



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN EN ANDAMIOS
DE ALGINATO/HA TRATADOS CON CÉLULAS
TRONCALES DERIVADAS DE LA PULPA DENTAL.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

LUIS ENRIQUE GRESS ORTIZ

TUTORA: Dra. JANETH SERRANO BELLO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Doy gracias a la UNAM, máxima casa de estudio y mi segundo hogar, por formarme en la vida y en conocimientos, por brindarme la oportunidad de crecer, por darme lo que yo más anhelo.

Agradezco a DGAPA-UNAM-PAPIIT-IA205818 por el financiamiento para realizar el presente proyecto.

Agradezco a la facultad de odontología, por todo el tiempo, recursos y espacios que proporciono para que esto fuera posible, por brindarme todo lo necesario para ser un cirujano dentista que ama su vocación.

Agradezco a todos los cirujanos dentistas, maestros y doctores que me guiaron en esta travesía, por generar en mi esa motivación de siempre querer saber más, por tener siempre un tiempo para responder a las dudas que podrían surgir.

Le doy gracias a la doctora Janeth por apoyarme con su tiempo y conocimiento en la formación de este trabajo, por ayudarme y guiarme de la manera más cordial y amable.

Le doy gracias a mi familia, sin ella nada de esto sería posible, sin su apoyo y su protección nunca lo hubiera logrado.

Gracias Sandy, por estar a mi lado apoyándome, por tu comprensión y todo el apoyo que me has dado, gracias por siempre estar junto a mí.

Les doy las gracias a todas esas personas que me acompañaron desde que comencé esta carrera, por lo que aprendí de ellos y por la veces que me ayudaron, gracias por hacer más llevadero todos los momentos buenos y malos.

Gracias a los que creyeron en mí desde el principio, gracias a los que no, doy gracias a todas y cada una de las personas que de alguna manera se involucraron en mi vida y que me han hecho lo que hoy soy; un cirujano dentista.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	6
III. MARCO TEÓRICO	8
3.1 Defectos óseos y prótesis dental.....	9
3.2 El hueso como tejido y como injerto.....	12
3.2.1 Osteoinducción y osteoconducción.....	16
3.2.2 Tipos de injertos.....	19
3.2.3 Regeneración ósea guiada.....	22
3.2.4 Principios de regeneración ósea.....	25
3.3 La bioingeniería y la odontología.....	26
3.3.1 Andamios.....	29
3.4 Células troncales.....	38
3.4.1 Células troncales mesenquimales derivadas de pulpa.....	41
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
V. JUSTIFICACIÓN	45
VI. HIPÓTESIS	46
VII. OBJETIVOS	47
7.1 General	47
7.2 Específicos.....	47
VIII. MATERIALES	48
IX. METODOLOGÍA	49
X. RESULTADOS	56

XI. DISCUSIÓN	60
XII. CONCLUSIONES	61
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

I. INTRODUCCIÓN

La presencia de lesiones óseas en el proceso alveolar, en pacientes que requieren tratamientos protésicos tanto fijos como removibles, presentan una gran problemática para que puedan ser funcionales al no tener un tejido principal de soporte adecuado. A pesar de existir medios de regeneración ósea, como lo son el implantar injertos óseo o membranas, tienen la desventaja de no ser del todo predecibles por lo que generar incertidumbre sobre el éxito que puedan lograr; si a esto agregamos que los tratamientos resectivos por tumores, las infecciones odontogénicas, los traumatismos, la creciente edad de la población, entre otras causas, son factores que alteran la posibilidad de regeneración en la mayoría de los casos, generando así defectos óseos de tamaño crítico que el cuerpo no puede regenerar por sí solo.

La bioingeniería de tejidos es un campo de investigación que está encaminado a la creación de medios innovadores que ayudan al cuerpo a regenerar o sustituir tejidos y órganos que se han perdido y que no podrían ser reparables con los medios actuales. El punto clave de la bioingeniería es el recrear la forma en que los tejidos sanan por si solos, es decir, busca imitar los procesos de regeneración mediante la aplicación de células multipotenciales y factores de crecimiento en sitios de interés. Uno de los tejidos más estudiados y con mayor interés por parte de los odontólogos hasta la fecha es el tejido óseo.

La aplicación de andamios con células troncales en zonas de lesión ósea ha demostrado en varios estudios tener un alto potencial de regeneración e integración hacia la zona receptora, aunque presenta aun algunas limitantes. Por su parte las células troncales que se han aislado de los tejidos dentales presentan un panorama bastante amplio y prometedor en las técnicas de

regeneración ósea por lo que se sigue estudiando para determinar su función e importancia en el desarrollo de nuevas técnicas.

II. ANTECEDENTES

La necesidad de regenerar tejidos lesionados o perdidos y la conservación de los mismos comenzó hace mucho tiempo, dando pautas al inicio de la búsqueda de materiales compatibles con el cuerpo humano que cumplieran tal función. Fue a partir de los años 60 y 70's cuando se comenzaron a emplear metales y cerámicas e inclusive compuestos resinosos para este fin, creando así la primera generación de biomateriales para regeneración ósea, los materiales bioinertes. La segunda generación surge en los años 80's con la aplicación de materiales bioactivos y biodegradables tales como la hidroxiapatita, el fosfato de calcio, el ácido poli láctico, entre otros. Ya para los años de 2000's es cuando se comienza a hablar en forma sobre el uso de células y factores activos para la regeneración, conocida como la tercera generación, la generación de la bioingeniería de tejidos.¹ Figura 1

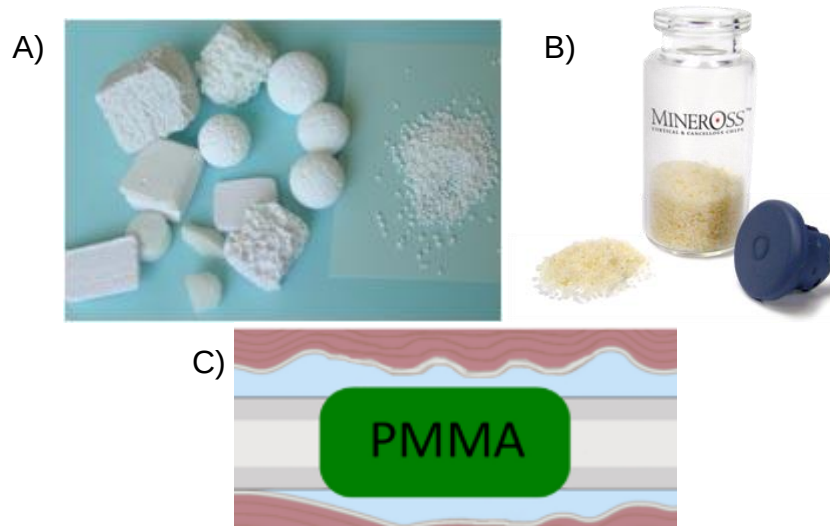


Figura 1 Materiales que se han utilizado para regeneración ósea. A) Diferentes formas de aloplásticos B) Materiales granulados C) Materiales resinosos. ²⁻⁴

El campo de la bioingeniería de tejidos surge a partir del año de 1990, cuando Robert Langer y Joseph Vacanti determinaron la necesidad de restaurar tejidos a partir de células, andamios y moléculas biológicamente activas.⁵ Figura 2

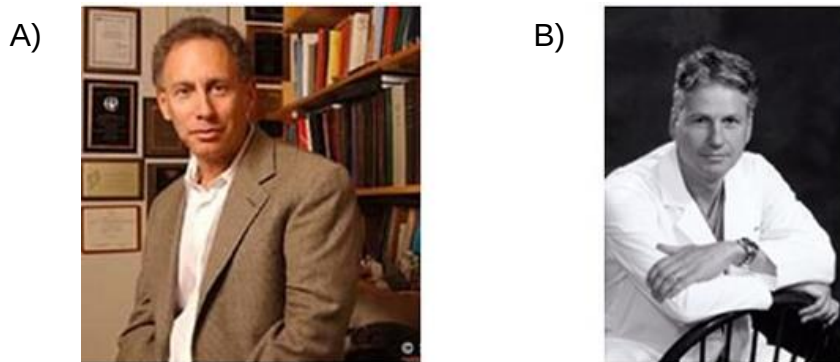


Figura 2 A) Robert Langer; B) Joseph Vacanti; Pioneros de la bioingeniería de tejidos.⁶

Las proteínas morfogénicas óseas, el principal factor de la regeneración ósea, se descubrió por Uris y Strates en el año de 1971, describiendo su capacidad inductora para las células troncales.^{1,7}

De igual manera en los años 80's Friedenstein dio a conocer la posibilidad de regenerar tejidos mesenquimales, principalmente hueso y cartílago, a partir de las células troncales aisladas de la medula ósea.⁸

En el año 2001 Quarto reporto a base de evidencia clínica la reparación de una lesión ósea a partir de la implantación de células troncales autólogas provenientes de la medula ósea.¹

La primera ocasión en que se aislaron las células troncales derivadas de la pulpa dental a partir de dientes permanentes extraídos fue a inicios de los años 2000. En el año de 2018 De Colli, Mariana *et al* realizaron un estudio de estas células y su interacción con superficies de titanio tratadas con arenado ácido y recubiertas con CaMg.^{9,10}

Para el año de 2018, además de los estudios realizados con las células troncales derivadas de la pulpa dental, se realizaron diferentes pruebas con las células troncales derivadas de la papila apical y del ligamento periodontal por parte de Tanriratanawongi, Kallapat *et al*; Miller, Amber *et al* y Wongwatasanti, Ninnita *et al*, donde cada uno de ellos realizo los procesos de cultivo y diferenciación de dichas células hacia células óseas, generando su inducción con ayuda de materiales biocerámicos como la hidroxiapatita.¹¹⁻¹³

La fabricación de andamios, es parte de los estudios más actuales en el campo de la ingeniería de tejidos. Los materiales con una investigación más amplia para la fabricación de andamios son el ácido poli L-láctico y el ácido poli L-Láctico-co-glicólico, aunque se sigue innovando en materiales, métodos y combinaciones para mejorar los andamios existentes.¹⁴

III. MARCO TEÓRICO

La restauración dental a partir de prótesis fijas y removibles toma un papel importante en términos de función y estética, que son los parámetros más solicitados por los pacientes hoy en día. La confección y adaptación de dichos aparatos protésicos por lo tanto son cruciales para una aceptación adecuada por los pacientes, por lo que debe realizarse de manera minuciosa todo el proceso para evitar posibles fallos. Uno de los principales problemas de la actualidad es la presencia de pérdida ósea en la mayor parte de los pacientes que requieren prótesis dental, complicando desde un inicio el éxito y las alternativas de tratamiento. Figura 3

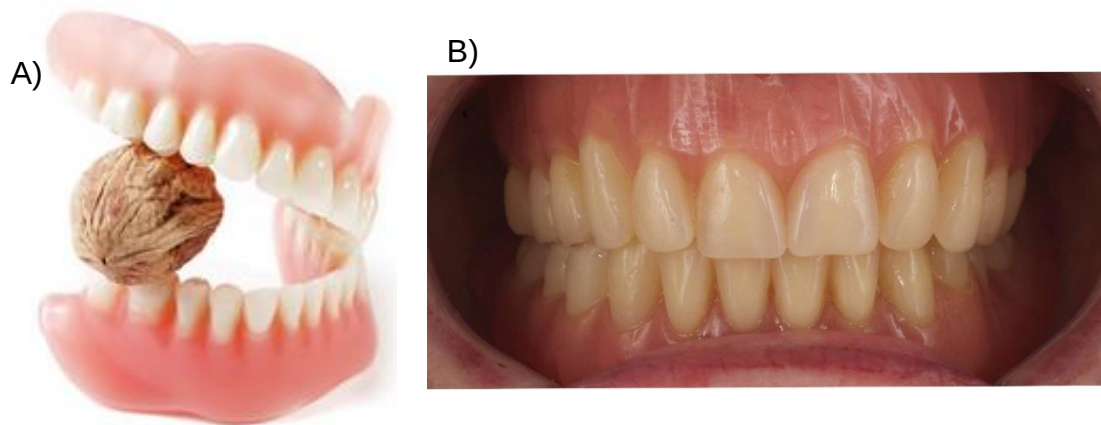


Figura 3 Ejemplos de prótesis removibles A) función ejemplificada B) Prueba de estética en boca.^{15,16}

3.1 Defectos óseos y prótesis dental

Los pacientes con presencia de lesiones óseas en el proceso alveolar, tanto dentado como desdentado, van en aumento conforme el transcurso de los años, esto gracias a la creciente edad de la población y su menor capacidad de regeneración, las cirugías extensas para eliminar tumores, las infecciones odontogénicas, la osteoartritis, las extracciones, los traumatismo, entre otras, han generado una gran problemática para todo el gremio odontológico y su tratamiento. Estos defectos pueden variar en tamaño y profundidad; los defectos pequeños generados por ejemplo por una extracción atraumática tienen un alto potencial de regeneración mientras se conserven intactas las tablas óseas, el problema real comienza cuando hablamos de lesiones de mayor amplitud. Defectos que no cicatrizan por si solos, o que regeneran en una proporción muy baja (menos del 10% del tamaño de la lesión en un año) son considerados como defectos óseos de tamaño crítico, y requieren de cirugías e injertos para corregirlos. También se pueden considerar como defectos óseos de tamaño crítico todas aquellas lesiones que reparan con tejidos conectivos fibrosos que imposibilitan la osteogénesis.^{7,17,18} Figura 4

