low Serum-Containing Medium. *Cells Tissues Organs*;193:344-365.
211. Atari Maher, Gil-Recio Carlos, Fabregat Marc, et al. (2012). Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci*;125: 3343-3356.
212. Paduano, F., Marrelli, M., White, L. J., Shakesheff, K. M., & Tatullo, M. (2016). Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Hydrogel Scaffolds Derived from Decellularized Bone Extracellular Matrix and Collagen Type I. *PloS one*, 11(2).
213. Zhang Yunpeng, Xing Yixiao, Jia Linglu, Ji Yawen, Zhao Bin, Wen Yong, Xu Xin. (2018). An In Vitro Comparative Study of Multisource Derived Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells and Development*, 00:1-12.

214. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. (2011). Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP), *Archives of Oral Biology*;56,7,709-721.
215. Pisciotta, A., Carnevale, G., Meloni, S., Riccio, M., De Biasi, S., Gibellini, L., Ferrari, A., Bruzzesi, G., ... De Pol, A. (2015). Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC developmental biology*, 15, 14.
216. Laino, G., D'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., Pirozzi, G. and Papaccio, G. (2005). A New Population of Human Adult Dental Pulp Stem Cells: A Useful Source of Living Autologous Fibrous Bone Tissue (LAB). *J Bone Miner Res*, 20: 1394-1402.
217. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death And Differentiation*, 14:1162-1171.
218. Otabe, K., Muneta, T., Kawashima, N., Suda, H., Tsuji, K., & Sekiya, I. (2012). Comparison of Gingiva, Dental Pulp, and Periodontal Ligament Cells From the Standpoint of Mesenchymal Stem Cell Properties. *Cell medicine*, 4(1), 13-21.
219. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. (2009). Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp, In *Journal of Endodontics*;35, 11,1536-1542.
220. Telles, P. D., Machado, M. A., Sakai, V. T., & Nör, J. E. (2011). Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 19(3), 189-94.
221. Seo, B. M., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikui, T., Akiyama, K., Lee, J. S., ... Shi, S. (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral diseases*, 14(5), 428-34.
222. Ke Chen, Huacui Xiong, Nuo Xu, Yuanyuan Shen, Yibin Huang & Caiqi Liu (2014) Chondrogenic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro and in vivo, *Acta Odontologica Scandinavica*, 72:8, 664-672.
223. Wang, J., Wang, X., Sun, Z., Wang, X., Yang, H., Shi, S., & Wang, S. (2010). Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem cells and development*, 19(9), 1375-83.
224. Gazarian KG, Ramírez-García LR (2017) Human Deciduous Teeth Stem Cells (SHED) Display Neural Crest Signature Characters. *PLOS ONE* 12(1): e0170321.
225. Zhang, N., Chen, B., Wang, W., Chen, C., Kang, J., Deng, S.Q. ... Han, F. (2016). Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Molecular Medicine Reports*, 14, 95-102.
226. Wang, H., Zhong, Q., Yang, T., Qi, Y., Fu, M., Yang, X., Qiao, L., Ling, Q., Liu, S., ... Zhao, Y. (2018). Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. *Molecular medicine reports*, 17(5), 6551-6559.
227. Aghajani, F., Hooshmand, T., Khanmohammadi, M. et al. (2016). Comparative Immunophenotypic Characteristics, Proliferative Features, and Osteogenic Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Permanent and Deciduous Teeth with Bone Marrow. *Mol Biotechnol*;58: 415-427.
228. Aileen I. Tsai, Hsiang-Hsi Hong, Wey-Ran Lin, et al. (2017). "Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp," *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 2851906, 9 pages.
229. Trivanović D, Jauković A, Popović B, Krstić J, Mojsilović S, Okić-Djordjević I, Kukulj T, Obradović H, Santibanez JF, Bugarski D. (2015). Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression, *Life Sciences*;141:61-73.
230. Vishwanath, V. R., Nadig, R. R., Nadig, R., Prasanna, J. S., Karthik, J., & Pai, V. S. (2013). Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study. *Journal of conservative dentistry : JCD*, 16(5), 423-8.
231. Akpınar, G., Kasap, M., Aksoy, A., Duruksu, G., Gacar, G., & Karaoz, E. (2014). Phenotypic and proteomic characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells from a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem cells international*, 2014, 457059.
232. Choi, S., Cho, T. J., Kwon, S. K., Lee, G., & Cho, J. (2013). Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor-β3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar. *International journal of oral science*, 5(1), 7-13.
233. Gay, I., Chen, S. and MacDougall, M. (2007). Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 10: 149-160.
234. Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. (2010). Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4, *Differentiation*;79, 2,74-83.
235. Nagatomo, K., Komaki, M., Sekiya, I., Sakaguchi, Y., Noguchi, K., Oda, S., Muneta, T. and Ishikawa, I. (2006). Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, 41: 303-310.

236. Eleuterio, E., Trubiani, O., Sulpizio, M., Di Giuseppe, F., Pierdomenico, L., Marchisio, M., Giancola, R., Giannaria, G., Miscia, S., Caputi, S., Di Ilio, C., Angelucci, S. (2013). Proteome of human stem cells from periodontal ligament and dental pulp. *PloS one*, 8(8), e71101.
237. Ansari, S., Diniz, I.M., Chen, C. et al. (2017). Alginate/hyaluronic acid hydrogel delivery system characteristics regulate the differentiation of periodontal ligament stem cells toward chondrogenic lineage. *J Mater Sci: Mater Med*;28(10):162.
238. Vasandan, A. B., Shankar, S. R., Prasad, P., Sowmya Jahnavi, V., Bhone, R. R., & Jyothi Prasanna, S. (2014). Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(2), 344-54.
239. Guo, J., Weng, J., Rong, Q., Zhang, X., Zhu, S., Huang, D., Li, X., ... Chen, S. (2015). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human maxillary sinus membrane. *Scientific reports*, 5, 11660.
240. Menicanin, D., Mrozik, K. M., Wada, N., Marino, V., Shi, S., Bartold, P. M., & Gronthos, S. (2013). Periodontal-ligament-derived stem cells exhibit the capacity for long-term survival, self-renewal, and regeneration of multiple tissue types in vivo. *Stem cells and development*, 23(9), 1001-11.
241. Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y. (2014). Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation, *Biomaterials*;35(24):6332-6343.
242. Szepesi, Á., Matula, Z., Szigeti, A., Várady, G., Szabó, G., Uher, F., Sarkadi, B., ... Németh, K. (2014). ABCG2 is a selectable marker for enhanced multilineage differentiation potential in periodontal ligament stem cells. *Stem cells and development*, 24(2), 244-52.
243. Khoshhal, M., Amiri, I., & Gholami, L. (2017). Comparison of in vitro properties of periodontal ligament stem cells derived from permanent and deciduous teeth. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 11(3), 140-148
244. Song JS, Kim SO, Kim SH, Choi HJ, Son HK, Jung HS, Kim CS, Lee JH. (2012). In Vitro and In Vivo Characteristics of Stem Cells Derived from the Periodontal Ligament of Human Deciduous and Permanent Teeth, *Tissue Engineering Part A*;18:19-20, 2040-2051.
245. Silvério, K. G., Rodrigues, T. L., Coletta, R. D., Benevides, L., Da Silva, J. S., Casati, M. Z., Sallum, E. A. and Nociti, F. H. (2010), Mesenchymal Stem Cell Properties of Periodontal Ligament Cells From Deciduous and Permanent Teeth. *Journal of Periodontology*, 81: 1207-1215.
246. Ji, K., Liu, Y., Lu, W., Yang, F., Yu, J., Wang, X., Ma, Q., Yang, Z., Wen, L. and Xuan, K. (2013), Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. *Journal of Periodontal Research*, 48: 105-116.
247. Yao S, Pan F, Prpic V et al (2008) Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res* 87 (8): 767-771.
248. Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T.E. et al. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry, *Clin Oral Invest*;12: 113-118.
249. Mori, G., Ballini, A., Carbone, C., Oranger, A., Brunetti, G., Di Benedetto, A., Rapone, B., Cantore, S., Di Comite, M., Colucci, S., Grano, M., ... Grassi, F. R. (2012). Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *International journal of medical sciences*, 9(6), 480-7.
250. Kémoun, P., Laurencin-Dalieux, S., Rue, J. et al. (2007). Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro *Cell Tissue Res*; 329(2): 283-294.
251. Morsczeck, C., Völlner, F., Saugspier, M. et al. (2010). Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro *Clin Oral Invest*;14(4): 433-440.
252. Völlner F, Ernst W, Driemel O, Morsczeck C.(2009). A two-step strategy for neuronal differentiation in vitro of human dental follicle cells, *Differentiation*;77(5): 433-441.
253. Yokoi, T., Saito, M., Kiyono, T. et al. (2007). Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo *Cell Tissue Res*;327(2):301-311.
254. Sowmya S, Chennazhi KP, Arzate H, Jayachandran P, Nair SV, Jayakumar R. (2015). Periodontal Specific Differentiation of Dental Follicle Stem Cells into Osteoblast, Fibroblast, and Cementoblast. *Tissue Engineering Part C: Methods*;21:10, 1044-1058.
255. Brizuela C, Claudia, Galleguillos G, Sussy, Carrión A, Flavio, Cabrera P, Carolina, Luz C, Patricia, & Inostroza S, Carolina. (2013). Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Foliculo Dentario Humano. *International Journal of Morphology*, 31(2), 739-746.
256. Karamzadeh, R., Baghaban Eslaminejad, M., & Sharifi-Zarchi, A. (2017). Comparative In Vitro Evaluation of Human Dental Pulp and Follicle Stem Cell Commitment. *Cell Journal (Yakhteh)*, 18(4), 609–618.
257. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics*, 34(2), 166-71.
258. Abe, S., Yamaguchi, S., & Amagasa, T. (2007). Multilineage Cells from Apical Pulp of Human Tooth with Immature Apex. *Oral Science International*, 4(1), 45–58.