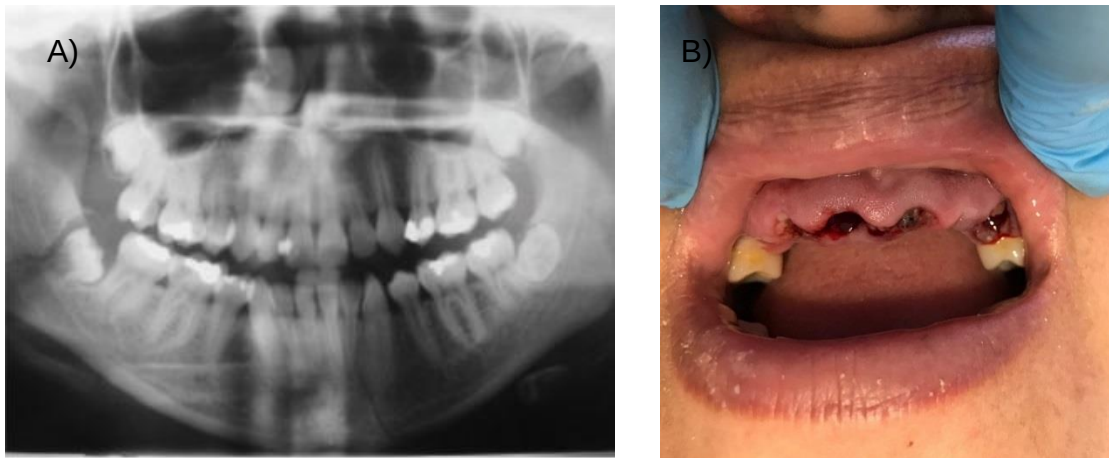


Figura 4 Ejemplos de lesiones óseas A) Fractura del ángulo de la mandíbula,
B) Extracciones múltiples.^{19,20}

Dichos defectos óseos generan una gran polémica al momento de confeccionar una prótesis dental, tanto fija como removible; esto si se toma en cuenta la amplia necesidad de un tejido principal de soporte y retención. En el caso de la prótesis fija, al tener una reducción de las crestas óseas, ya sea por enfermedad periodontal, traumatismo o caries, en los dientes considerados a utilizar como pilares se genera un compromiso importante en el pronóstico, ajuste, estabilidad y estética de la misma; en el caso de una prótesis removible tenemos una disminución en la estabilidad y retención como consecuencia de una cantidad disminuida de proceso alveolar, todo esto obligando a realizar tratamientos “pre-protésicos” que nos ayuden a corregir dichos defectos y con ello conseguir el éxito deseado de las restauraciones protésicas. Esta terapia pre-protésica se encaminaría entonces a la regeneración y mantenimiento del tejido óseo. Figura 5

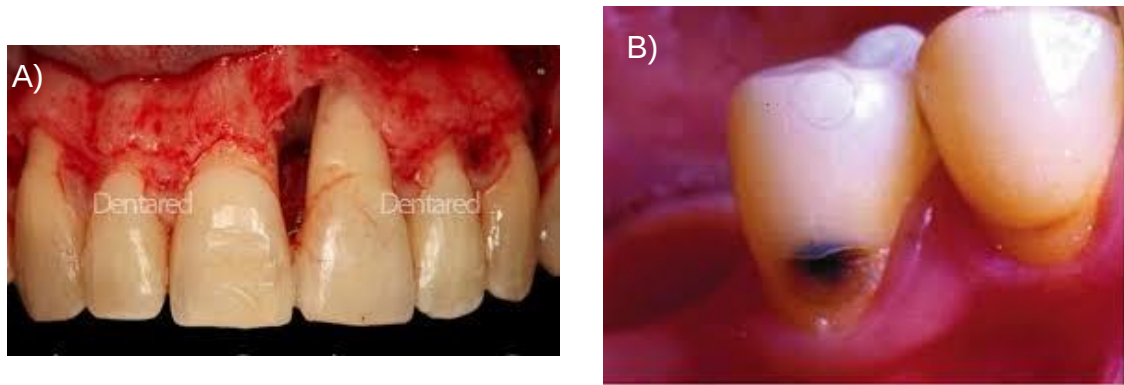


Figura 5 A) Defecto óseo vertical de amplio tamaño, afecta la estética gingival y soporte del diente; B) Caries cervical que generan compromiso de los dientes pilares.²¹

Desde el punto de vista de la regeneración, existe la posibilidad de implantar materiales de relleno tales como los injertos óseos (de misma especie o diferente) e inclusive los injertos sintéticos (aloplásticos) que generan una inducción y favorecen la formación de nuevo hueso en la zona en que se implanten, pero teniendo el inconveniente de no ser predecibles, generando incertidumbre y en ocasiones decepción por parte del paciente e incluso del dentista con los resultados obtenidos. Si bien el día de hoy se presenta la gran ventaja de los tratamientos de “regeneración ósea guiada” en base a injertos y membranas, que serán útiles como barreras de resguardo de nuestro injerto, que pueden restaurar e incluso aumentar la cantidad de hueso en un defecto o procesos alveolares atróficos, aunque tiene la desventaja de requerir de un amplio suministro sanguíneo y una base ósea con paredes que puedan contener al injerto para que puedan funcionar.^{7,22,23}

Se presenta así una problemática y una posible solución, pero ¿Qué opciones de tratamiento se podrían considerar si no contamos con las características adecuadas para realiza un injerto simple o una regeneración ósea guiada?, la opción se encuentra encaminada a la bioingeniería de tejidos.

3.2 El hueso como tejido y como injerto

El tejido óseo en el cuerpo humano recibe las funciones de protección, sostén y movimiento del cuerpo, además de ser un reservorio de minerales, por lo cual estará en constante reabsorción y remodelación, dependiendo de la función y necesidades que se tengan en el transcurso de la vida. El hueso por si solo es uno de los tejidos con mayor posibilidades de regenerarse, esto gracias a la gran cantidad de células (osteoprogenitoras y osteoblastos principalmente) y a la amplia red de vasos sanguíneos que contiene. Las células osteoprogenitoras, en presencia de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs, por sus siglas en inglés) serán las responsables de iniciar el proceso de osificación al reclutar y activar los pre-osteoblastos para la formación de matriz ósea necesaria para la formación del hueso.^{7,24} Figura 6

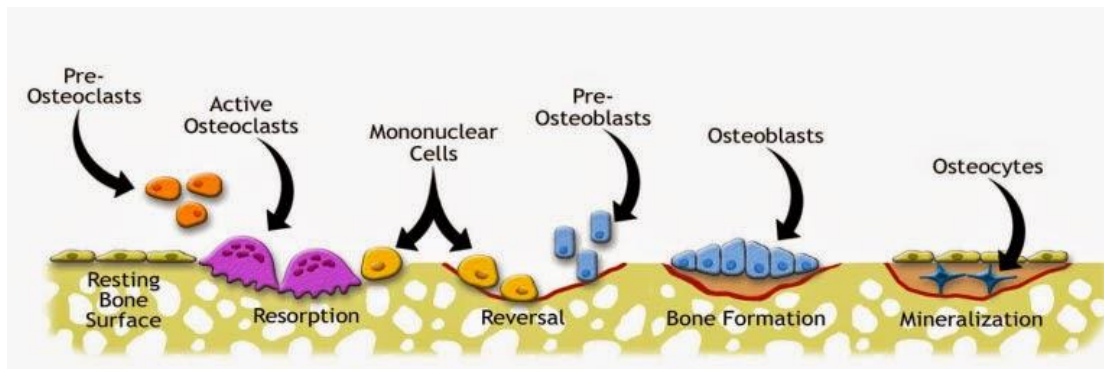


Figura 6 Proceso de remodelación constante del hueso.²⁵

Se clasifica al hueso entonces como un tejido conjuntivo especializado compuesto de elementos orgánicos e inorgánicos; en la matriz ósea podemos encontrar una amplia cantidad de colágena tipo I junto con otras proteínas, que conforman la parte orgánica; además en el tejido óseo propiamente se observan cristales de hidroxapatita $[3Ca_3(PO_4)_2(OH)_2]$ que conforma el componente inorgánico en mayor cantidad.^{1,22}

Dentro del tejido existen varios tipos celulares, que serán las encargadas de realizar el trabajo de síntesis y degradación del tejido; se describen cada una de ellas a continuación (figura 7).²⁶

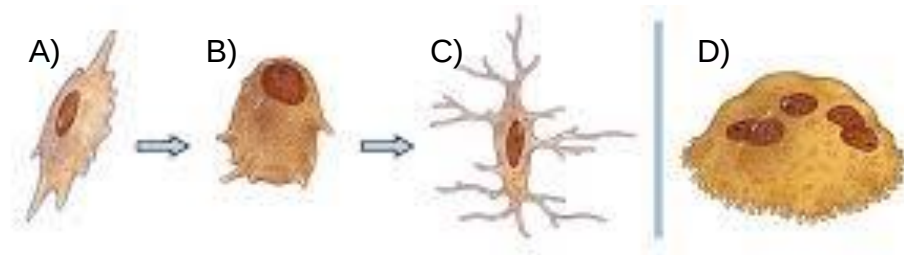


Figura 7 Células pertenecientes al tejido óseo: A) Célula osteoprogenitora; B) Osteoblasto; C) Osteocito; D) Osteoclasto.

- Células osteoprogenitoras: son células indiferenciadas, van a estar localizadas en la capa interna del periostio y en ocasiones en los conductos del sistema de Havers; estas células están encargadas de la diferenciación a pre-osteoblastos al tener contacto con mediadores tales como factores de crecimiento o BMPs.^{7,22,24}
- Osteoblastos: son responsables de la síntesis y depósito de matriz extracelular ósea, además de ser las reguladoras de la mineralización de dicha matriz. Estas células se van a diferenciar propiamente de las células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en ingles) que se encuentran en la medula ósea, esto gracias a la expresión de los genes Indian hedgehog (*Ihh*) y *RUNX2* por las MSC's, y a la proliferación de las mismas. También hay probabilidad de que las células osteoprogenitoras se diferencien en osteoblastos al tener los factores necesarios (proteínas morfogenicas óseas o BMP's y factores de crecimiento).^{7,22,24}
- Osteocitos: son células en forma de estrella que estará embebidas en la matriz ósea calcificada; estarán encargadas de transmitir

información a las demás células sobre la regulación de síntesis/degradación del tejido conforme al estímulo o carga que reciba el hueso, al igual que mediar las concentraciones de calcio en sangre. Al formarse hueso alrededor de un osteoblasto y al quedar atrapado, este comienza un proceso de diferenciación a un osteocito.^{7,22,24}

- Osteoclastos: al igual que los osteoblastos, su formación estará dictaminada por la expresión de genes específicos, en este caso los factores PU-1 y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) serán los encargados de generar esa diferenciación celular. Estarán encargadas de la resorción ósea mediante la síntesis de ácidos y enzimas que degradaran los componentes inorgánicos del hueso.²²

Además de los componentes celulares principales existe un tejido que recubre los huesos llamado periostio; es una vaina de tejido conjuntivo denso irregular, se compone de dos capas, una externa o fibrosa que contiene una amplia red de vasos sanguíneos y fibroblastos dispuestos a lo largo de toda esta, y la capa interna u osteogénica conformada por tejido más laxo y una amplia disposición de células osteoprogenitoras junto con algunos osteoblastos. Estas células osteoprogenitoras serán las encargadas de la síntesis de colágeno tipo I, el cual proporciona la solides estructural al hueso para soportar su función diaria.^{7,22,24} Figura 8

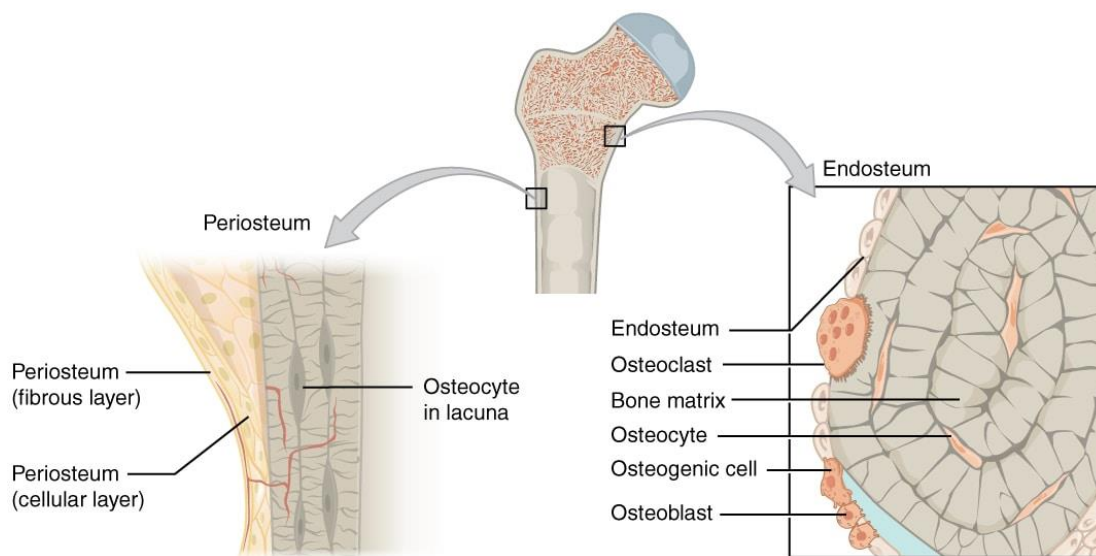


Figura 8 Representación esquemática del periostio y el endostio. ²⁷

El periostio es el tejido que albergará las terminaciones nerviosas nociceptivas, hecho por el cual es sensible a la manipulación, además de estas terminaciones tendrá también vías de drenaje linfático y vasos sanguíneos que favorecerán la nutrición del tejido óseo.²²

Por último, el componente conocido como medula ósea, es el tejido contenedor de las células hematopoyéticas y las MSC's, así que es considerada como la principal fuente de células troncales.^{1,22} Figura 9

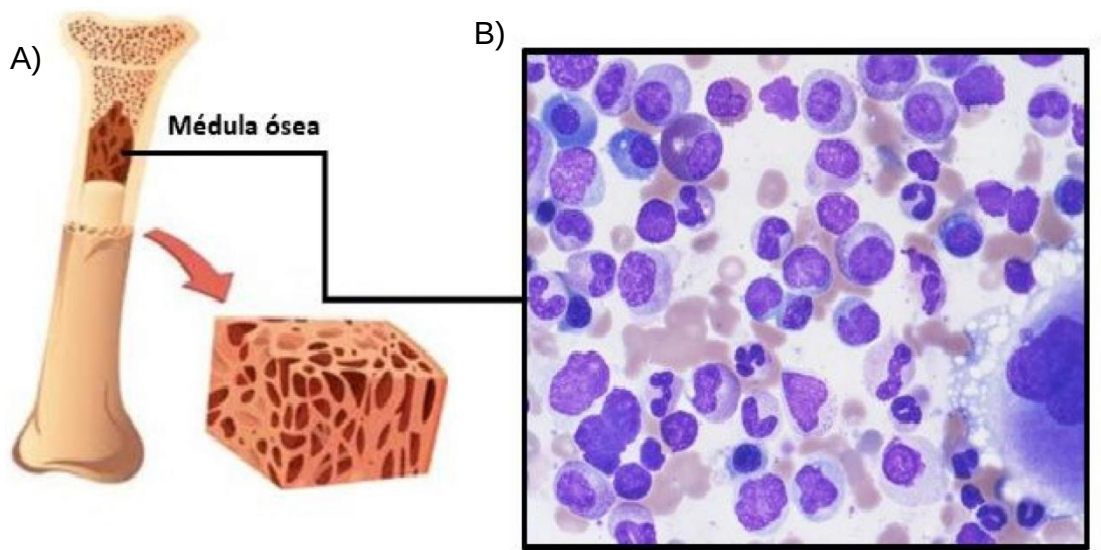


Figura 9 Medula ósea, primer tejido donde se aislaron MSC's A) La medula ósea se encuentra en el centro de los huesos, B) Dentro de la medula se encuentra la presencia de células hematopoyéticas y MSC's. ²⁸

3.2.1 Osteoinducción y osteoconducción

El tejido óseo cuenta con la capacidad osteoconductora; se refiere a la capacidad que tiene de favorecer el crecimiento óseo y osteoinductora; se refiere al proceso por el cual un tejido indiferenciado puede diferenciarse a tejido óseo. Además, al tomarse como injerto, es el único que tiene una integración total al sitio de implantación sin que existan rechazo del injerto o pérdidas significativas del volumen, razón por la cual el injerto óseo autólogo (perteneciente a la misma persona) es considerado el estándar de oro de los injertos. ^{7,8,29-31}

El término osteoinducción ha sido referido como el proceso por el cual un tejido, o algún subproducto derivado de, curse por una segunda diferenciación a tejido óseo; se clasifica de igual manera a este proceso en tres grandes pasos (figura 10)⁷:

- Reclutamiento de MSC's,

- Diferenciación de las MSC's, y
- Formación de hueso.

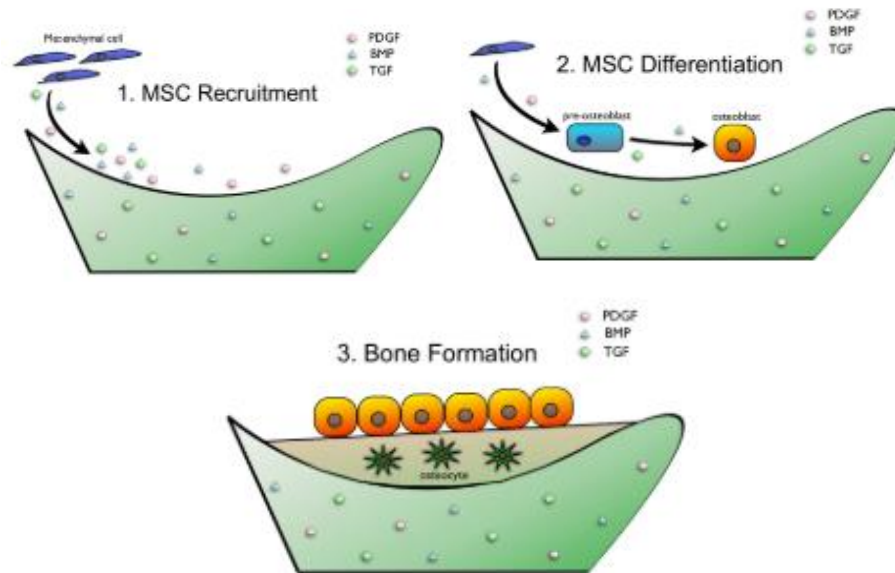


Figura 10 Proceso de reclutamiento, diferenciación y formación de hueso.

El primer punto, el reclutamiento de MSCs, a pesar de ser un punto que no se ha esclarecido se puede atribuir esta función al depósito de ciertos factores señalizadores en la zona que se quiere regenerar. Las principales proteínas que han demostrado tener esta capacidad de reclutamiento son las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), generando la quimiotaxia de células osteoblasticas y osteoprogenitoras; y los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs), esta al ser liberada por las plaquetas en la zona de lesión promueven una rápida migración y proliferación celular.⁷

Después de lograr “juntar” todas estas células en la zona de la lesión, el siguiente paso es la diferenciación para crear células que realicen el trabajo. La diferenciación a células osteoblasticas va a estar mediada por la cantidad de células osteoprogenitoras y MSC's junto con la capacidad de las mismas para generar los factores necesarios que ayudaran a inducir esta diferenciación (BMP's y factores de crecimiento). Con las células listas y los

factores necesarios para la síntesis de la matriz ósea, entonces se inicia la formación de nuevo hueso, proceso que se llevará a cabo gracias a los osteoblastos y los osteoclastos presentes en la zona.^{7,32} Figura 11

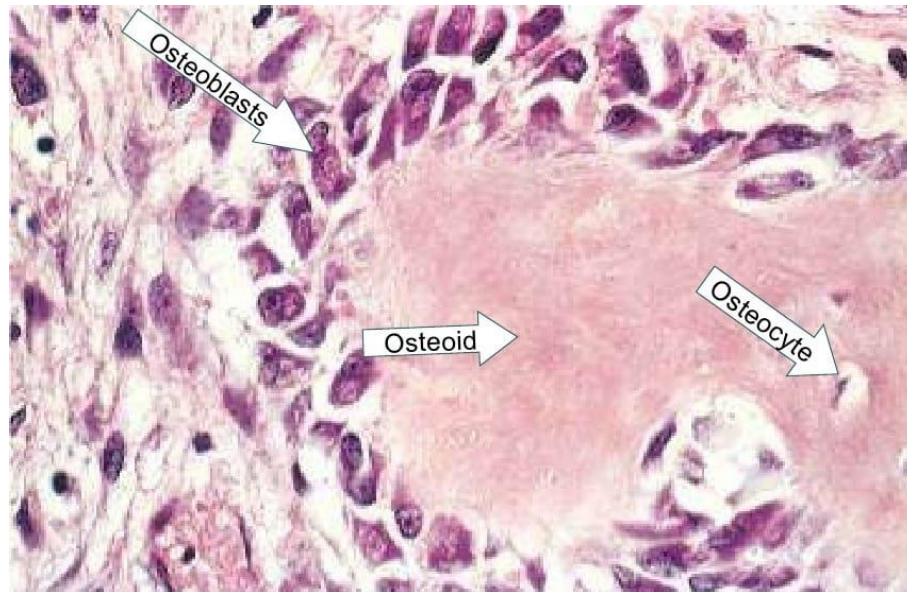


Figura 11 Fotomicrografía de tejido óseo en formación, el osteoide es el nombre que se le da a la matriz ósea no calcificada.³³

Por otra parte la osteoconducción se refiere a la capacidad de generar el crecimiento óseo en una superficie o a través de esta. Para que la inducción se pueda realizar de manera adecuada se requiere en primer lugar de un aporte sanguíneo adecuado que asegure el transporte de factores necesarios para la movilización de las MSC's y que preserve las células osteogénicas y osteoprogenitoras presentes en el tejido óseo lastimado, y en segundo punto la presencia de un material biocompatible que favorezca el crecimiento y formación de nuevo hueso.³² Figura 12

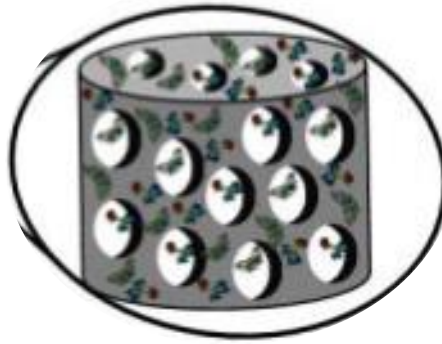


Figura 12 Ejemplo de osteoconducción, un andamio permite la adhesión y proliferación celular como parte del proceso. ³⁴

3.2.2 Tipos de injertos

La aplicación de injertos en un defecto óseo tiene como propósito principal generar hueso nuevo a partir de este mismo, razón por la cual se requiere de materiales con cualidades osteoinductoras y osteoconductoras.

Como se mencionó anteriormente, el injerto óseo autólogo es el parteaguas en cuanto a regeneración ósea. A pesar de ser el mejor injerto existente, también tiene sus desventajas:

- La necesidad de realizar una segunda cirugía, esto para obtener dicho injerto
- La poca cantidad de injerto con la que se cuenta
- El dolor post operatorio en dos zonas
- La inconformidad del paciente para realizar la extracción del injerto
- Hipersensibilidad, parestesia e incluso la infección de la zona donadora. ^{8,29,30,35,36} Figura 13

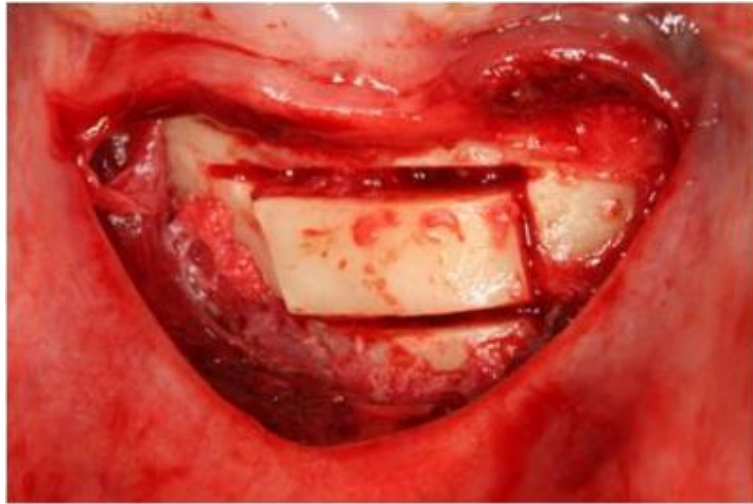


Figura 13 Toma de injerto en bloque del mentón. ³⁷

Estas serían las principales causas por las cuales se ha optado por la búsqueda de nuevos medios para la fabricación y obtención de injertos óseos.