259. Wang, L. , Yan, M. , Wang, Y. , Lei, G. , Yu, Y. , Zhao, C. , Tang, Z. , Zhang, G. , Tang, C. , Yu, J. and Liao, H. (2013), Proliferation and osteo/odontoblastic differentiation of stem cells from dental apical papilla in mineralization-inducing medium containing additional KH₂PO₄. *Cell Prolif.*
260. Ding, G. , Wang, W. , Liu, Y. , An, Y. , Zhang, C. , Shi, S. and Wang, S. (2010), Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J. Cell. Physiol.*, 223: 415-422.
261. Zhang, W., Zhang, X., Ling, J., Wei, X., & Jian, Y. (2016). Osteo-/odontogenic differentiation of BMP2 and VEGF gene-co-transfected human stem cells from apical papilla. *Molecular Medicine Reports*, 13, 3747-3754.
262. Bakopoulou, A., Kritis, A., Andreadis, D., Papachristou, E., Leyhausen, G., Koidis, P., Geurtsen, W., ... Tsiftoglou, A. (2015). Angiogenic Potential and Secretome of Human Apical Papilla Mesenchymal Stem Cells in Various Stress Microenvironments. *Stem cells and development*, 24(21), 2496-512.
263. Simonovic, J., Toljic, B., Nikolic, N., Vujan, J., Panajotovic, R., Gajic, R., ... Milasin, J. (2018). Differentiation of stem cells from apical papilla into neural lineage using graphene dispersion and single walled carbon nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
264. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. (2013). Comparative characterization of STRO-1neg/CD146pos and STRO-1pos/CD146pos apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Archives of Oral Biology*;58(10),1556-1568.
265. Chrepa, V., Pitcher, B., Henry, M. A., & Diogenes, A. (2017). Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*, 43(4), 561–567.
266. Huang, G. T., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., & Shi, S. (2008). The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of endodontics*, 34(6), 645-51.
267. Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S., & Le, A. D. (2009). Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(12), 7787-98.
268. Gao, Y., Zhao, G., Li, D., Chen, X., Pang, J., & Ke, J. (2014). Isolation and multiple differentiation potential assessment of human gingival mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*, 15(11), 20982-96.
269. Mitrano TI, Grob MS, Carrión F et al (2010) Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *Journal of Periodontology* 81(6):917–925.
270. Benjamin P.J. Fournier, François C. Ferre, Ludovic Couty, et al. (2010). Multipotent Progenitor Cells in Gingival Connective Tissue. *Tissue Engineering Part A*;16:9, 2891-2899.
271. Yang H, Gao LN, An Y, Hu CH, Jin F, Zhou J, Jin Y, Chen FM.Hao. (2013). Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. *Biomaterials*, Volume 34, Issue 29, 2013, Pages 7033-7047.
272. Du Lingqian, Yang Pishan, Ge Shaohua. (2016). Isolation and characterization of human gingiva-derived mesenchymal stem cells using limiting dilution method. *Journal of Dental Sciences*;11(3):304-314.
273. Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249–1260.
274. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–228.
275. Farré-Guasch E., Martí-Page C., Hernandez-Alfaro F., Klein-Nulend J., Casals N. (2010). Buccal Fat Pad, an Oral Access Source of Human Adipose Stem Cells with Potential for Osteochondral Tissue Engineering: An In Vitro Study. *Tissue Engineering Part C: Methods*;16:5, 1083-1094.
276. Broccaioli, E., Niada, S., Rasperini, G., Ferreira, L. M., Arrigoni, E., Yenagi, V., & Brini, A. T. (2013). Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad: In Vitro Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. *BioResearch Open Access*, 2(2), 107–117.
277. Kishimoto, N., Momota, Y., Hashimoto, Y., Tatsumi, S., Ando, K., Omasa, T., & Kotani, J. (2013). The osteoblastic differentiation ability of human dedifferentiated fat cells is higher than that of adipose stem cells from the buccal fat pad. *Clinical oral investigations*, 18(8), 1893-901.
278. Ardeshtyrlajimi, A. , Mossahebi-Mohammadi, M. , Vakilian, S. , Langroudi, L. , Seyedjafari, E. , Atashi, A. and Soleimani, M. (2015), Comparison of osteogenic differentiation potential of human adult stem cells loaded on bioceramic-coated electrospun poly (L-lactide) nanofibres. *Cell Prolif.*, 48: 47-58.
279. Shiraiishi, T., Sumita, Y., Wakamastu, Y., Nagai, K., & Asahina, I. (2012). Formation of Engineered Bone with Adipose Stromal Cells from Buccal Fat Pad. *Journal of Dental Research*, 91(6), 592–597.
280. Nagasaki, R., Mukudai, Y., Yoshizawa, Y., Nagasaki, M., Shiogama, S., Suzuki, M., Kondo, S., Shintani, S., Shirota, T. (2015). A Combination of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Nanohydroxyapatite Concordantly Enhances Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells From Buccal Fat Pad. *Cell medicine*, 7(3), 123-31.

281. Khojasteh A, Sadeghi N. (2016). Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillofacial atrophy: a preliminary human study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*;45(7):864-871.
282. Ghaderi, H., Razmkhah, M., Kiany, F., Chenari, N., Haghshenas, M. R., & Ghaderi, A. (2018). Comparison of Osteogenic and Chondrogenic Differentiation Ability of Buccal Fat Pad Derived Mesenchymal Stem Cells and Gingival Derived Cells. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)*, 19(2), 124-131.
283. Bianco, P. , Riminucci, M. , Gronthos, S. and Robey, P. G. (2001), Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *STEM CELLS*, 19: 180-192.
284. Matsubara, T. , Suardita, K. , Ishii, M. , Sugiyama, M. , Igarashi, A. , Oda, R. , Nishimura, M. , Saito, M. , Nakagawa, K. , Yamanaka, K. , Miyazaki, K. , Shimizu, M. , Bhawal, U. K., Tsuji, K. , Nakamura, K. and Kato, Y. (2005), Alveolar Bone Marrow as a Cell Source for Regenerative Medicine: Differences Between Alveolar and Iliac Bone Marrow Stromal Cells. *J Bone Miner Res*, 20: 399-409.
285. Luo S, Pei F, Zhang W, et al. (2017). Bone marrow mesenchymal stem cells combine with treated dentin matrix to build biological root. *Sci Rep*;7:1–12.
286. Chen, X., Liu, Y., Ding, W., Shi, J., Li, S., Liu, Y., Wu, M., and Wang, H. (2018) Mechanical stretch-induced osteogenic differentiation of human jaw bone marrow mesenchymal stem cells (hJBMMSCs) via inhibition of the NF-κB pathway. *Cell Death Dis.* 9, 207.
287. Lee BK, Choi SJ, Mack D, Oh SH. (2011) Isolation of mesenchymal stem cells from the mandibular marrow aspirates, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*;112(6):e86-e93.
288. Pettersson, L. F., Kingham, P. J., Wiberg, M., & Kelk, P. (2017). In Vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells from Jawbone Compared with Dental Tissue. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 14(6), 763-774.
289. Schwarz S., Rotter N. (2012) Human Salivary Gland Stem Cells: Isolation, Propagation, and Characterization. In: Singh S. (eds) *Somatic Stem Cells. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 879. Humana Press, Totowa, NJ.
290. Andreadis, D., Bakopoulou, A., Leyhausen, G. et al. (2014), Minor salivary glands of the lips: a novel, easily accessible source of potential stem/progenitor cells *Clin Oral Invest* 18: 847.
291. Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Böhrnsen F, Kramer J, Rohwedel J, Huss R, Brandau S, Wollenberg B, Lang S. (2008) Isolation and Characterization of Adult Stem Cells from Human Salivary Glands. *Stem Cells and Development*;17:3, 509-518.
292. Sato A, Okumura K, Matsumoto S, Hattori K, Hattori S, Shinohara M, Endo F. (2007) Isolation, Tissue Localization, and Cellular Characterization of Progenitors Derived from Adult Human Salivary Glands, *Cloning and Stem Cells*;9:2, 191-205.
293. Jeong, J., Baek, H., Kim, Y. J., Choi, Y., Lee, H., Lee, E., Kim, E. S., Hah, J. H., Kwon, T. K., Choi, I. J., ... Kwon, H. (2013). Human salivary gland stem cells ameliorate hyposalivation of radiation-damaged rat salivary glands. *Experimental & molecular medicine*, 45(11), e58.
294. Shin, H. S., Lee, S., Hong, H. J., Lim, Y. C., Koh, W. G., & Lim, J. Y. (2018). Stem cell properties of human clonal salivary gland stem cells are enhanced by three-dimensional priming culture in nanofibrous microwells. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 74.
295. Williams, D. F. (1987). *Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3–5, 1986, Vol. 4, Elsevier, New York.*
296. Simon CG, Yaszemski MJ, Ratcliffe A, Tomlins P, Luginbuehl R, Tesk JA. (2015) ASTM International Workshop on Standards and Measurements for Tissue Engineering Scaffolds. *J Biomed Mater Res Part B* 2015:103B:949–959.
297. Chen, F. M., & Liu, X. (2015). Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in polymer science*, 53, 86-168
298. Wu, S., Liu, X., Yeung, K. W. K., Liu, C., & Yang, X. (2014). Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 80, 1–36.
299. Rana D, Arulkumar S, Vishwakarma A and Ramalingam M. (2015) Considerations on designing scaffold for tissue engineering *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences (Boston, MA: Academic)* pp 133–48 ch 10.
300. Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., & Glogauer, M. (2015). Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 8(9), 5744-5794.
301. Chan BP, Leong KW. (2008) Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*;17(Suppl 4):467-479.
302. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., and Lemons, J.E. (2003) *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego: Academic Press;67-79.
303. Zambon, J. P., de Sá Barretto, L. S., Nakamura, A. N., Duailibi, S., Leite, K., Magalhaes, R. S., Orlando, G., Ross, C. L., Peloso, A., ... Almeida, F. G. (2014). Histological changes induced by Polyglycolic-Acid (PGA) scaffolds seeded with autologous adipose or muscle-derived stem cells when implanted on rabbit bladder. *Organogenesis*, 10(2), 278-88.