Los aloinjertos son tomados de la misma especie que el receptor, obtenidos principalmente de cadáver, y serían la segunda línea de opción.²⁹ Al pertenecer a un huésped diferente requiere de tratamientos previos antes de ser implantado en el receptor, esto con el fin de realizar una descontaminación del mismo y así evitar posibles efectos adversos. Estos procesos pueden ser lavados por equipos ultrasónicos, esterilizados con óxido de etileno, lavados con antibióticos e incluso aplicación de radiación gamma, por lo cual presenta la desventaja de perder parte de su potencial osteoinductivo, lo cual compromete el éxito dentro del tratamiento, pero la principal desventaja que presenta son las infecciones cruzadas o transmisión de enfermedades.^{29,30} Figura 14

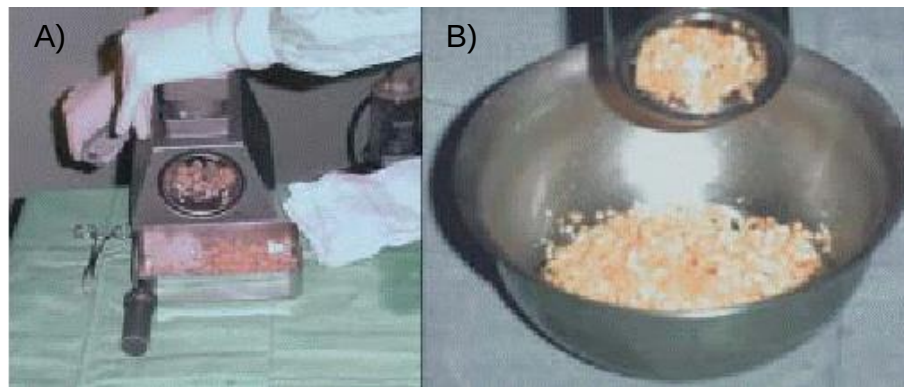


Figura 14 Las muestras de hueso, tomadas principalmente de cabeza de fémur A) Se trituran para su manejo, B) Listo para los procesos de desinfección. ³⁸

Los xenoinjertos los cuales son tomados de una especie diferente a la del receptor, principalmente de especies bovinas y porcinas, y son de los más utilizados en odontología; aunque al pertenecer a una especie diferente cuenta con un potencial grado de inmunogenicidad por parte del receptor, y por lo tanto la posibilidad de el rechazo del injerto. ³⁰ Figura 15

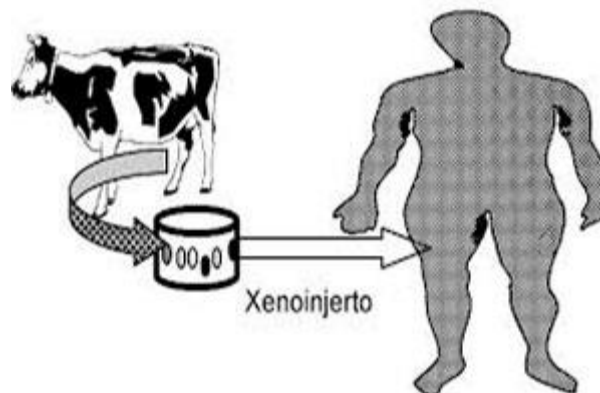


Figura 15 Los Xenoinjertos o Heteroinjertos son tomados a partir de una especie diferente a la del receptor. ³⁹

Finalmente, los aloplásticos o sintéticos, son tomados como substitutos óseos y están confeccionados a base de material inorgánico (HA, fosfato tricalcico, sulfato de calcio). Estos últimos también son clasificados en

bioinertes; es decir no generan una reacción al estar en contacto con los tejidos vivos, y los bioactivos; que pueden generar una relación con los tejidos promoviendo la actividad celular (osteoinducción) los cuales presentan una buena estabilidad pero con la desventaja de presentar una menor respuesta osteogénica en comparación con los otros injertos y una reabsorción muy lenta.^{22,30,36} Figura 16

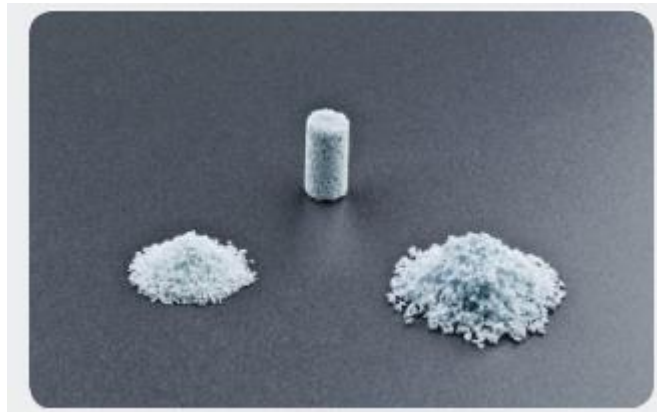


Figura 16 Muestra de injertos aloplásticos marca Alpha- Bio's Graft®.⁴⁰

3.2.3 Regeneración ósea guiada

Se le conoce bajo este término a todo procedimiento quirúrgico, encaminado a restaurar los tejidos de sostén de los dientes, en este caso en específico del hueso alveolar, o en su defecto el crear un aumento del reborde residual. Estos tratamientos consisten en el uso de membranas que servirán como una barrera que evitara la “contaminación” del coágulo y del defecto evitando así la proliferación de células generadoras de tejidos blandos que puedan inhibir la función de las células osteogénicas; puede de igual manera combinarse con injertos óseos y/o factores de crecimiento, como los utilizados a partir del centrifugado sanguíneo (factores ricos en plaquetas),

con tal de mejorar la cantidad y calidad de hueso a regenerar.^{22,23,29,41}

Figura 17

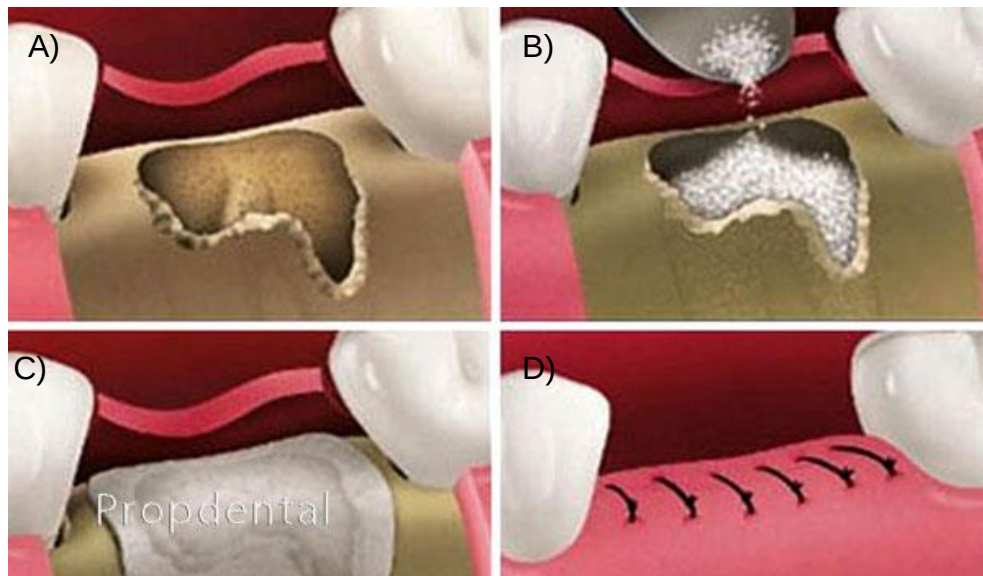


Figura 17 Representación de cirugía de regeneración ósea guiada para conservación de alveolo; A) Alveolo post extracción, B) Aplicación del injerto en el alveolo, C) Se recubre con ayuda de una membrana, D) Cierre y sutura del lecho quirúrgico.⁴²

Los procesos de cirugía se llevan a cabo con ayuda de los injertos óseos conocidos en el mercado, los cuales principalmente se encuentran en forma granulada, por lo tanto requieren de una zona receptora apta para contener el injerto y que pueda nutrirse en su totalidad; otra opción es el uso de injertos en bloque, que están indicados principalmente en aumentos de reborde, aunque tienen la desventaja de ser frágiles y al ser relativamente gruesos no se asegura que todo el injerto se nutra y funcione como un osteoconductor por completo, generando pérdida de un porcentaje del injerto (figura 18).^{22,23,43}

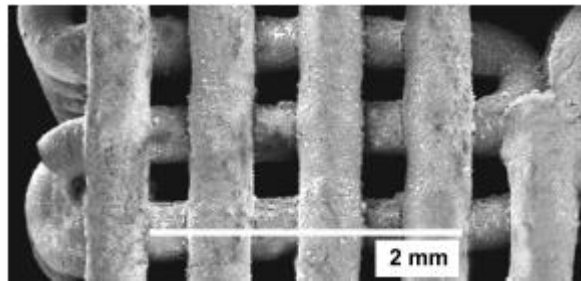


Figura 18 Ejemplo de bloque para injerto con poros para mejorar la difusión de nutrientes y células, asemejando la estructura de un andamio; marca OsteoFlux®.

La segunda parte para hacer funcionar estos procedimientos es el uso de membranas de barrera. Estas membranas pueden ser reabsorbibles o no reabsorbibles, siendo las reabsorbibles las más solicitadas; además según Hämmerle y Jung, determinaron que las membranas reabsorbibles permiten una mejor regeneración del hueso en comparación con las membranas de PTFE-e (politetrafluoroetileno expandido). La barrera que forman evita la migración de células propias de los epitelios de las mucosas bucales hacia el coagulo de la lesión; se pretende que al realizar esta separación se da el tiempo necesario para que las células osteogénicas logren generar la matriz ósea y comenzar la diferenciación del tejido, ya que los tejidos epiteliales tienden a crecer de manera más rápida y extensa en comparación (figura 19).⁴¹



Figura 19 Membrana reabsorbible fijada con tornillos para proceso de regeneración ósea guiada.

3.2.4 Principios de regeneración ósea

El hueso tiene la capacidad de regenerarse por sí solo gracias a la cantidad de células óseas progenitoras que contiene, las cuales se encargan de mediar los procesos de catabolismo y anabolismo óseo, generando de esta manera un balance, reabsorbiendo el tejido viejo seguido del reemplazamiento de tejido nuevo; este proceso de renovación se ha estimado que se realiza a lo largo de toda la vida. Para que esto sea posible es necesaria una constante diferenciación de las células del tejido hematopoyético hacia osteoclastos y osteoblastos y la migración hacia las zonas de interés a regenerar.^{1,22}

Se describe en primera instancia que en las zonas a regenerar se forma una membrana mesenquimatosa altamente vascularizada, con tal de tener el medio necesario para la migración y adhesión celular, donde van a diferenciar las células hacia osteoblastos para el inicio de la síntesis de matriz ósea y con ello la formación de las primeras trabéculas. Por otra parte los osteoclastos comenzaran su labor de “remodelación” de la zona del defecto en las zonas de los extremos con el fin de generar una base a la cual anclar el nuevo hueso que se está formando.^{1,24}

Esta formación de trabéculas cada vez se interconecta más entre si, generando una configuración similar a la del hueso esponjoso, este hueso se conoce usualmente como hueso inmaduro o primario, ya que no tiene un orden lógico de las fibras colágenas que contiene. Este hueso no quedará así propiamente, ya que los osteoclastos y los osteoblastos seguirán trabajando sobre del hueso primario hasta generar un hueso maduro; se dice que el hueso está completo cuando se logra una propagación de la mineralización con la formación de cristales de hidroxapatita en su estructura, además de que se sigue secretando nueva matriz a lo largo de varios meses con tal de formar el hueso en su totalidad.^{1,22,24} Figura 20

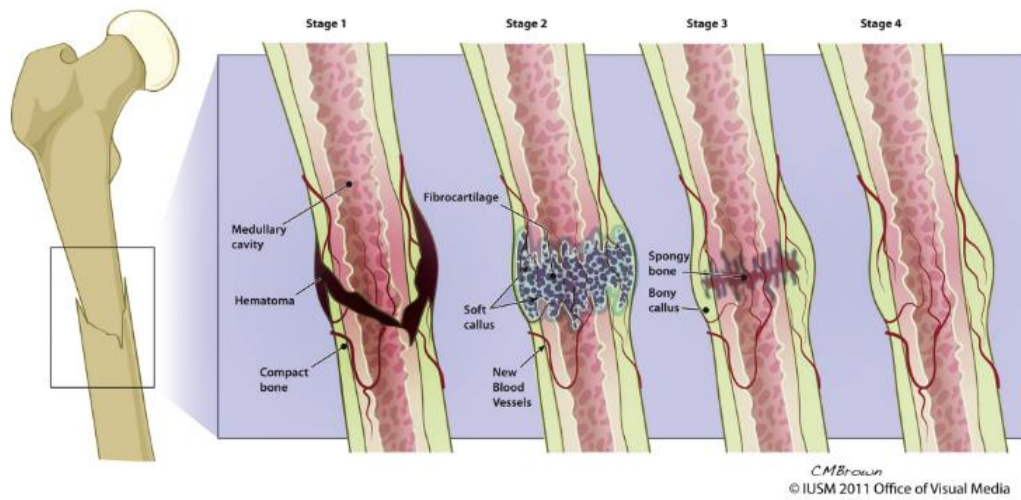


Figura 20 Ejemplo del proceso de cicatrización y reparación de un hueso fracturado; en la fase 1 se observa la formación de un hematoma rico en plaquetas, en la fase 2 se distingue la formación de un tejido mesenquimatoso rico en fibrina y altamente vascularizado, en la fase 3 se observa un hueso inmaduro y la fase 4 se observa la mineralización a hueso maduro.⁴⁴

3.3 La bioingeniería y la odontología

La bioingeniería fue descrita por Langer y Vacanti en 1990 y surge como una ciencia que busca desarrollar nuevas técnicas y materiales capaces de regenerar o sustituir órganos o tejidos con daños que hasta la fecha son considerados como intratables con los medios y materiales presentes en el mercado. La rama de la bioingeniería se compone de tres principales componentes o campos de estudio y acción:

- Células (propriadamente células mesenquimatosas o troncales)
- Andamios o matrices (geles, membranas), y
- Factores de crecimiento.^{5,30,45,46}

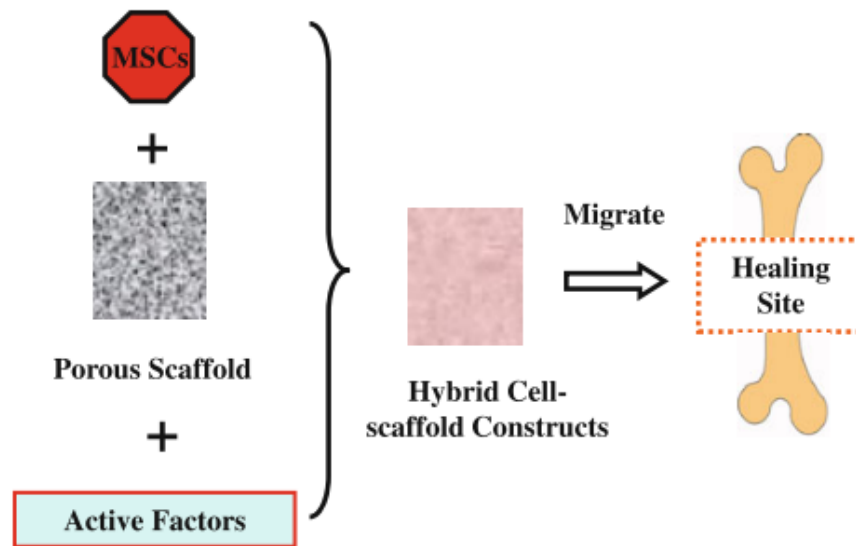


Figura 21 Triada de la bioingeniería.¹

La forma en la que la bioingeniería pretende regenerar los tejidos es mediante la mímica de los procesos de regeneración del cuerpo mismo. Es decir, busca generar en tiempo y forma una sustitución de tejidos que sean idénticos, biológicamente hablando, y que logren fusionarse y ser poco distinguibles en comparación con el tejido original. La forma en que realiza esta mímica es bajo el estudio de la función y estructura de las células con capacidad de diferenciación, ya que estas poseen la clave para generar tejidos nuevos de manera muy similar al proceso que sucede durante el desarrollo fetal, y así lograr mantener y recuperar tejidos u órganos dañados o perdidos.^{46,47}

El estudio principal de esta área se ha encaminado en la fabricación de andamios y medios de transporte de las células troncales y factores de crecimiento que puedan ser de utilidad para la formación de un tejido en específico con ayuda de materiales que generen una respuesta mínima o nula del receptor y una adecuada degradación del mismo, siendo el tejido óseo uno de los más estudiados e investigados.^{8,46}

El campo de la odontología ha sido uno de los más interesados en el desarrollo de técnicas de ingeniería tisular, por su alto potencial regenerativo que muestra en las pruebas *in vitro* que se han documentado. Otro punto por el cual existe un interés por el desarrollo de ingeniería de tejidos está encaminado a la amplia necesidad y demanda que existen en el mundo por los procesos para regenerar huesos, ya que la disminución y pérdida de proceso alveolar es parte del día a día en la práctica odontológica.

Un claro ejemplo de la relación de la bioingeniería con la odontología está en la regeneración de tejidos blandos de la mucosa oral, ya que se presenta un alto grado de rechazo de los injertos de otros orígenes implantados en la cavidad bucal, los cuales presentan en la mayoría de los casos inmunogenicidad por parte del receptor, pérdida de la armonía y estética gingival al tener diferentes grados de queratinización, entre otros problemas, por lo tanto la creación de andamios a base de fibrina y colágeno en conjunción con células del tipo fibroblastos y queratinocitos a generando una nueva opción viable y segura para corregir defectos muy comunes de la patología periodontal con un mayor rango de aceptación por parte del receptor y una mejor integración del tejido hacia el andamio.^{45,47}

En la actualidad también aparecen estudios encaminados a la aplicación de constructos a base de células troncales autólogas, moléculas activas y un andamio inteligente en íntima relación con tejidos pulpares de dientes jóvenes para la formación de una nueva red de nervios y vasos que asemejan a la pulpa dental, abriendo así un panorama más amplio en la conservación de dientes que requieren tratamientos endodóncicos a muy corta edad.⁴⁵

Otro claro ejemplo del uso de la bioingeniería, o al menos una parte de ella, se puede observar en los procedimientos de regeneración en base a factores de crecimiento, como es el caso del factor rico en plaquetas o la aplicación de amelogeninas en los casos de regeneración ósea guiada.³⁰

3.3.1 Andamios

Los andamios son estructuras tridimensionales que funcionan como acarreadores de células y factores de crecimiento que se quieren implantan en los defectos o zonas que se pretendan regenerar; estos pueden ser permanentes o temporales, es decir que pueden permanecer después de su colocación o degradarse después de que cometa su objetivo. En la actualidad la ingeniería se ha enfocado en la fabricación de andamios con materiales reabsorbibles, tanto sintéticos como naturales, esto con el fin de lograr un llenado del defecto con tejido óseo y no solo de un andamio, que no tiene las mismas características ni resistencia. Los andamios por lo tanto deben generar una matriz temporal que servirá de guía para las células, permitiendo que se adhieran y proliferen de manera adecuada, rápida y sencilla.^{8,9,46,47} Figura 22

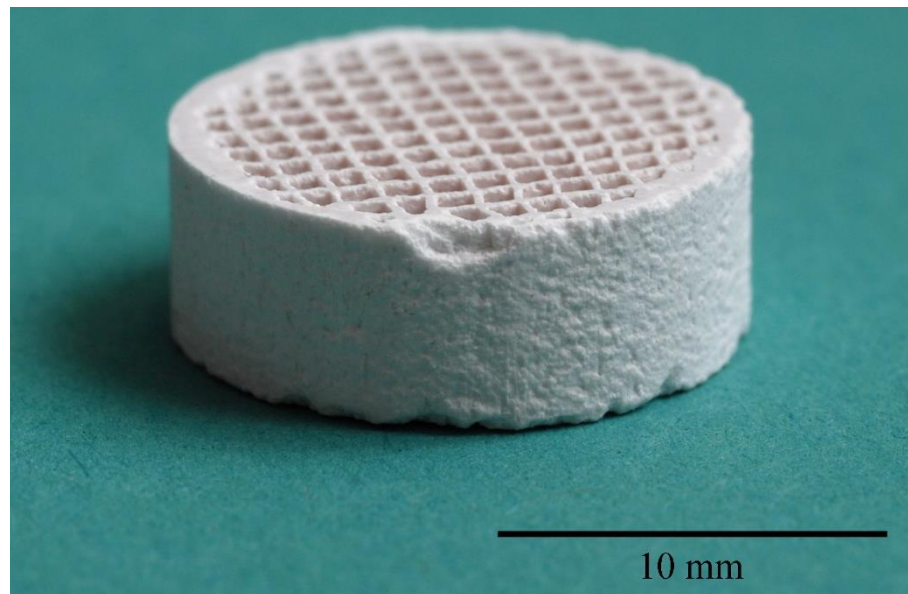


Figura 22 Ejemplo de andamio para regeneración ósea.⁴⁸

Una de las características básicas del andamio es el ser biocompatible con el medio receptor, además debe tener una estructura que asemeje a la matriz extracelular del tejido que se pretende regenerar, favoreciendo así una mejor aceptación por parte de las células, empiecen a proliferar y por ende se diferencien a una línea celular con relación al tejido en que se implantan. Las principales características físico-mecánicas que deben poseer estas estructuras se encaminan a tener una porosidad (pueden variar en forma y tamaño de los poros) que aumente la superficie de adhesión de las células, y a la vez que tengan una mejor interconexión entre ellas y el medio; también se ve favorecida la difusión de nutrientes y factores provenientes de la circulación sanguínea, propiciando la formación de nuevos vasos sanguíneos a través del andamio, asegurando su viabilidad así como de las células implantadas.^{8,9,45}

- **Tipos de andamios**

Existen varias formas de clasificar los andamios, tanto por forma de fabricación, estructura o material del que se componen; la clasificación más sencilla es por origen del polímero para la fabricación del andamio, dividiéndose en andamios sintéticos contra andamios naturales. Los andamios naturales se han realizado a base de materiales como fibrina, colágeno y gelatinas, las cuales presentan una interacción con las células favorable para la adhesión, la presencia de factores de crecimiento e incluso la posibilidad de ser degradados por medio de proteólisis; sin embargo presentan el inconveniente de ser materiales con poca resistencia mecánica, son más caros para su fabricación, generan inmunogenicidad en la mayoría de los casos, tienen un corto periodo de vida y pueden variar de un lote a otro. Por otra parte los andamios fabricados a partir de materiales sintéticos tienen una mínima inmunogenicidad en comparación y mejores propiedades

físicas; por lo tanto se busca la fabricación de andamios híbridos que conserven las ventajas de ambos como candidatos ideales para el cultivo de células.⁴⁶

El segundo punto de clasificación para los andamios es en base a sus técnicas de fabricación ya que de esto dependerá en parte el uso para el que se fabrican y las características específicas de cada andamio (formas, tamaños de los poros, forma de poros, interconexión, presencia de moléculas bioactivas, etc.)

- **Clasificación por fabricación**

La fabricación se ha generado a partir de polímeros reabsorbibles y compatibles con el organismo, además, para determinar que un andamio es aceptable, debe de propiciar el crecimiento óseo (osteoaductor). Las técnicas de fabricación van a depender de las propiedades de los polímeros a utilizar y de la aplicación que se le va a dar. Podemos clasificar a la fabricación de andamios en:

- ***Electrospinning***: se utiliza para la fabricación de andamios a base de un monofilamento continuo que tiene grosores desde los nanómetros hasta los submicrometros; el polímero va directamente a una jeringa con un capilar metálico que está conectado a un electrodo de alto voltaje; este voltaje genera un campo eléctrico que hace que el polímero viaje a través del mismo en una fina tira que se deposita en un colector especial; estos andamios se utilizan principalmente para regenerar piel, vasos sanguíneos, cartílago, hueso, músculo, ligamentos y nervios (figura 23).^{47,49}

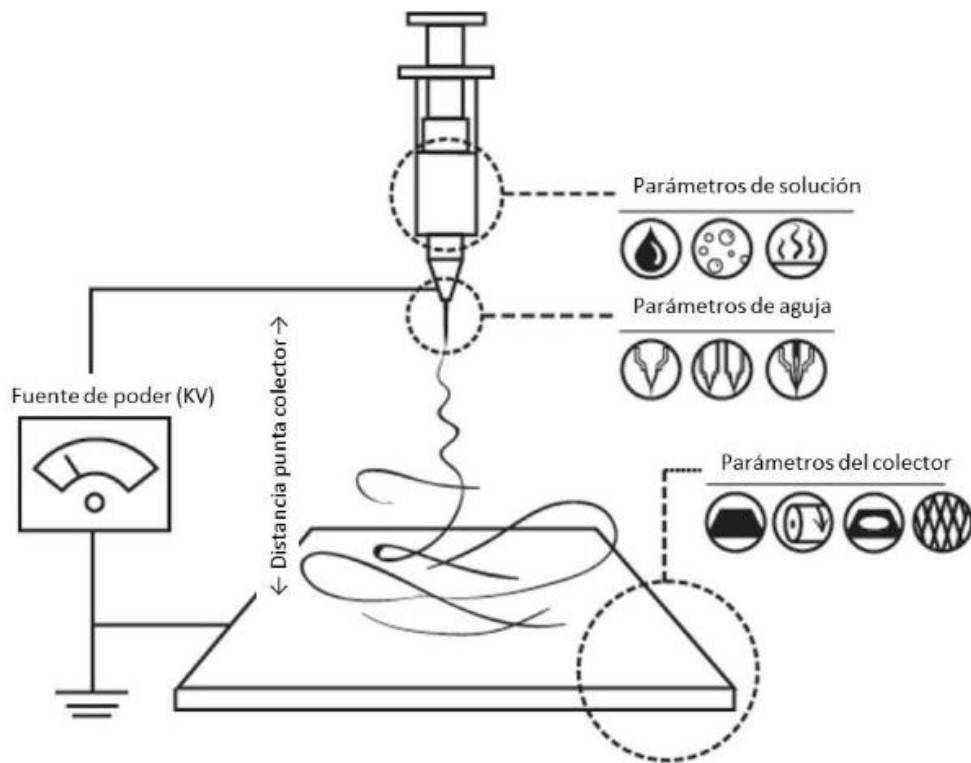


Figura 23 Esquema de máquina para realizar electrospinning.

- Disolución de solventes y filtración de partículas:** esta técnica es la ideal si se pretende realizar andamios con porosidades específicas (tamaños, forma), con diferentes rangos de superficie dependiendo de su volumen y utilidad. Básicamente es una técnica exclusiva del ácido poli-L-láctico (PLLA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), aunque se puede aplicar a cualquier polímero que sea soluble en cloroformo o clorhidrato de metilo. Para iniciar se debe generar una solución del polímero con el cloroformo en un contenedor hasta que las sales se precipiten; las partículas precipitadas en el contenedor se deben recuperar y secar por completo, estos cristales obtenidos son mezclas del polímero con sales y este compuesto genera una especie de membrana; para filtrar la sal del compuesto se deben embeber en agua las membranas, se debe secar por completo y con ello obtener un polímero libre de sal y altamente cristalino. Otra opción se presenta

al calentar el compuesto del polímero con la sal hasta la temperatura de ebullición del polímero, y dejar enfriar de manera controlada para realizar la pérdida de sales, dando como resultado membranas semicristalinas (figura 24).^{47,49}

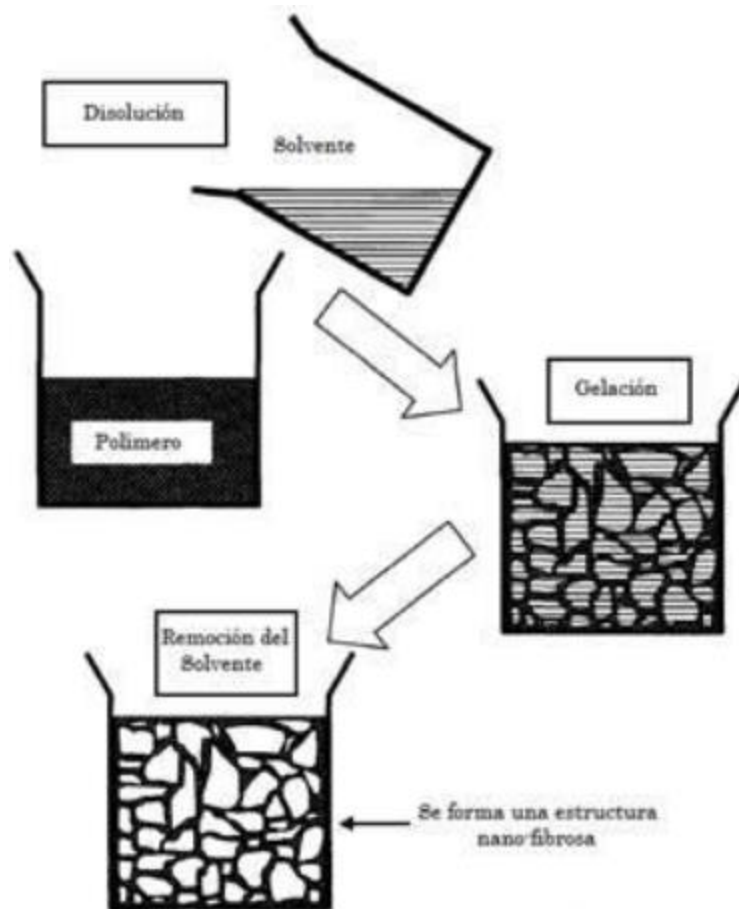


Figura 24 Ejemplificación del proceso de dilución y filtración de partículas.