304. Li, Y., Fan, P., Ding, X. M., Tian, X. H., Feng, X. S., Yan, H., Pan, X. M., Tian, P. X., Zheng, J., Ding, C. G., ... Xue, W. J. (2017). Polyglycolic Acid Fibrous Scaffold Improving Endothelial Cell Coating and Vascularization of Islet. *Chinese medical journal*, 130(7), 832-839.
305. Zhang S, Ma B, Liu F, Duan J, Wang S, Qiu J, Li D, Sang Y, Liu C, Liu D, Liu H. (2018). Polylactic Acid Nanopillar Array-Driven Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Determined by Pillar Diameter. *Nano Lett*;11;18(4):2243-2253.
306. Haddad, T., Noel, S., Liberelle, B., El Ayoubi, R., Ajji, A., & De Crescenzo, G. (2016). Fabrication and surface modification of poly lactic acid (PLA) scaffolds with epidermal growth factor for neural tissue engineering. *Biomatter*, 6(1), e1231276.
307. Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3640-59.
308. Pan Z, Ding J. (2012) Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus*;2(3):366-377.
309. Izquierdo, R., Garcia-Giralt, N., Rodriguez, M., Cáceres, E., García, S., Gómez Ribelles, J., Monleón, M., Monllau, J. C. and Suay, J. (2008), Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, 85A: 25-35.
310. Barbarisi M, Marino G, Armenia E, Vincenzo Q, Rosso F, Porcelli M, Barbarisi A. (2015) Use of polycaprolactone (PCL) as scaffolds for the regeneration of nerve tissue. *J Biomed Mater Res Part A* 2015;103A:1755–1760.
311. Zhu J. (2010). Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, 31(17), 4639-56.
312. Shi R. (2013). Polyethylene glycol repairs membrane damage and enhances functional recovery: a tissue engineering approach to spinal cord injury. *Neuroscience bulletin*, 29(4), 460-6.
313. Tang, H., Wu, B., Qin, X., Zhang, L., Kretlow, J., & Xu, Z. (2013). Tissue engineering rib with the incorporation of biodegradable polymer cage and BMSCs/decalcified bone: an experimental study in a canine model. *Journal of cardiothoracic surgery*, 8, 133.
314. Xiaolan Zhang, Chuanlong Jia, Xiuying Qiao, Tianyi Liu, Kang Sun. (2016) Porous poly (glycerol sebacate) (PGS) elastomer scaffolds for skin tissue engineering, *Polymer Testing*;54: 118-125.
315. Hagandora, C. K., Gao, J., Wang, Y., & Almarza, A. J. (2013). Poly (Glycerol Sebacate): A Novel Scaffold Material for Temporomandibular Joint Disc Engineering. *Tissue Engineering. Part A*, 19(5-6), 729–737.
316. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, 2011, 1–19.
317. Elsie S. Place, Julian H. George, Charlotte K. Williams and Molly M. Stevens. (2009) Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering, *Chem. Soc. Rev*; 38, 1139-1151.
318. Glowacki, J. and Mizuno, S. (2008), Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*, 89: 338-344.
319. Nocera, A.D., Comín, R., Salvatierra, N.A. et al. (2018) Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomed Microdevices*;20(2):26.
320. Dong, C.; Lv, Y. (2016). Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*;8(2): 42.
321. T. Mazaki, et al. (2014). A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering. *Sci. Rep.*, 4 (2014), p. 4457
322. Perng, C., Kao, C., Yang, Y., Lin, H., Lin, W., Chu, Y., Wang, H., Ma, H., Ku, H. and Chiou, S. (2008), Culturing adult human bone marrow stem cells on gelatin scaffold with pNIPAAm as transplanted grafts for skin regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.*, 84A: 622-630.
323. W.F. Daamen, J.H. Veerkamp, J.C.M. van Hest, T.H. van Kuppevelt. (2007) Elastin as a biomaterial for tissue engineering, *Biomaterials*;28(30):4378-4398.
324. Saitow, C., Wise, S., Weiss, A., et al. (2013). Elastin biology and tissue engineering with adult cells. *BioMolecular Concepts*, 4(2), pp. 173-185.
325. Linnes, M. P., Ratner, B. D., & Giachelli, C. M. (2007). A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, 28(35), 5298-306.
326. Rajangam, T., & An, S. S. (2013). Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. *International journal of nanomedicine*, 8, 3641-62.
327. Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1262–1279.
328. Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Chandranayaka, S., Sherman, L. S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2016). Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 917–928.

329. Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., & Quiñones-Olvera, L. F. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, 2015, 1–15.
330. Levengood, S. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of materials chemistry. B*, 2(21), 3161-3184.
331. Mata, M., Milian, L., Oliver, M., Zurriaga, J., Sancho-Tello, M., Llano, J. J. M. de, & Carda, C. (2017). In Vivo Articular Cartilage Regeneration Using Human Dental Pulp Stem Cells Cultured in an Alginate Scaffold: A Preliminary Study. *Stem Cells International*, 2017, 1–9.
332. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.
333. Zarrintaj, P., Manouchehri, S., Ahmadi, Z., Saeb, M. R., Urbanska, A. M., Kaplan, D. L., & Mozafari, M. (2018). Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 187, 66–84.
334. Varoni, E., Tschon, M., Palazzo, B., Nitti, P., Martini, L., & Rimondini, L. (2012). Agarose Gel as Biomaterial or Scaffold for Implantation Surgery: Characterization, Histological and Histomorphometric Study on Soft Tissue Response. *Connective Tissue Research*, 53(6), 548–554.
335. Sun, G., & Mao, J. J. (2012). Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair. *Nanomedicine (London, England)*, 7(11), 1771-84.
336. Nikpour, P., Salimi-Kenari, H., Fahimipour, F., Rabiee, S. M., Imani, M., Dashtimoghadam, E., & Tayebi, L. (2018). Dextran hydrogels incorporated with bioactive glass-ceramic: Nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 190, 281–294.
337. Gomes, M., Azevedo, H., Malafaya, P., Silva, S., Oliveira, J., Silva, G., ... Reis, R. (2013). Natural Polymers in Tissue Engineering Applications. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, 385–425.
338. Batista, P. S., Rodrigues, M. A., Silva, D. M., Morgado, P. I., Henriques, J. P., Almeida, M. O., ... Correia, I. J. (2012). Characterization of the mechanical and biological properties of a new alumina scaffold. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 11(1), 18–25.
339. Sarhadi, F., Shafiee Afarani, M., Mohebbi-Kalhari, D., & Shayesteh, M. (2016). Fabrication of alumina porous scaffolds with aligned oriented pores for bone tissue engineering applications. *Applied Physics A*, 122(4).
340. Gao, P., Zhang, H., Liu, Y., Fan, B., Li, X., Xiao, X., Lan, P., Li, M., Geng, L., Liu, D., Yuan, Y., Lian, Q., Lu, J., Guo, Z., ... Wang, Z. (2016). Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo. *Scientific reports*, 6, 23367.
341. Sohier, J. , Daculsi, G. , Sourice, S. , de Groot, K. and Layrolle, P. (2010), Porous beta tricalcium phosphate scaffolds used as a BMP-2 delivery system for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, 92A: 1105-1114.
342. Tripathi, G., & Basu, B. (2012). A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International*, 38(1), 341–349.
343. Yoshikawa, H., & Myoui, A. (2005). Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of Artificial Organs*, 8(3), 131–136.
344. Michel, J., Penna, M., Kochen, J., & Cheung, H. (2015). Recent Advances in Hydroxyapatite Scaffolds Containing Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2015, 1–13.
345. Bouler, J. M., Pilet, P., Gauthier, O., & Verron, E. (2017). Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomaterialia*, 53, 1–12.
346. Lobo, S. E., & Arinzech, T. L. (2010). Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(2), 815–826.
347. Rahaman, M. N., Day, D. E., Sonny Bal, B., Fu, Q., Jung, S. B., Bonewald, L. F., & Tomsia, A. P. (2011). Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2355–2373.
348. Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M. N., & Tomsia, A. P. (2011). Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 31(7), 1245-1256.
349. El-Rashidy, A. A., Roether, J. A., Harhaus, L., Kneser, U., & Boccaccini, A. R. (2017). Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models. *Acta Biomaterialia*, 62, 1–28.
350. Baino, F., Novajra, G., & Vitale-Brovarone, C. (2015). Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 202.
351. Prasad, K., Bazaka, O., Chua, M., Rochford, M., Fedrick, L., Spoor, J., Symes, R., Tieppo, M., Collins, C., Cao, A., Markwell, D., Ostrikov, K. K., ... Bazaka, K. (2017). *Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities*. *Materials (Basel, Switzerland)*, 10(8), 884.
352. Chen, Y., Frith, J. E., Dehghan-Manshadi, A., Attar, H., Kent, D., Soro, N. D. M., ... Dargusch, M. S. (2017). Mechanical properties and biocompatibility of porous titanium scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 75, 169–174.
353. Yin, B., Xue, B., Wu, Z., Ma, J., & Wang, K. (2018). A novel hybrid 3D-printed titanium scaffold for osteogenesis in a rabbit calvarial defect model. *American journal of translational research*, 10(2), 474-482.

354. Alavi, S. H., & Kheradvar, A. (2012). Metal Mesh Scaffold for Tissue Engineering of Membranes. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18(4), 293–301.
355. Blanco, JF, Sánchez-Guijo, FM, Carrancio, S., Muntion, S., García-Briñon, J., y del Cañizo, MC (2011). Titanio y tantalio como andamios mesenquimales de células madre para la fusión espinal: un estudio comparativo in vitro. *Revista europea de la columna vertebral: publicación oficial de la European Spine Society, la European Spinal Deformity Society y la Sección Europea de la Cervical Spine Research Society*, 20 Suppl 3 (Suppl 3), 353-60.
356. Witte, F., Ulrich, H., Rudert, M., & Willbold, E. (2007). Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: Appropriate inflammatory response. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81A(3), 748–756.
357. Cheng, M., Wahafu, T., Jiang, G., Liu, W., Qiao, Y., Peng, X., ... Liu, X. (2016). A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration. *Scientific Reports*, 6(1).
358. De Witte, T.-M., Fratila-Apachitei, L. E., Zadpoor, A. A., & Peppas, N. A. (2018). Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regenerative Biomaterials*, 5(4), 197–211.
359. Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., & Moradi, A. (2018). Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *The archives of bone and joint surgery*, 6(2), 90-99.
360. Prasad, K., Bazaka, O., Chua, M., Rochford, M., Fedrick, L., Spoor, J., Symes, R., Tieppo, M., Collins, C., Cao, A., Markwell, D., Ostrikov, K. K., ... Bazaka, K. (2017). *Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities*. *Materials (Basel, Switzerland)*, 10(8), 884.
361. Lee, E. J., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2013). Biomaterials for tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*, 42(2), 323-37.
362. Wong, H. M., Chu, P. K., Leung, F. K. L., Cheung, K. M. C., Luk, K. D. K., & Yeung, K. W. K. (2014). Engineered polycaprolactone–magnesium hybrid biodegradable porous scaffold for bone tissue engineering. *Progress in Natural Science: Materials International*, 24(5), 561–567.
363. Huang, S.-H., Hsu, T.-T., Huang, T.-H., Lin, C.-Y., & Shie, M.-Y. (2017). Fabrication and characterization of polycaprolactone and tricalcium phosphate composites for tissue engineering applications. *Journal of Dental Sciences*, 12(1), 33–43.
364. Liao, J., Qu, Y., Chu, B., Zhang, X., & Qian, Z. (2015). Biodegradable CSMA/PECA/Graphene Porous Hybrid Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. *Scientific Reports*, 5(1).
365. Chen, G., Sato, T., Ushida, T., Ochiai, N., & Tateishi, T. (2004). Tissue Engineering of Cartilage Using a Hybrid Scaffold of Synthetic Polymer and Collagen. *Tissue Engineering*, 10(3-4), 323–330.
366. Heydarkhan-Hagvall, S., Schenke-Layland, K., Dhanasopon, A. P., Rofail, F., Smith, H., Wu, B. M., Shemin, R., Beygui, R. E., ... MacLellan, W. R. (2008). Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials*, 29(19), 2907-14.
367. Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D., & Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26(18), 3919–3928.
368. Kim, S. G., Zhou, J., Solomon, C., Zheng, Y., Suzuki, T., Chen, M., Song, S., Jiang, N., Cho, S., ... Mao, J. J. (2012). Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dental clinics of North America*, 56(3), 563-75.
369. Watabe, T., & Miyazono, K. (2008). Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Research*, 19(1), 103–115.
370. Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q., Zhen, G., Crane, J. L., Zhou, X., & Cao, X. (2018). Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Research*, 6(1).
371. Burgess, A. W. (2015). Growth Factors and Cytokines. In *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, R. A. Meyers (Ed.).
372. Poniatowski, Ł. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., & Szukiewicz, D. (2015). Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators of inflammation*, 2015, 137823.
373. Xia, P., Wang, X., Qu, Y., Lin, Q., Cheng, K., Gao, M., Ren, S., Zhang, T., ... Li, X. (2017). TGF- β 1-induced chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells is promoted by low-intensity pulsed ultrasound through the integrin-mTOR signaling pathway. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 281.
374. Dahlin, R. L., Ni, M., Meretoja, V. V., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2013). TGF- β 3-induced chondrogenesis in co-cultures of chondrocytes and mesenchymal stem cells on biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, 35(1), 123-32.
375. Kurth, T., Hedbom, E., Shintani, N., Sugimoto, M., Chen, F. H., Haspl, M., ... Hunziker, E. B. (2007). Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(10), 1178–1189.
376. Mohan, N., Nair, P. D., & Tabata, Y. (2008). A 3D biodegradable protein based matrix for cartilage tissue engineering and stem cell differentiation to cartilage. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(S1), 49–60.

377. Thorpe, S. D., Buckley, C. T., Vinardell, T., O'Brien, F. J., Campbell, V. A., & Kelly, D. J. (2010). The Response of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Dynamic Compression Following TGF- β 3 Induced Chondrogenic Differentiation. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(9), 2896–2909.
378. Park, J. S., Shim, M.-S., Shim, S. H., Yang, H. N., Jeon, S. Y., Woo, D. G., ... Park, K.-H. (2011). Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- β 3. *Biomaterials*, 32(32), 8139–8149.
379. Lires-Deán, M., Caramés, B., Cillero-Pastor, B., Galdo, F., López-Armada, M. J., & Blanco, F. J. (2008). Anti-apoptotic effect of transforming growth factor- β 1 on human articular chondrocytes: role of protein phosphatase 2A. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(11), 1370–1378.
380. Li, Y., El Mozen, L. A., Cai, H., Fang, W., Meng, Q., Li, J., Deng, M., ... Long, X. (2015). Transforming growth factor beta 3 involved in the pathogenesis of synovial chondromatosis of temporomandibular joint. *Scientific reports*, 5, 8843.
381. Di Chen, Ming Zhao & Gregory R. Mundy (2004) Bone Morphogenetic Proteins, Growth Factors, 22:4, 233-241.
382. Yang, J., Shi, P., Tu, M., Wang, Y., Liu, M., Fan, F., & Du, M. (2014). Bone morphogenetic proteins: Relationship between molecular structure and their osteogenic activity. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 127–135.
383. Wozney, J. M. (1989). Bone Morphogenetic Proteins. *Progress in Growth Factor Research*, 1(4), 267–280.
384. Xiao, Y.-T., Xiang, L.-X., & Shao, J.-Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), 550–553.
385. Carreira, A. C. O., Zambuzzi, W. F., Rossi, M. C., Filho, R. A., Sogayar, M. C., & Granjeiro, J. M. (2015). Bone Morphogenetic Proteins. *Vitamins & Hormones*, 293–322.
386. Jiang Y.Z., Qi Y.Y., Zou X.H., Wang LL., Ouyang HW. (2009) Comparison the Effects of BMP-4 and BMP-7 on Articular Cartilage Repair with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. In: Lim C.T., Goh J.C.H. (eds) 13th International Conference on Biomedical Engineering. IFMBE Proceedings, vol 23. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1285-1288.
387. Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T. et al. (2005) Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma Cell Tissue;320: 269.
388. Miljkovic, N. D., Cooper, G. M., & Marra, K. G. (2008). Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(10), 1121–1130.
389. Schmitt, B., Ringe, J., Häupl, T., Notter, M., Manz, R., Burmester, G.-R., ... Kaps, C. (2003). BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation*, 71(9-10), 567–577.
390. Yun, Y. R., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J. H., Shin, U. S., ... Kim, H. W. (2010). Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *Journal of tissue engineering*, 2010, 218142.
391. Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2010). Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *Journal of biochemistry*, 149(2), 121-30.
392. Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome biology*, 2(3), REVIEWS3005.
393. Coutu, D. L., & Galipeau, J. (2011). Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging*, 3(10), 920-33.
394. Ellman, M. B., Yan, D., Ahmadiania, K., Chen, D., An, H. S., & Im, H. J. (2013). Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis. *Journal of cellular biochemistry*, 114(4), 735-42.
395. Ellman, M. B., An, H. S., Muddasani, P., & Im, H. J. (2008). Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis. *Gene*, 420(1), 82-9.
396. Moore, E. E., Bendele, A. M., Thompson, D. L., Littau, A., Waggie, K. S., Reardon, B., & Ellsworth, J. L. (2005). Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(7), 623–631.
397. Correa, D., Somoza, R. A., Lin, P., Greenberg, S., Rom, E., Duesler, L., Welter, J. F., Yayon, A., ... Caplan, A. I. (2014). Sequential exposure to fibroblast growth factors (FGF) 2, 9 and 18 enhances hMSC chondrogenic differentiation. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(3), 443-53.
398. Cheng, T., Yang, C., Weber, N., Kim, H. T., & Kuo, A. C. (2012). Fibroblast growth factor 2 enhances the kinetics of mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426(4), 544–550.
399. Bianchi, G., Banfi, A., Mastrogiacomo, M., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R., & Quarto, R. (2003). Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Experimental Cell Research*, 287(1), 98–105.
400. Solchaga, L. A., Penick, K., Goldberg, V. M., Caplan, A. I., & Welter, J. F. (2009). Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part A*, 16(3), 1009-19.