- **Separación de la fase polimérica:** este método surge como medio de solución a la incorporación de fármacos, en específico moléculas bioactivas, que se incluían en los andamios y a la vez evitar la pérdida de función de estas moléculas al exponerse a altas temperaturas o a medios químicos (que se utilizan en los diferentes tipos de fabricación). Primero se debe realizar una disolución del polímero en un solvente a bajas temperaturas, después se agregara la molécula

bioactiva en la solución resultante hasta disolverla o dispersarse y se seguirá enfriando hasta generar una separación de fases liquido-sólido o liquido-liquido. Al seguir enfriando se logra obtener una separación del polímero y solvente en dos fases sólidas; por último se separa la fase del solvente por sublimación dejando así un andamio poroso con moléculas bioactivas incorporadas en el polímero. Se pueden alterar las concentraciones y tipos de polímeros y solventes a manera de crear andamios con porosidades diferentes.⁴⁷

- **Prototipo rápido:** hace referencia a la fabricación de andamios generados con “diseño asistido por computadora” (CAD) sin la necesidad de preparar moldes. Se realiza un diseño en computadora en tres dimensiones y se procede a hacer la fabricación de la estructura por capas con ayuda de una computadora que guía el proceso de fabricación a partir del diseño realizado; ejemplos de estos son los aparatos de esterolitografía o la manufactura de objetos por laminado (figura 25).^{47,49}

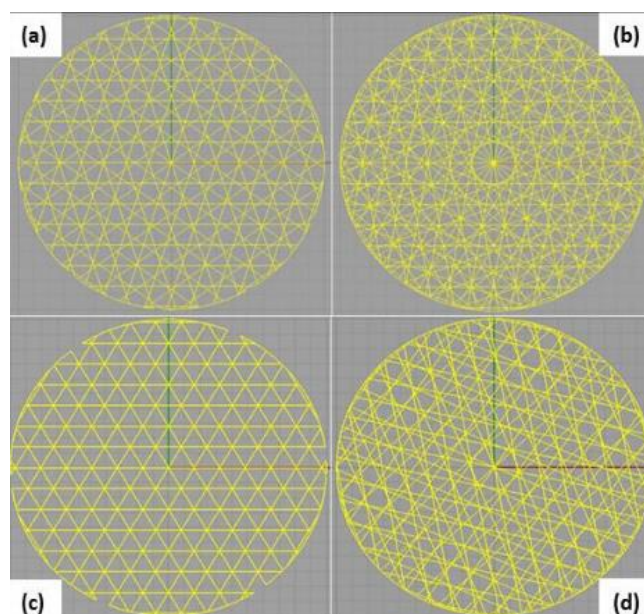


Figura 25 Ejemplos de diseño para prototipo rápido realizados con el software Rhinoceros®; cada diseño tiene una orientación diferente de sus fibras: (a) 36 °, (b) 40 °, (c) 56 ° (d) 120 °.

- **Espumas de compuestos polímero-cerámico:** este medio surge como alternativa de mejoramiento de los andamios de espuma ya que no contaban con una resistencia a la compresión óptima y esta se veía disminuida conforme aumentaba la porosidad. La fabricación se basa en la mezcla de hidroxiapatita (HA) a la solución de PLGA/dioxano, la mezcla es congelada por varias horas hasta inducir la separación de fases y se liofiliza para realizar la eliminación del solvente por sublimado; como resultado se obtiene una espuma con un esqueleto de polímero e HA mucho más resistente y con una morfología irregular en los poros. El tamaño, forma y estructura de los poros se puede modificar cambiando la concentración del polímero, la cantidad de HA, el tipo de solvente y la temperatura de separación de fases.⁴⁷
- **Modelado por fusión:** para este proceso se realiza la mezcla de polvo del polímero a utilizar con micro-esferas de gelatina y se vacían en moldes previamente fabricados; se deben de calentar hasta sobrepasar la fase vítrea del polímero, después se remueve del molde y es colocado en agua destilada-desionizada. La gelatina al ser soluble se pierde en este proceso dejando un andamio poroso con una forma idéntica a la del molde utilizado previamente. La porosidad puede ser manipulada dependiendo la cantidad de gelatina utilizada y el tamaño al cambiar el diámetro de las microesferas que se utilicen.⁴⁷
- **Presión de gas:** se ideó como una técnica que elimina la necesidad de solventes para la fabricación de los poros, utilizando gases para tal propósito. Para esta técnica se utilizan discos de polímero hechos a base de compresión y calentamiento; estos son expuestos a cámaras de CO₂ a alta presión por espacio de tres días. Al paso de este tiempo se disminuye la presión rápidamente hasta la presión atmosférica; los poros generados por esta técnica alcanzan hasta los 100 μm pero teniendo la desventaja de que no existe una conexión íntima de los

poros entre sí, en especial con los de la superficie, haciendo difícil la migración de las células a través del andamio.⁴⁷

- ***Técnica de congelamiento/liofilizado de emulsiones***: se utiliza para fabricar andamios con alta porosidad, además permite la incorporación de factores y/o proteínas de crecimiento durante el proceso. Se realiza a base de una emulsión homogenizada del polímero en solvente y agua en un recipiente el cual se congela rápidamente con ayuda de nitrógeno líquido para mantener la fase líquida y se liofiliza para remover el solvente y el agua; los poros de estos andamios oscilan entre los 15-35 μm de tamaño y con una amplia conexión entre ellos. Se ha demostrado que se pueden generar andamios duros y suaves a partir de esta técnica. La porosidad se puede modificar cambiando la concentración del polímero y los parámetros de liofilización.⁴⁷

- **Andamios para regeneración ósea**

Los andamios utilizados para la regeneración ósea deben poseer características que ayuden a la inducción y generación de tejido, por lo que deben ser biocompatibles en su totalidad para asegurar su integración al tejido óseo adyacente a la vez que evita la pérdida de más tejido, deben presentar un alto grado osteoconductor para facilitar la migración de las células, la adhesión y proliferación celular, además de generar una amplia interconexión de nuevos vasos sanguíneos a través de los poros del andamio para llevar nutrientes necesarios en la regeneración, debe ser osteoinductor esto gracias a la presencia de factores de crecimiento que ayudaran a la diferenciación de las MSC's que lleguen al andamio, debe ser osteogénico, es decir, debe favorecer la mineralización y calcificación de las matrices para formar hueso maduro, y por último debe presentar osteointegración al tejido nuevo que se está formando.^{47,50}

Por parte de la osteoinducción se utilizan moléculas bioactivas que generen este efecto con tal de mejorar la eficacia del andamio. Actualmente lo más utilizado para este fin son las cerámicas bioactivas, tales como el fosfato de calcio, HA y el β -fosfato tricalcico, o combinaciones de estos. Las células tienen cierta afinidad por adherirse a estas moléculas por lo cual aumenta también la síntesis de factores propios para la diferenciación, y al degradarse dejan en el medio una matriz rica en calcio y fosfatos que ayudan en la formación del hueso y la síntesis de nueva matriz extracelular.⁴⁶

Propiamente el andamio debe presentar una superficie que induzca a la adhesión celular, y esto se logra con la disposición de poros y moléculas bioactivas como se había mencionado anteriormente. Estos poros deben tener una anatomía de interconexión y forma que faciliten el desplazamiento de las células hacia la totalidad del andamio para asegurar la integración y la formación de hueso en todo el defecto. La porosidad a su vez jugara un papel importante en la resistencia del andamio a la compresión; el hueso como parte de un sistema vivo cuenta con respuestas específicas ante los estímulos de carga que se puedan presentar, por lo tanto el andamio debe asemejar de la mejor manera las propiedades mecánicas a la compresión que tiene el hueso adyacente.⁴⁷ Figura 26

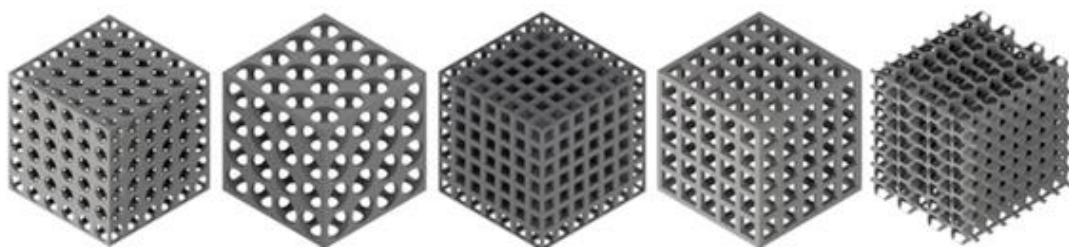


Figura 26 Diferentes tamaños y composición de poros en andamios.⁵¹

La composición del andamio debe presentar cierto grado de reabsorción que sea compatible con el rango de mineralización del nuevo hueso. Estos materiales poliméricos que conforman al andamio deben tener la capacidad

de ser esterilizables por diversos medios con el fin de evitar infecciones o respuestas inmunogenicas por parte del receptor, siendo la radiación gamma y la radiación UV las más aceptables para este proceso.⁴⁷

3.4 Células troncales

El último punto de la ingeniería de tejidos está enfocado hacia el potencial de las MSC's, generadoras de una progenie celular apta para regenerar y recuperar tejidos perdidos. Existen dos tipos de células troncales que son las pluripotenciales (células mesenquimales embrionarias o ESC's) y las multipotenciales (células troncales mesenquimatosas adultas o MSC's) y se encuentran distribuidas en diferentes tejidos. Ambos tipos tienen la cualidad de poder diferenciarse a tipos celulares diferentes, es decir, tienen la cualidad de especializarse y cumplir una función nueva, de ahí su importancia en el campo de la ingeniería de tejidos; de igual manera presentan un alto grado de auto renovación por lo cual puede ser considerada como una fuente inagotable de recursos.^{8,17,30,45,52,53} Figura 27

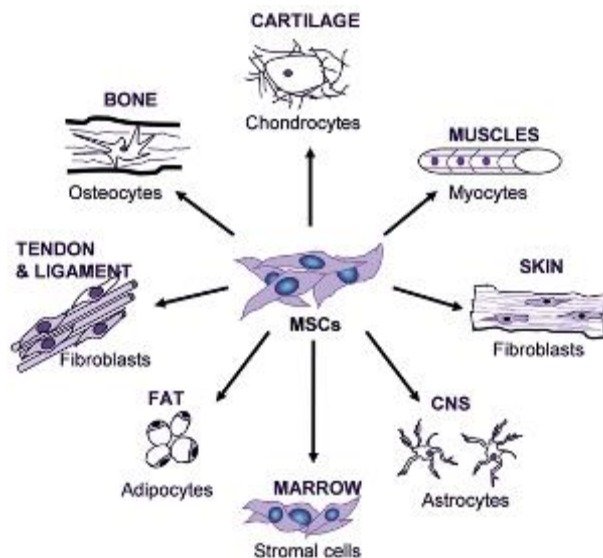


Figura 27 Las células troncales son capaces de diferenciarse a diferentes líneas celulares.⁵⁴

Las células troncales embrionarias, al ser pluripotenciales, pueden diferenciarse a cualquier línea celular presente en el cuerpo, esto basándose en la capacidad que tienen para diferenciarse en los tejidos y órganos que componen al cuerpo humano, sin embargo presenta una amplia cuestión ética y legal para su uso en investigación, lo cual las descarta como opción en este campo, por el momento. Por su parte las MSC's han sido estudiadas para su aplicación en la regeneración de tejidos, sobre todo en el ámbito odontológico, esto gracias a la capacidad que han mostrado para regenerar tejidos óseos, pulpaes e incluso periodontales. Entre los estudios relacionados a la aplicación de MSC's se ha encontrado que favorece o propicia ciertas condiciones en las áreas en que se implantan tales como:

- La inhibición de la respuesta inflamatoria,
- Prevención de la formación de tejidos fibrosos,
- Reducción en la apoptosis,
- Angiogénesis, y
- La formación por estimulación de los tejidos (regeneración).^{8,9,17,30,52}

Las MSC's se obtienen principalmente de la medula ósea, ya que fue de los primeros sitios en que se detectó la presencia de las mismas; hoy en día se puede incluso decir que estas células se encuentran en todo el cuerpo. Por su parte las células cultivadas a partir de la medula ósea presentan una amplia capacidad para generar osteoblastos y condroblastos, razón por la cual se sigue tomando como primera vía de elección para la regeneración ósea. Aun así cabe destacar que las MSC's tomadas de otros tejidos, como el tejido adiposo, cuentan con una amplia capacidad de diferenciación bajo las condiciones adecuadas (tipo de cultivo, medios enriquecidos, factores agregados, etc.) por lo que se sigue ampliando los horizontes de aislamiento y cultivo de células.^{8,17,30,52} Figura 28