401. Zhang, Z., Wang, Y., Li, M., Li, J., & Wu, J. (2014). Fibroblast growth factor 18 increases the trophic effects of bone marrow mesenchymal stem cells on chondrocytes isolated from late stage osteoarthritic patients. *Stem cells international*, 2014, 125683.
402. Davidson, D., Blanc, A., Filion, D., Wang, H., Plut, P., Pfeffer, G., ... Henderson, J. E. (2005). Fibroblast Growth Factor (FGF) 18 Signals through FGF Receptor 3 to Promote Chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20509–20515.
403. Rechler M.M., Nissley S.P. (1991) *Insulin-Like Growth Factors*. In: Sporn M.B., Roberts A.B. (eds) *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. Springer Study Edition. Springer, New York, NY.
404. Depprich R. (2009) *Biomolecule Use in Tissue Engineering*. In: Meyer U., Handschel J., Wiesmann H., Meyer T. (eds) *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 121-135.
405. Schmid, C. (1995), *Insulin-like growth factors*. *Cell Biology International*, 19: 445-457.
406. Youssef, A., Aboalola, D., & Han, V. K. M. (2017). The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells International*, 2017, 1–12.
407. Le Roith, D. (1997). *Insulin-Like Growth Factors*. *New England Journal of Medicine*, 336(9), 633–640.
408. Longobardi, L., O'Rear, L., Aakula, S., Johnstone, B., Shimer, K., Chytil, A., Horton, W. A., Moses, H. L. and Spagnoli, A. (2006) Effect of IGF-I in the Chondrogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Presence or Absence of TGF- β Signaling. *J Bone Miner Res*, 21: 626-636.
409. Indrawattana, N., Chen, G., Tadokoro, M., Shann, L. H., Ohgushi, H., Tateishi, T., ... Bunyaratvej, A. (2004). Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(3), 914–919.
410. Fredriksson, L., Li, H., & Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15(4), 197–204.
411. Raines E.W., Bowen-Pope D.F., Ross R. (1990) *Platelet-Derived Growth Factor*. In: Sporn M.B., Roberts A.B. (eds) *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 95 / 1. Springer, Berlin, Heidelberg.
412. Schmidt, M. B., Chen, E. H., & Lynch, S. E. (2006). A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(5), 403–412.
413. Qiu, P., Song, W., Niu, Z., Bai, Y., Li, W., Pan, S., Peng, S. and Hua, J. (2013), Platelet-derived growth factor promotes the proliferation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biochem Funct*, 31: 159-165.
414. Zhao, G., Zhang, L., Liu, Y., Fang, J., Li, H., Gao, K., & Chen, Y. (2016). Effects of platelet-derived growth factor on chondrocyte proliferation, migration and apoptosis via regulation of GIT1 expression. *Molecular Medicine Reports*, 14, 897-903.
415. Hoeben, A. (2004). *Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis*. *Pharmacological Reviews*, 56(4), 549–580.
416. Shibuya M. (2011). *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies*. *Genes & cancer*, 2(12), 1097-105.
417. Holmes, D. I., & Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome biology*, 6(2), 209.
418. Rouwkema, J., & Khademhosseini, A. (2016). *Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks*. *Trends in Biotechnology*, 34(9), 733–745.
419. Marchionni, C., Bonsi, L., Alviano, F., Lanzoni, G., Di Tullio, A., Costa, R., ... Bagnara, G. P. (2009). *Angiogenic Potential of Human Dental Pulp Stromal (STEM) Cells*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 22(3), 699–706
420. Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M. and Werner, C. (2004) *Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro*. *STEM CELLS*, 22: 377-384.
421. Wang, C., Li, Y., Yang, M., Zou, Y., Liu, H., Liang, Z., ... Zhang, B. (2018). *Efficient Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Endothelial Cells in Vitro*. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 55(2), 257–265.
422. Nourse, M. B., Halpin, D. E., Scatena, M., Mortisen, D. J., Tulloch, N. L., Hauch, K. D., Torok-Storb, B., Ratner, B. D., Pabon, L., ... Murry, C. E. (2009). *VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(1), 80-9.
423. Aloe, L. (2004). *Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology*. *Trends in Cell Biology*, 14(7), 395–399.
424. Aloe L, (2011) *Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor*, *Send to Arch Ital Biol*;149(2):175-81.
425. Sofroniew, M. V., Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2001). *Nerve Growth Factor Signaling, Neuroprotection, and Neural Repair*. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 1217–1281.

426. Biane, J., Conner, J. M., & Tuszynski, M. H. (2014). Nerve growth factor is primarily produced by GABAergic neurons of the adult rat cortex. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 220.
427. Aloe, L., Rocco, M. L., Bianchi, P., & Manni, L. (2012). Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of translational medicine*, 10, 239.
428. Zhang, J., Lian, M., Cao, P., Bao, G., Xu, G., Sun, Y., ... Cui, Z. (2016). Effects of Nerve Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Promote Human Dental Pulp Stem Cells to Neural Differentiation. *Neurochemical Research*, 42(4), 1015–1025.
429. Hu, Y., Zhang, Y., Tian, K., Xun, C., Wang, S., & Lv, D. (2015). Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor dual gene modification on rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells in vitro. *Molecular medicine reports*, 13(1), 49-58.
430. Liu, F., Xuan, A., Chen, Y., Zhang, J., Xu, L., Yan, Q., & Long, D. (2014). Combined effect of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor on neuronal differentiation of neural stem cells and the potential molecular mechanisms. *Molecular medicine reports*, 10(4), 1739-45.
431. Heese, K., Low, J. W., & Inoue, N. (2006). Nerve Growth Factor, Neural Stem Cells and Alzheimer's Disease. *Neurosignals*, 15(1), 1–12.
432. Chen, S.-Q., Cai, Q., Shen, Y.-Y., Cai, X.-Y., & Lei, H.-Y. (2014). Combined use of NGF/BDNF/bFGF promotes proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 38, 74–78
433. Moattari, M., Kouchesfehiani, H. M., Kaka, G., Sadraie, S. H., & Naghdi, M. (2018). Evaluation of nerve growth factor (NGF) treated mesenchymal stem cells for recovery in neurotmesis model of peripheral nerve injury. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 46(6), 898–904.
434. Leahy, D. J. (2004). Structure and Function of the Epidermal Growth Factor (EGF/ErbB) Family of Receptors. *Advances in Protein Chemistry*, 1–27.
435. Carpenter G, Cohen S. (1990) Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem*;265: 7709-12.
436. Bodnar R. J. (2013). Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *Advances in wound care*, 2(1), 24-29.
437. Esquirol-Caussa, J., & Herrero-Vila, E. (2018). Human recombinant epidermal growth factor in skin lesions: 77 cases in EPtelizando project. *Journal of Dermatological Treatment*, 1–6.
438. Tiaka, E. K., Papanas, N., Manolakis, A. C., & Georgiadis, G. S. (2012). Epidermal Growth Factor in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: An Update. *Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy*, 24(1), 37–44.
439. Berlanga-Acosta, J., Fernández-Montequín, J., Valdés-Pérez, C., et al. (2017). Diabetic Foot Ulcers and Epidermal Growth Factor: Revisiting the Local Delivery Route for a Successful Outcome. *BioMed research international*, 2017, 2923759.
440. Falanga V, Eaglstein WH, Bucalo B, Katz MH, Harris B, Carson P. (1992) Topical Use of Human Recombinant Epidermal Growth Factor (h-EGF) in Venous Ulcers. *J Dermatol Surg Oncol*. 1992 Jul;18(7):604-6.
441. Hu, F., Wang, X., Liang, G., Lv, L., Zhu, Y., Sun, B., & Xiao, Z. (2013). Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and osteogenic and neural differentiation of adipose-derived stem cells. *Cellular reprogramming*, 15(3), 224-32.
442. Hebert, T. L., Wu, X., Yu, G., Goh, B. C., Halvorsen, Y. D., Wang, Z., Moro, C., ... Gimble, J. M. (2009). Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 3(7), 553-61.
443. Ai, G., Shao, X., Meng, M., Song, L., Qiu, J., Wu, Y., Zhou, J., Cheng, J., ... Tong, X. (2017). Epidermal growth factor promotes proliferation and maintains multipotency of continuous cultured adipose stem cells via activating STAT signal pathway in vitro. *Medicine*, 96(30), e7607.
444. Vinatier, C., Bouffi, C., Merceron, C., Gordeladze, J., Brondello, J. M., Jorgensen, C., Weiss, P., Guicheux, J., ... Noël, D. (2009). Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Current stem cell research & therapy*, 4(4), 318-29.
445. Karuppall R. (2017). Current concepts in the articular cartilage repair and regeneration. *Journal of orthopaedics*, 14(2), A1-A3.
446. DeBerardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2012). Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us?. *Cell*, 148(6), 1132–1144.
447. Méry, B., Guy, J. B., Vallard, A., Espenel, S., Ardail, D., Rodriguez-Lafrasse, C., ... Magné, N. (2017). In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *Journal of cell death*, 10, 1179670717691251
448. Czekanska E.M. (2011) Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye. In: Stoddart M. (eds) Mammalian Cell Viability. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 740. Humana Press

449. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. (2013) May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
450. Supino R. (1995) MTT Assays. En: O'Hare S., Atterwill CK (eds) In Vitro Toxicity Testing Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 43.
451. Griffiths, G., & Lucocq, J. M. (2014). Antibodies for immunolabeling by light and electron microscopy: not for the faint hearted. *Histochemistry and cell biology*, 142(4), 347-60.
452. Munson P. (2007) Immunohistochemistry. In: Patel H.R.H., Arya M., Shergill I.S. (eds) Basic Science Techniques in Clinical Practice. Springer, London.
453. Buchwalow I.B., Böcker W. (2010) Antibody Labeling and the Choice of the Label. In: Immunohistochemistry: Basics and Methods. Springer, Berlin, Heidelberg.
454. Sampaio, A. V., Duronio, C., Wagey, R., Thomas, T. E., Eaves, A., Louis, S. A., & Szilvassy, S. (2015). MesenCult™-ACF chondrogenic differentiation medium – a robust animal component-free chondrogenic stimulatory medium for the efficient differentiation of human mesenchymal progenitor cells. *Cytotherapy*, 17(6), S41.
455. Ciuffreda, M. C., Malpasso, G., Musarò, P., Turco, V., & Gnecci, M. (2016). Protocols for in vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Chondrogenic and Adipogenic Lineages. *Methods in Molecular Biology*, 149–158.
456. Adolphe, M., Thenet-Gauci, S., & Demignot, S. (1997). Chondrocyte Culture: A Target System to Evaluate. In *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, 181–207.
457. Sabnis R.W. (2010). *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*, Wiley; 1–35.
458. Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V. B., & Aigner, T. (2010). Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, S113–S116.
459. Delorme B., Charbord P. (2007) Culture and Characterization of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. In: Hauser H., Fussenegger M. (eds) *Tissue Engineering. Methods in Molecular Medicine™*, vol 140. Humana Press.
460. Richardson, S. M., Hoyland, J. A., Mobasheri, R., Csaki, C., Shakibaei, M. and Mobasheri, A. (2010), Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering. *J. Cell. Physiol.*, 222: 23–32.
461. Ali Mobasheri, Gauthaman Kalamegam, Giuseppe Musumeci, Mark E. Batt,(2014),Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions,*Maturitas*:78,3,188-198.
462. Eduardo Anitua, María Troya, Mar Zaldueño (2018) Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine,*Cytotherapy*:20,4,479-498.
463. Viña-Almunia, J., Borrás, C., Gambini, J., El Alamy, M., Peñarrocha, M., & Viña, J. (2016). Influence of different types of pulp treatment during isolation in the obtention of human dental pulp stem cells. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 21(3), e374-9.
464. Yu, J., He, H., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, R., Shi, J., ... Jin, Y. (2010). Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC cell biology*, 11, 32.
465. Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(6), 1380-9.
466. d'Aquino R, Graziano A, Sampaioles M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation (2007). *Cell Death And Differentiation*, 14:1162–1171.
467. Lin, C. S., Ning, H., Lin, G., & Lue, T. F. (2012). Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells?. *Cytotherapy*, 14(10), 1159-63.
468. Natasha Maurmann, Daniela P Pereira, Daniela Burguez, Frederico D A de S Pereira, Paulo Inforçatti.(2017) Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering, *Biomedical Physics & Engineering Express*:3,4,045005.
469. Zamanlui, S., Mahmoudifard, M., Soleimani, M., Bakhshandeh, B., Vasei, M., & Faghihi, S. (2017). Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on PCL/PLGA electrospun with different alignments and compositions. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(1), 50–60.
470. Zong, C., Wang, M., Yang, F., Chen, G., Chen, J., Tang, Z., Liu, Q., Gao, C., Ma, L., and Wang, J. (2017) A novel therapy strategy for bile duct repair using tissue engineering technique: PCL/PLGA bilayered scaffold with hMSCs. *J Tissue Eng Regen Med*, 11: 966–976.
471. Peng, C., Zheng, J., Chen, D., Zhang, X., Deng, L., Chen, Z., & Wu, L. (2018). Response of hPDLSCs on 3D printed PCL/PLGA composite scaffolds in vitro. *Molecular medicine reports*, 18(2), 1335-1344.
472. Kim, H., Lee, J. and Im, G. (2010), Chondrogenesis using mesenchymal stem cells and PCL scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 92A: 659-666.

473. Kota Uematsu, Koji Hattori, Yoshiyuki Ishimoto, Jun Yamauchi, Takashi Habata, Yoshinori Takakura, Hajime Ohgushi, Takeshi Fukuchi, Masao Sato (2005). Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold, *Biomaterials*:26, 20,4273-4279.
474. He L, Pan S, Li Y, Zhang L, Zhang W, Yi H, Song C, Niu Y (2016). Increased proliferation and adhesion properties of human dental pulp stem cells in PLGA scaffolds via simulated microgravity. *International Endodontic Journal*, 49, 161–173.
475. Li, X., Yang, C., Li, L., Xiong, J., Xie, L., Yang, B., Yu, M., Feng, L., Jiang, Z., Guo, W., ... Tian, W. (2015). A therapeutic strategy for spinal cord defect: human dental follicle cells combined with aligned PCL/PLGA electrospun material. *BioMed research international*, 2015, 197183.
476. Wang, X., Sha, X.-J., Li, G.-H., Yang, F.-S., Ji, K., Wen, L.-Y., ... Xuan, K. (2012). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 57(9), 1231–1240.
477. Tabatabaei, F. S., & Torshabi, M. (2017). In vitro proliferation and osteogenic differentiation of endometrial stem cells and dental pulp stem cells. *Cell and Tissue Banking*, 18(2), 239–247.
478. Teti, G., Salvatore, V., Focaroli, S., Durante, S., Mazzotti, A., Dicarolo, M., ... Orsini, G. (2015). In vitro osteogenic and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells seeded on carboxymethyl cellulose-hydroxyapatite hybrid hydrogel. *Frontiers in Physiology*, 6.
479. Zheng, L., Yang, F., Shen, H., Hu, X., Mochizuki, C., Sato, M., ... Zhang, Y. (2011). The effect of composition of calcium phosphate composite scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells. *Biomaterials*, 32(29), 7053–7059.
480. Luo, Z., Li, D., Kohli, M. R., Yu, Q., Kim, S., & He, W. (2014). Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *Journal of Dentistry*, 42(4), 490–497.
481. Jiménez, N. T., Carlos Munévar, J., González, J. M., Infante, C., & Lara, S. (2018). In vitro response of dental pulp stem cells in 3D scaffolds: A regenerative bone material. *Heliyon*, 4(9), e00775.
482. D'Antò, V., Di Caprio, M. P., Ametrano, G., Simeone, M., Rengo, S., & Spagnuolo, G. (2010). Effect of Mineral Trioxide Aggregate on Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Endodontics*, 36(11), 1839–1843.
483. Poggio, C., Ceci, M., Dagna, A., Beltrami, R., Colombo, M., & Chiesa, M. (2015). In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(3), 181–188.
484. Ren, H., Sang, Y., Zhang, F., Liu, Z., Qi, N., & Chen, Y. (2016). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2016, 1–13.
485. Alkahtani, A., Alkahtany, S. M., Mahmood, A., Elsafadi, M. A., Aldahmash, A. M., & Anil, S. (2014). Cytotoxicity of QMix™ endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC oral health*, 14, 27.
486. Peng, C., Zheng, J., Chen, D., Zhang, X., Deng, L., Chen, Z., & Wu, L. (2018). Response of hPDLSCs on 3D printed PCL/PLGA composite scaffolds in vitro. *Molecular medicine reports*, 18(2), 1335-1344.
487. Hiep, N. T., & Lee, B.-T. (2010). Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(6), 1969–1978.
488. Curran, J. M., Tang, Z., & Hunt, J. A. (2009). PLGA doping of PCL affects the plastic potential of human mesenchymal stem cells, both in the presence and absence of biological stimuli. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89A(1), 1–12.
489. Khajeh, S., Razban, V., Talaei-Khozani, T., Soleimani, M., Asadi-Golshan, R., Dehghani, F., ... Mostafavi-Pour, Z. (2018). Enhanced chondrogenic differentiation of dental pulp-derived mesenchymal stem cells in 3D pellet culture system: effect of mimicking hypoxia. *Biologia*, 73(7), 715–726.
490. Bousnaki, M., Bakopoulou, A., Papadogianni, D., Barkoula, N.-M., Alpantaki, K., Kritis, A., ... Koidis, P. (2018). Fibro/chondrogenic differentiation of dental stem cells into chitosan/alginate scaffolds towards temporomandibular joint disc regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(7).
491. Almeida, P. N., Barboza, D., Luna, E. B., Correia, M., Dias, R. B., Siquara de Sousa, A. C., Duarte, M., Rossi, M., ... Cunha, K. S. (2018). Increased extracellular matrix deposition during chondrogenic differentiation of dental pulp stem cells from individuals with neurofibromatosis type 1: an in vitro 2D and 3D study. *Orphanet journal of rare diseases*, 13(1), 98.
492. Dai, J., Wang, J., Lu, J., Zou, D., Sun, H., Dong, Y., ... Shen, G. (2012). The effect of co-culturing costal chondrocytes and dental pulp stem cells combined with exogenous FGF9 protein on chondrogenesis and ossification in engineered cartilage. *Biomaterials*, 33(31), 7699–7711.
493. Rizk, A., & Rabie, A. B. M. (2013). Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytherapy*, 15(6), 712–725.
494. Kim, H., Park, S., Kim, K., Ku, S., Seo, J., & Roh, S. (2019). Enterococcus faecium L-15 Cell-Free Extract Improves the Chondrogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 624.

495. Salkın H, Gönen ZB, Ergen E, Bahar D, Çetin M. (2018). Effects of TGF- β 1 Overexpression on Biological Characteristics of Human Dental Pulp-derived Mesenchymal Stromal. *International Journal of Stem Cells* 1999;0.
496. Teti, G., Focaroli, S., Salvatore, V., Mazzotti, E., Ingra', L., Mazzotti, A., & Falconi, M. (2018). The Hypoxia-Mimetic Agent Cobalt Chloride Differently Affects Human Mesenchymal Stem Cells in Their Chondrogenic Potential. *Stem cells international*, 2018, 3237253.
497. Xiao, L., Kumazawa, Y., & Okamura, H. (2014). Cell death, cavitation and spontaneous multi-differentiation of dental pulp stem cells-derived spheroids in vitro: A journey to survival and organogenesis. *Biology of the Cell*, 106(12), 405–419.
498. Mangkornkarn, C., & Steiner, J. C. (1992). In vivo and in vitro glycosaminoglycans from human dental pulp. *Journal of Endodontics*, 18(7), 327–331.