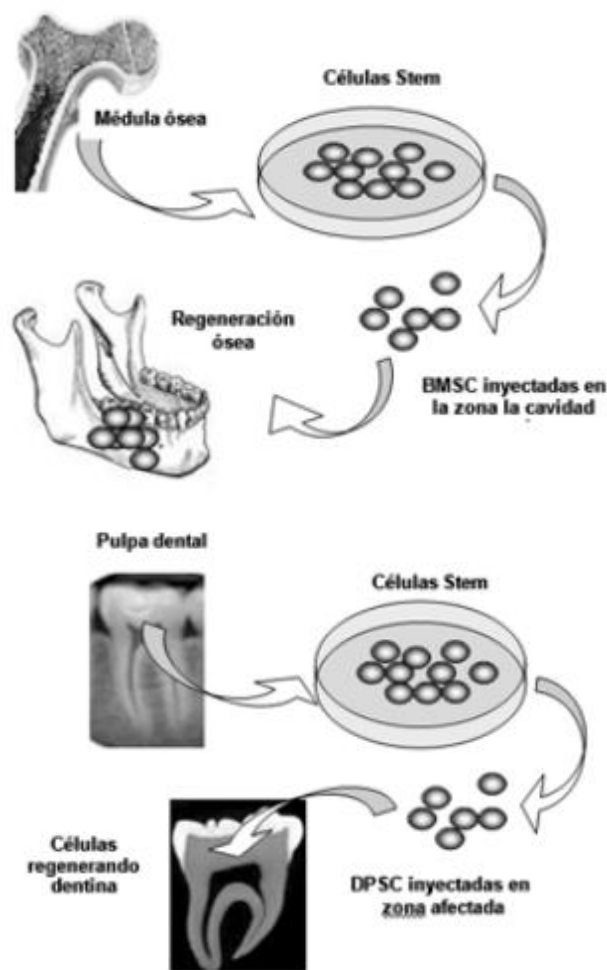


Figura 28 Aislamiento de MSC's de la medula ósea y de la pulpa dental para su aplicación en regeneración de tejidos.⁵⁵

La capacidad de diferenciación de las MSC's tomadas de la medula ósea se puede entonces englobar o relacionar directamente a la cantidad de proteínas morfogenicas óseas (BMP) que contiene; estas proteínas generan un estímulo osteogénico en las células, propiciando la expresión de factores necesarios para la diferenciación a las líneas celulares propias del hueso y para la formación de hueso propiamente. Con este conocimiento se deduce que la formación y estructura de la matriz extracelular contara como una parte importante en la movilización, adhesión, proliferación y diferenciación de las MSC's, ya que contiene un medio adecuado, lleno de proteínas de

señalización, factores quimiotácticos y factores de crecimiento necesarios para la regeneración del tejido.^{24,30,46} Figura 29

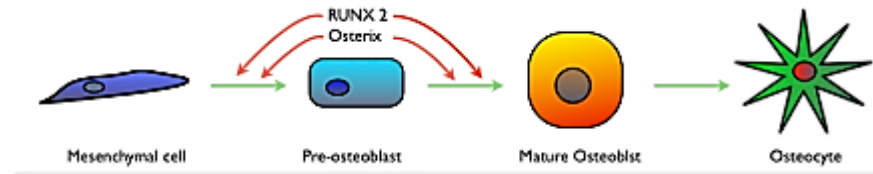


Figura 29 Proceso de diferenciación MSC's en la regeneración ósea.⁷

3.4.1 Células troncales mesenquimales derivadas de pulpa

Como se mencionó anteriormente existen diferentes MSC's en el cuerpo, y cada vez se determinan más tipos. En los tejidos propios de la boca se ha comenzado a realizar estudios con las células localizadas a partir de dientes deciduos y permanentes; en la actualidad se han determinado la presencia de cinco tipos de MSC's aisladas de los tejidos dentales:

- Células troncales de la pulpa dental (DPSC, siglas en inglés) obtenidas de la pulpa dental de los dientes permanentes
- Células troncales de dientes humanos exfoliados (SHED) y células troncales dentales inmaduras (IDPSC) obtenidas de dientes deciduos
- Células troncales del ligamento periodontal (PDLSC)
- Células troncales de la papila apical (SCAP)
- Células progenitoras del folículo dental (DFPC) (figura 30).⁵⁶

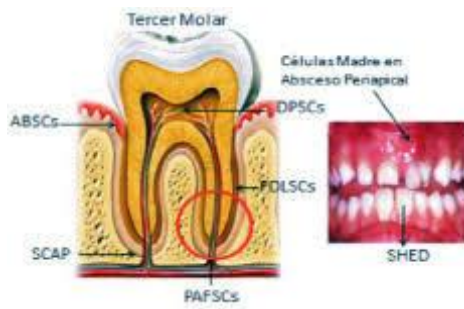


Figura 30 Células troncales derivadas de tejidos dentales.

De los cuales las DPSC son de vital interés para la regeneración de hueso gracias a que se ha demostrado tienen la capacidad de diferenciarse en células similares a los osteoblastos, condroblastos, odontoblastos y a células endoteliales, lo cual genera una gran ventaja al inducir también a la formación de una nueva red de vasos sanguíneos a través del andamio.^{5,9}

Figura 31

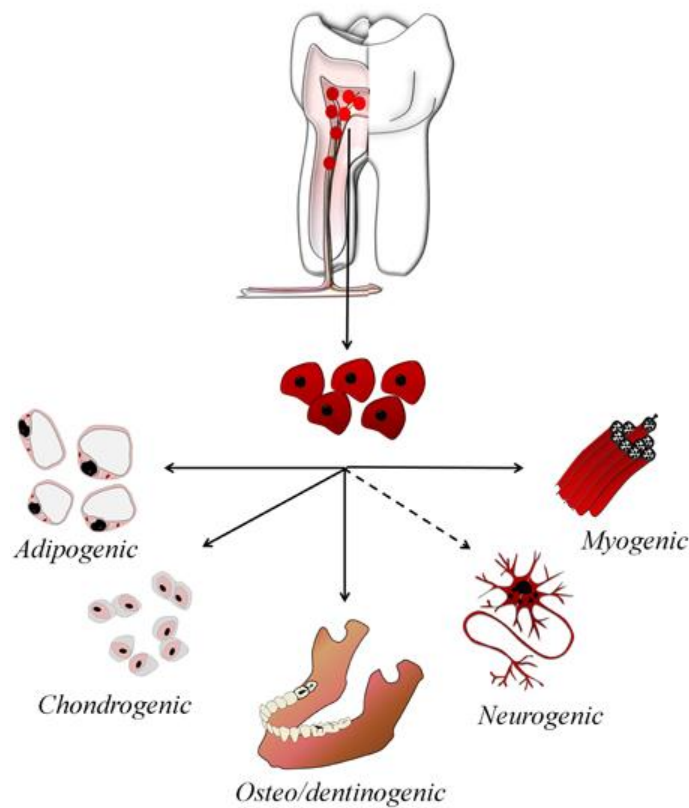


Figura 31 Vías principales de diferenciación de las DPSC's.⁵⁷

La aplicación de estas células troncales actualmente se encuentra limitada a estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, y en ambos casos ha mostrado una amplia predictibilidad en el éxito de los tratamientos, aunque la cantidad de estudios y evidencia son pocos.⁵

En la mayoría de los casos se ha demostrado que la aplicación de DPSC en zonas de lesión ósea genera una respuesta osteoinductiva (aumenta la cantidad de BMP en la zona de lesión) bastante aceptable además de generar una especie de sinergismo al combinarse con cerámicas bioactivas como la HA o el fosfato tricalcico. En pruebas clínicas en modelos animales ha demostrado tener la capacidad de generar tejido óseo con apariencias histológicas similares a las del tejido adyacente en tiempos relativamente cortos.^{5,30}

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El campo de la ingeniería de tejidos en la actualidad está creciendo a pasos agigantados, y por ende, comienza a ganar mucha confianza por parte de los investigadores por la amplia aceptación que tiene en las ramas medicas; sabemos entonces que la aplicación de estos conocimientos en el ámbito de la regeneración de tejidos es prometedor, y por lo mismo es el más estudiado.

Se conoce ya sobre el uso de diferentes tipos de andamios para la regeneración ósea, modificados por la forma de fabricación o la concentración de los materiales con que se fabrican; la interrogante comienza al no tener todavía un material totalmente reabsorbible por el cuerpo, lo cual ha encaminado el estudio al mejoramiento de los andamios para generar una mejor inducción del crecimiento al tiempo que se reabsorbe y se sustituye por tejido sano.

Se pretende entonces que al generar andamios con diferentes concentraciones de alginato e hidroxiapatita, además de variar el medio de fabricación, se pueda alterar las propiedades y compatibilidad hasta lograr los estándares deseados.

La mineralización es la parte clave para la formación de un tejido óseo maduro, es por esto que la determinación de si una célula capaz de diferenciarse en osteoblasto es capaz de inducir la formación de cristales en andamios de Alginato y Alginato/HA.

V. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el uso de injertos óseos no ha logrado un 100 % de regeneración en las sitios de lesión, por tal motivo la bioingeniería de tejidos continua con el estudio de nuevas alternativas en la fabricación de andamios para ser empleados en terapias de regeneración para lo cual es indispensable realizar pruebas *in vitro* para dilucidar su efecto y poder continuar en un futuro con pruebas *in vivo*.

El presente estudio pretende determinar si existe formación de cristales de calcio en andamios fabricados a partir de Alginato y Alginato/HA con tal de valorar que concentración de HA es la más adecuada para su fabricación y a su vez determinar la cantidad de estos depósitos por medio de lecturas de absorbancia en diferentes muestras tratadas con células troncales derivadas de pulpa dental al someterlas a la técnica de tinción con alizarina roja.

VI. HIPÓTESIS

Andamios de alginato con concentraciones diferentes de hidroxiapatita (30, 40 y 50 %), formarán cristales de calcio dependiendo de su concentración al colocar células troncales derivadas de pulpa dental.

VII. OBJETIVOS

7.1 General

- Evaluar la formación de cristales en andamios de Alginato/HA tratados con células troncales derivados de la pulpa dental.

7.2 Específicos

- Determinar si existe formación de cristales de calcio en los andamios de ALG y ALG/HA en pruebas *in vitro*.
- Valorar que concentración de HA es la que genera una mayor respuesta.
- Evaluar la formación de cristales de calcio con ayuda de alizarina roja por técnicas visuales (microscopia).
- Evaluar la absorbancia que generan las diferentes muestras al teñir con alizarina roja.

VIII. MATERIALES

A continuación se enlistan todos los recursos que se utilizaron:

- Recursos Humanos
 - Personal del departamento de Bioingeniería de tejidos del DPeI UNAM
 - Dra. Janet Serrano Bello (Tutora)
 - Luis Enrique Gress Ortiz (Tesista)
- Instrumental
 - Micro pipetas
 - Microscopio óptico Amscope
 - Oscilador Premier
 - Tubos ependorf
 - Incubadoras de muestras (Aosheng y Clever)
 - Centrifuga Spectrafuge Labnet
 - Lector de absorbancia Chromate
- Insumos
 - 9 andamios de alginato, 9 de alginato/HA al 30%, 9 de alginato/HA al 40% y 9 de alginato/HA al 50%
 - Agua bidestilada
 - Alizarina Roja 40mM
 - Ácido Acético al 10%
 - Hidróxido de amonio al 10%
 - Solución estándar
 - Cajas de cultivo de 48 y 96 pozos
 - Portaobjetos
 - Hielo

IX. METODOLOGÍA

El estudio que se realizó fue experimental, longitudinal, en el laboratorio de Bioingeniería de tejidos del Departamento de Posgrado e Investigación (DPeI) de la Facultad de Odontología de la UNAM en ciudad universitaria. Se pretendió determinar la formación de cristales en un total de 36 andamios fabricados a partir de Alginato (9 andamios) y Alginato/HA (27 andamios) con diferentes concentración de HA (30,40 y 50%, un total de 9 andamios de cada concentración), todos ellos tratados con células troncales derivadas de la pulpa dental, los cuales se mantuvieron en cultivo por un tiempo de 21 días, las células se fijaron a los andamios con glutaraldehído al 2% (figura 32).

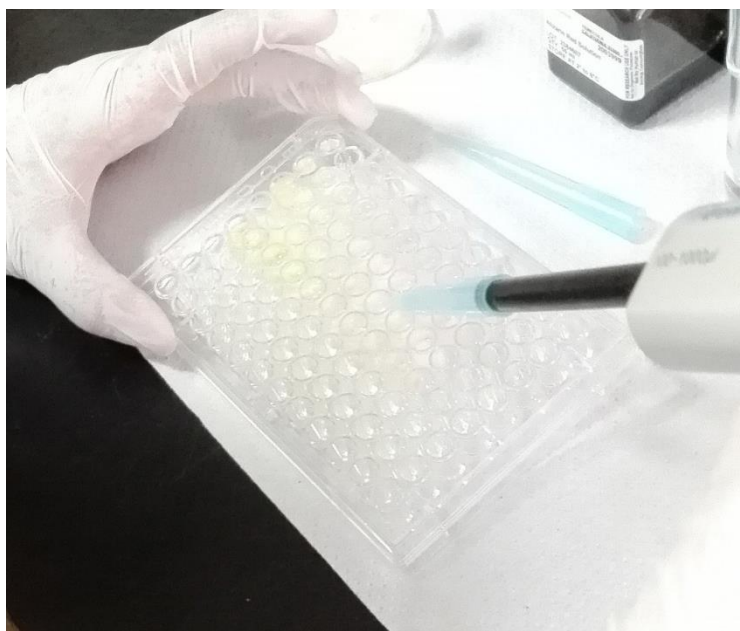


Figura 32 Fijación de las muestras con glutaraldehído. F.D.