10. Información suplementaria

1.-Fabricación del andamio

Disolución PCL y PCL:PLGA

Para las disoluciones se utilizó policaprolactona (Perstorp, $M_n=80000$, T_m de 58°C - 60°C y T_g de -60°C) y ácido poli(D, L-láctico-co-glicólico), (láctico:glicólico (75:25), $M_n=76000$ - 115000 y $T_g = 49^\circ\text{C}$ - 55°C). Se prepararon andamios PCL:PLGA en diferentes relaciones (0:100, 10:90 y 20:80). Los disolventes utilizados fueron cloroformo y etanol de grado reactivo (JALMEK®). Las mezclas fueron disueltas al 12% m/v en cloroformo/etanol (90:10) durante un período de 12 h continuas.

Electrohilamiento de las mezclas

Todas las mezclas poliméricas fueron electrohiladas utilizando una diferencia de potencial de 20 kV, una distancia entre el ánodo y el cátodo de 13 cm, una rapidez de giro del cilindro de 3 rev/s y una rapidez de flujo de 0.2 ml/h.

Microscopía electrónica de barrido

La caracterización de la morfología de las fibras de los andamios se llevó a cabo por medio de microscopía electrónica de barrido, los diámetros de las fibras fueron analizados por medio del software Image-j. Para medir este diámetro, cada microfotografía se dividió en cuatro regiones como se muestra en la figura 2, en cada cuadrante se contabilizaron 25 fibras, dando como resultado la medición del diámetro de 100 fibras en total. Para determinar el tamaño del poro promedio, se trazó una circunferencia entre fibras sobrepuestas en forma de triángulo o cuadrado, en cada cuadrante se realizaron 10 medidas de diámetro de los poros, dando un total de 40 medidas por tipo de andamio.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés)

Determinar el comportamiento térmico de los polímeros cuando son mezclados se realizaron ensayos mediante un calorímetro diferencial de barrido modelo Perkin Elmer, los parámetros utilizados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.- parámetros utilizados para los ensayos DSC

| Andamios | Intervalo de Temperaturas (°C) | Masa (mg) | Rampa de temperatura (°C/min) |
|------------------|--------------------------------|-----------|-------------------------------|
| PLGA | 0-80 | 4.1 | 5 |
| PCL:PLGA (90:10) | 0-80 | 5.2 | 5 |
| PCL:PLGA (80:20) | 0-80 | 5 | 5 |

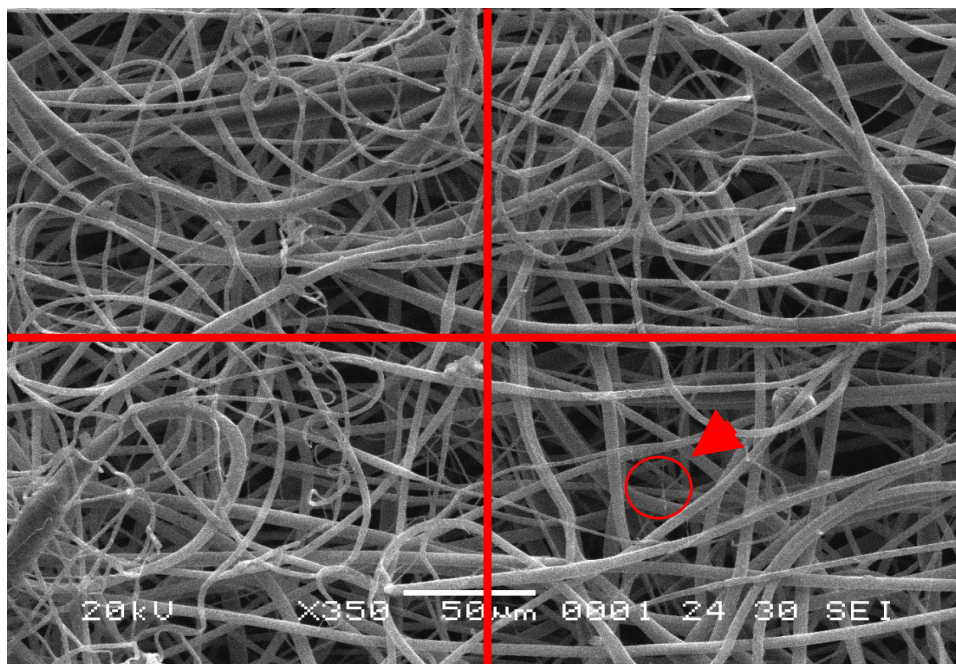
Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés)

Para determinar la formación de nuevos grupos funcionales cuando la PCL y el PLGA fueron mezclados se realizaron ensayos FTIR. Los análisis fueron llevados a cabo por la técnica de reflexión total atenuada (RTA) con un cristal de Germanio en un intervalo de número de onda 500 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹, analizando un total de 100 escaneos.

2.- Resultados

Microscopía electrónica de barrido

Los resultados se muestran en la S2 tabla 1.



S1.- cuadrantes dibujados en las micrografías MEB

S2 Tabla. 1-Mediciones en fibras y tamaños de poro de los andamios

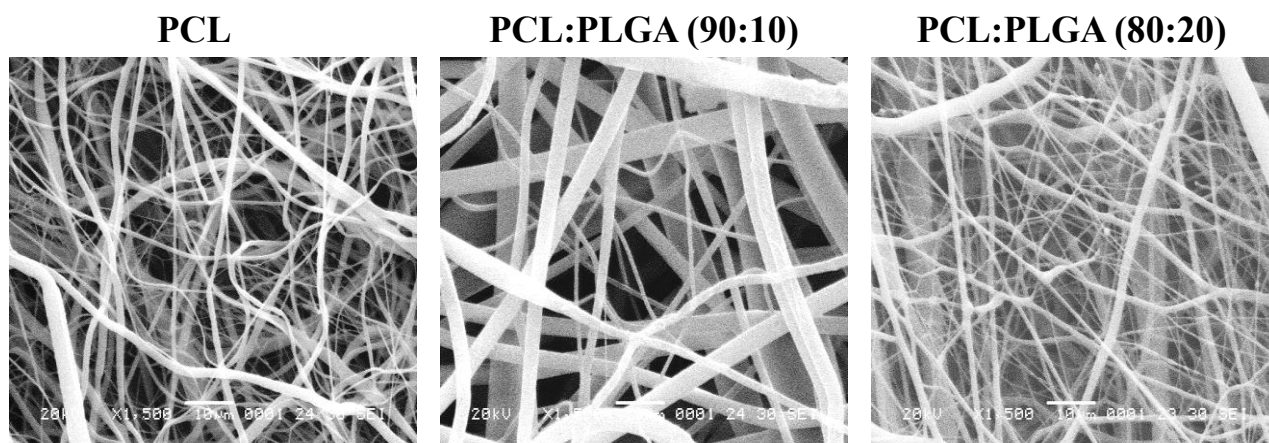
| Andamio | Número de fibras contabilizadas | Diámetro promedio de las fibras (μm) | Tamaño de poro promedio (μm) |
|------------------|---------------------------------|---|---|
| PCL | 100 | 3.69 ± 0.6 | 22.34 ± 1.97 |
| PCL:PLGA (90:10) | 100 | 1.94 ± 0.4 | 9.10 ± 1.02 |
| PCL:PLGA (80:20) | 100 | 1.80 ± 0.3 | 11.45 ± 1.22 |

Los diámetros de poro y tamaños de fibra de estos andamios se encuentran a una escala micrométrica, esto facilita que los nutrientes y el oxígeno puedan penetrar en su interior, ya que éstas son variables críticas para la viabilidad celular.

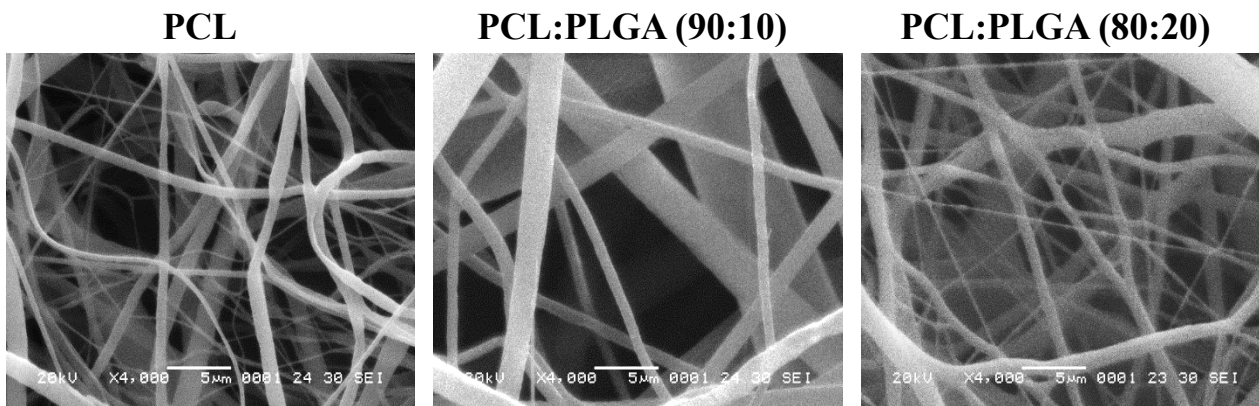
El andamio de la mezcla PCL:PLGA (90:10) mostró fibras con morfología superficial similar al andamio elaborado únicamente de PCL, sin embargo, el diámetro promedio de la

fibra se reduce en 47.5%. Por otra parte, para los andamios PCL:PLGA (80:20) y el tamaño de fibra se redujo en un 51% con respecto a las fibras del andamio de PCL, con estos datos se nota el efecto de la cantidad de PLGA en el tamaño de fibra. En las figuras S3, S4 y S5 se muestran las micrografías de andamios hechos a partir de PCL, PCL:PLGA (90:10) y PCL:PLGA (80:20).

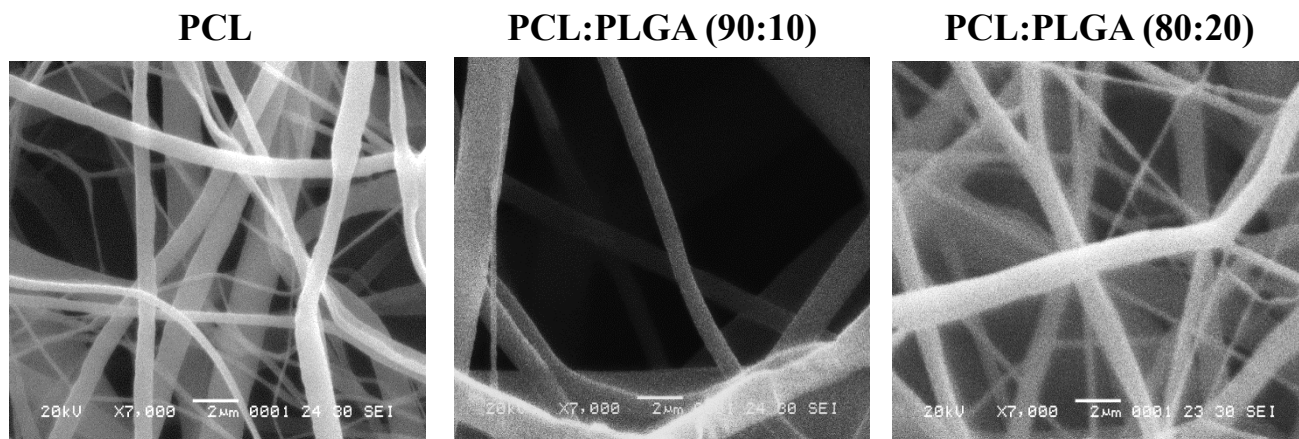
La morfología de las microfibras se encuentra influenciada por diferentes parámetros, tales como: la diferencia de voltaje aplicado, la rapidez de flujo de la disolución polimérica, la distancia entre ánodo y el cátodo, así como las propiedades de la disolución, ya sea concentración, tensión superficial y la composición química de los disolventes. En este caso, los cambios en la morfología de las fibras se atribuyen al porcentaje de PLGA en la disolución polimérica.



S3.- micrografías MEB con una ampliación de 1500x



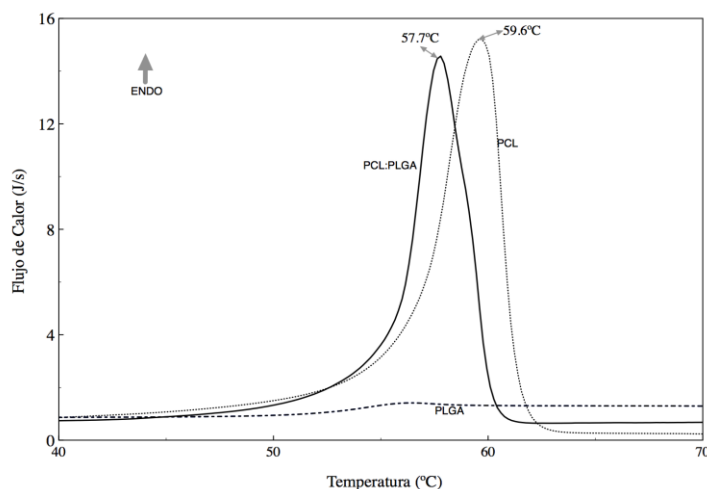
S4.-Micrografías MEB con una ampliación de 4000x



S5.-Micrografías MEB con una ampliación de 7000x

Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés)

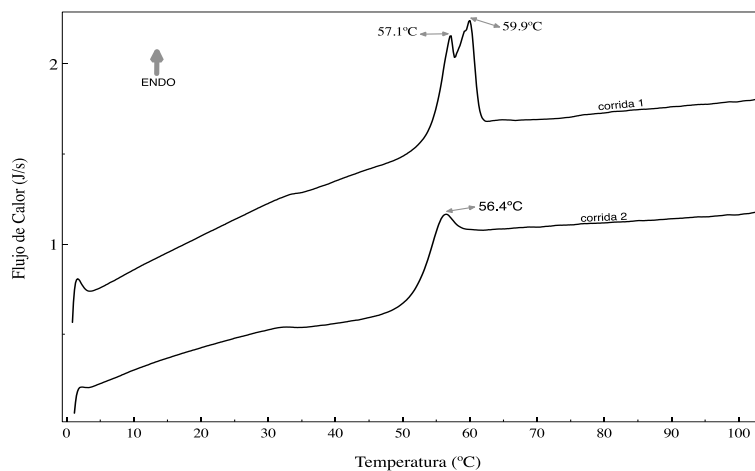
En la figura S6 se presentan los termogramas de DSC de la PCL, PLGA y la mezcla PCL:PLGA. La transición de fusión de la PCL se presenta como un pico endotérmico y, la señal de la transición vítrea del PLGA se presenta como un escalón. Como se observa, la transición de fase correspondiente a la fusión de la PCL (entre 45°C y 63°C) y, la transición vítrea de la PLGA (entre 50°C y 57°C) se traslapan. El efecto de este traslape de las dos transiciones en el termograma de la mezcla PCL:PLGA se observa en el pico correspondiente a la fusión de la PCL, el cual se está a 10°C por debajo del pico de fusión de la PCL pura. Esta diferencia de temperatura entre los picos de fusión de la PCL pura y en la mezcla, indica que estos dos polímeros son compatibles.



S6.- Termogramas para los andamios de PCL pura, PLGA pura y la mezcla PCL:PLGA.

Los tres termogramas de la figura S6 corresponden a una segunda corrida en el DSC, con esto se ha quitado la historia térmica de las tres muestras. Esto nos asegura que las señales que observamos, principalmente la de la mezcla, corresponden a la interacción de ambos polímeros, sin señales atribuidas a la historia térmica.

La figura S7 corresponde a la primera y segunda corrida en el DSC del PLGA. Se observa un doble pico (el que sean dos picos posiblemente se debe a que es un copolímero) endotérmico al terminar el escalón correspondiente a la transición vítrea. Este doble pico corresponde al fenómeno de relajación estructural de la fase amorfa del PLGA. Esta relajación estructural se lleva a cabo por debajo de la transición vítrea y, su magnitud depende de las condiciones térmicas a las que estuvo expuesto el polímero. Debido a que esta relajación es metaestable, en una segunda corrida en del DSC desaparece, como se muestra en la figura S7.

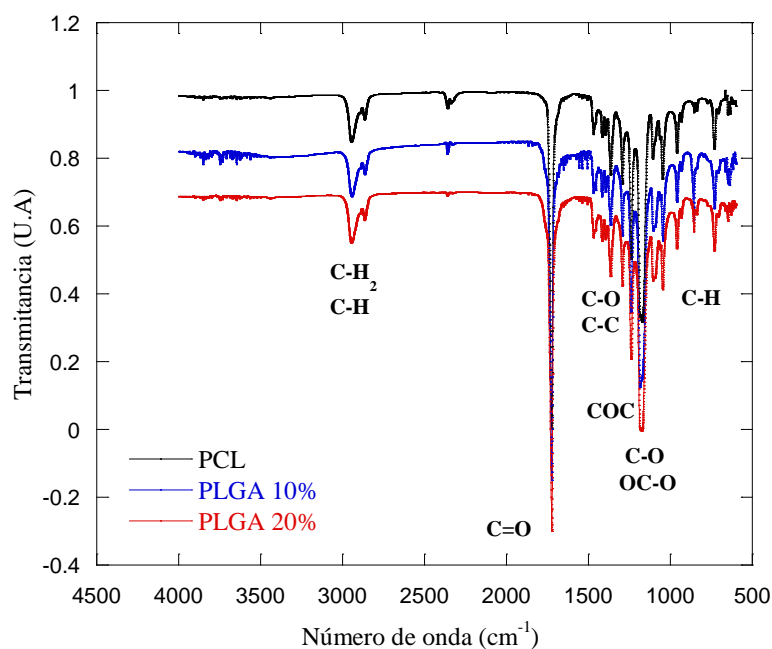


S7.-Primera y segunda corrida del PLGA:PLGA.

La endoterma de cristalinidad de la PCL dentro de la mezcla prácticamente no se ve afectada por la presencia de los dominios del PLGA. Los pequeños cambios que se observaron corresponden realmente a las condiciones de enfriado a los que fue sometida la mezcla, o bien, al poco contenido de PLGA que presenta el andamio, por lo que se asume que existe una compatibilidad entre ambos polímeros.

Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés)

Para determinar si existe la formación de nuevos grupos funcionales cuando la PCL y el PLGA son mezclados se realizaron ensayos FTIR. En el espectro de la figura S8 se muestran los picos pertenecientes a los andamios (PCL, PLGA 10% y PLGA 20%), en donde se identificaron bandas del carbonilo (tensión) en 1733 cm^{-1} , así como tensión asimétrica del grupo CH_2 en 2862 cm^{-1} , también se observan los grupos C-O y C-C a tensión en 1300 cm^{-1} que pertenecen a la fase cristalina de la policaprolactona. En 1244 cm^{-1} se identifica el pico COC en tensión asimétrica y en 1188 cm^{-1} se observa el pico OC-O en tensión. Los picos C-O y C-C en tensión que aparecen en 1152 cm^{-1} pertenecen a la fase amorfa de la policaprolactona. Todos estos grupos funcionales son correspondientes a ambos polímeros (PCL:PLGA), por lo que no existen formaciones de nuevos enlaces durante la disolución polimérica.



S8.- Espectro FTIR de los andamios PCL, PLGA 10% y PLGA 20%