Los andamios se lavaron con 200µl de agua bidestilada, por triplicado en cada uno de los andamios dispuestos en una rejilla de cultivo de 96 pozos. Posterior a esto se extrajo el total del agua bidestilada en cada pozo y se

procedió a realizar la tinción con Alizarina Roja S 40 mM (mili-molar) agregando 150µl por pozo, se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (figura 33).

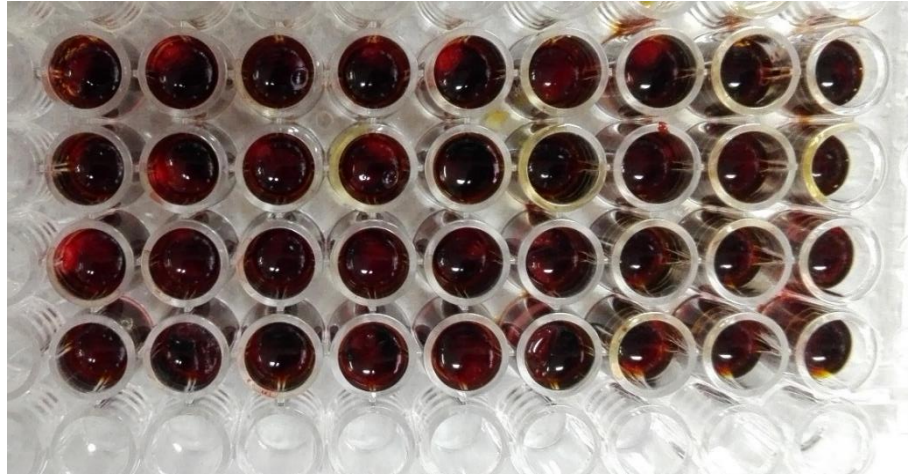


Figura 33 Tinción con alizarina roja. F.D.

Pasado el tiempo de incubación se cambiaron los andamios a una caja de cultivo de 48 pozos para realizar el lavado de los andamios con 250µl de agua bidestilada cinco veces por pozo hasta eliminar por completo el exceso de la tinción de alizarina roja. Se extrajo el agua de cada uno de los pozos y se realizó la valoración en un microscopio óptico, para observar la presencia de puntos rojos.

Posterior a la observación se procedió a fijación de la tinción agregando 200µl de ácido acético al 10% en cada pozo dejándose incubar a temperatura ambiente bajo movimiento constante con ayuda de un oscilador por espacio de 30 minutos (figura 34).



Figura 34 Plato de cultivo con las muestras en un Oscilador Premier. F.D.

Terminando el tiempo establecido se tomaron 300µl del sobrenadante de cada muestra en tubos ependorf de 1.5 ml, se rotularon según la concentración y se llevaron a una incubadora de muestras donde se mantuvieron por espacio de 10 minutos a una temperatura constante de 85°C, terminando el proceso de calentamiento se colocaron sobre hielo por 5 minutos para terminar de incubar (figura 35).

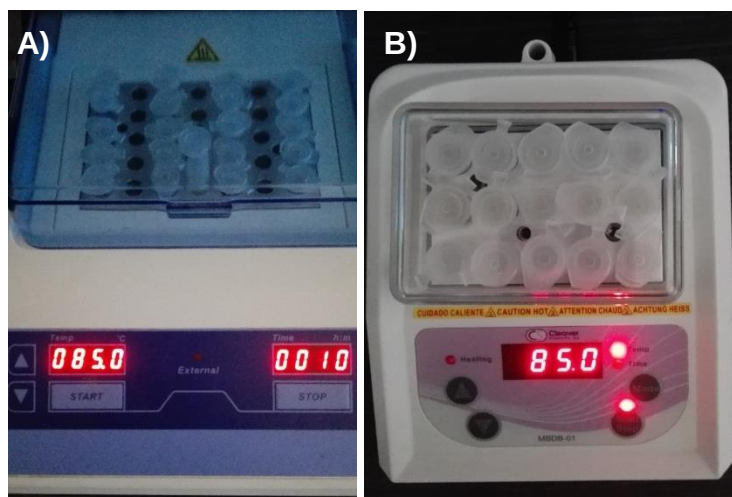


Figura 35 Muestras en incubadoras a 85°C, A) Incubadora Clever®, B) Incubadora Aosheng®. F.D.

Con los tubos ya fríos se llevaron a una centrifuga Spectrafuge y se centrifugaron a 163,000 revoluciones por un tiempo de 15 minutos, esto con la finalidad de precipitar las sales que pudieran acarrear durante el proceso. Con las muestras centrifugadas se tomaron 200µl del sobrenadante y se dispusieron en nuevos tubos ependorf, donde se adicionaron 75µl de hidróxido de amonio al 10% para neutralizar el ácido acético (figura 36).



Figura 36 A) Acomodo de las muestras en la centrifugadora, B) programación para 16,300 rpm por 15 minutos. F.D.

Ya teniendo mezclados el hidróxido de amonio con nuestra muestra se observó un cambio en el color a tonos ligeramente rosas hasta casi rojos, del cual tomamos un total de 150µl de cada muestra y se dispuso en una caja de 96 pozos para su lectura a una absorbancia de 405 nm, de igual manera se agregaron dos blancos con el mismo hidróxido de amonio para hacer la comparativa de absorbancia del compuesto por sí solo (figura 37).

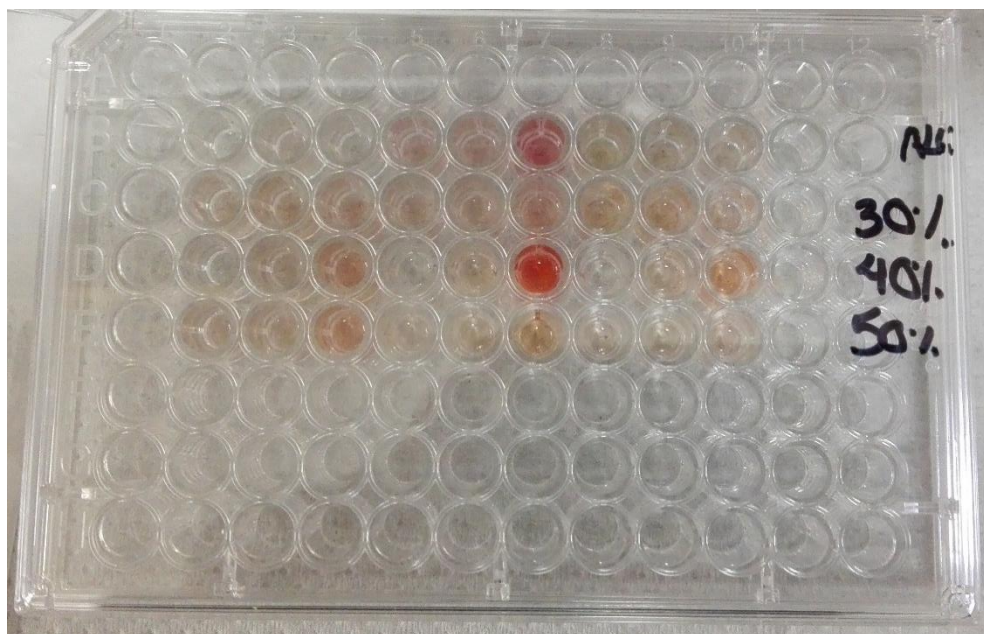


Figura 37 Muestras neutralizadas con hidróxido de amonio al 10 % y dispuestas en una placa de lectura de 96 pozos. ^{F.D.}

El resultado obtenido por medio del lector se graficó con ayuda del programa Excel de Windows; para realizar la comparativa de las concentraciones de alizarina en cada una de las muestras se realizó una guía con diferentes concentraciones de alizarina roja.

Para realzar la curva de concentración de alizarina roja se procedió de la siguiente manera:

- Se preparó una solución de 100µl de alizarina roja 40mM en 900µl de solución estándar para crear 1mL de alizarina roja 4mM (figura 38).

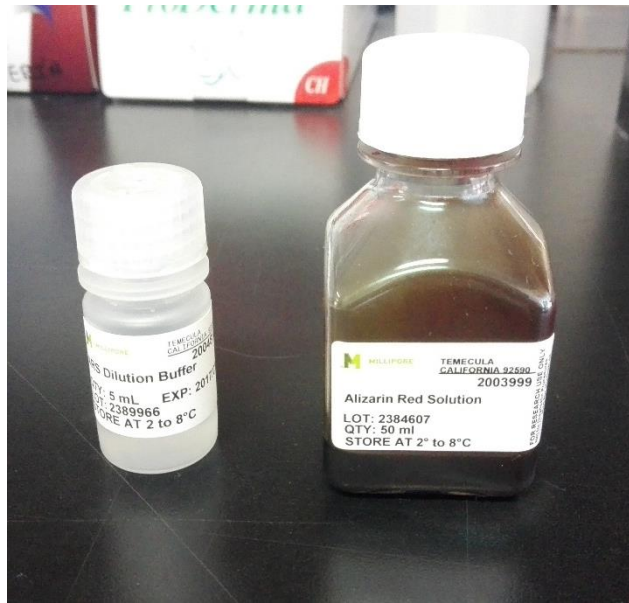


Figura 38 Alizarina Roja 40 mM y solución estándar. F.D.

- En 8 tubos ependorf se agregaron 500µl de solución estándar y se rotularon del 1 al 8.
- Se agregaron 500µl de alizarina roja 4mM dentro del tubo #1 para obtener una solución de alizarina roja 2mM.
- Se transfirieron 500µl de alizarina roja 2mM del tubo #1 al tubo #2 para obtener una solución de alizarina roja 1mM.
- Este último paso se repitió para los tubos #3-7 para generar soluciones seriadas de alizarina roja (figura 39).

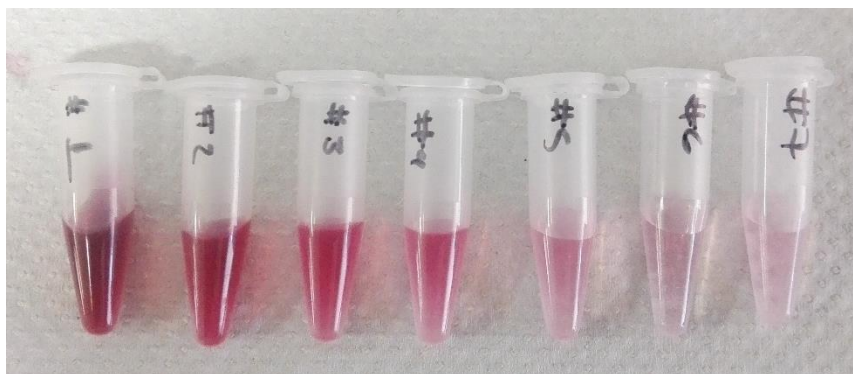


Figura 39 Diluciones seriadas de alizarina roja. F.D.

- El tubo #8 se mantuvo intacto para tener nuestro blanco al momento de realizar la lectura.
- En un plato para lectura de 96 pozos se dispusieron por duplicado 150µl por pozo de cada una de las concentraciones de alizarina que generamos (figura 40).

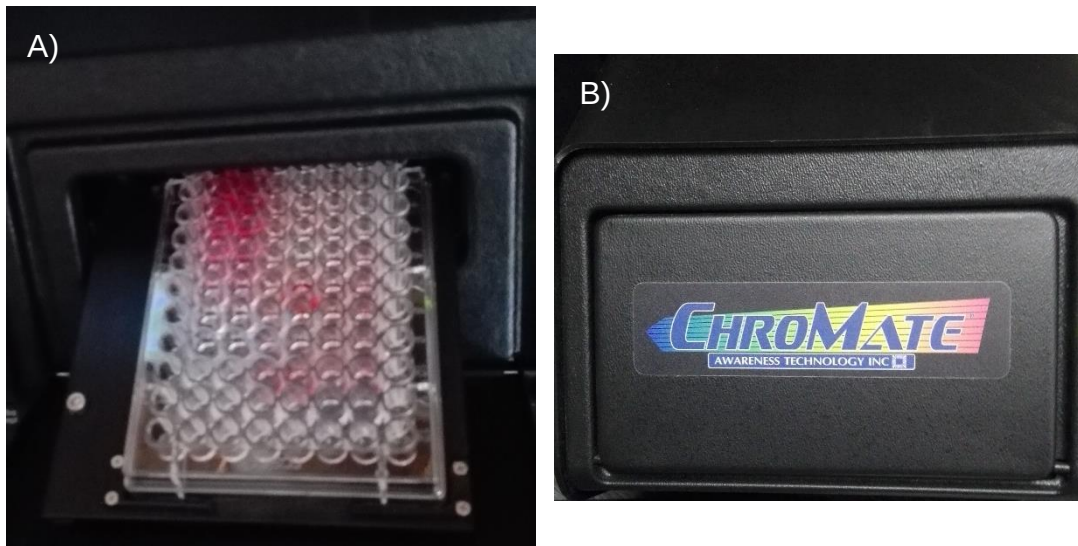


Figura 40 A) Lectura de absorbancia de las muestras, B) Lector marca ChroMate®. F.D.

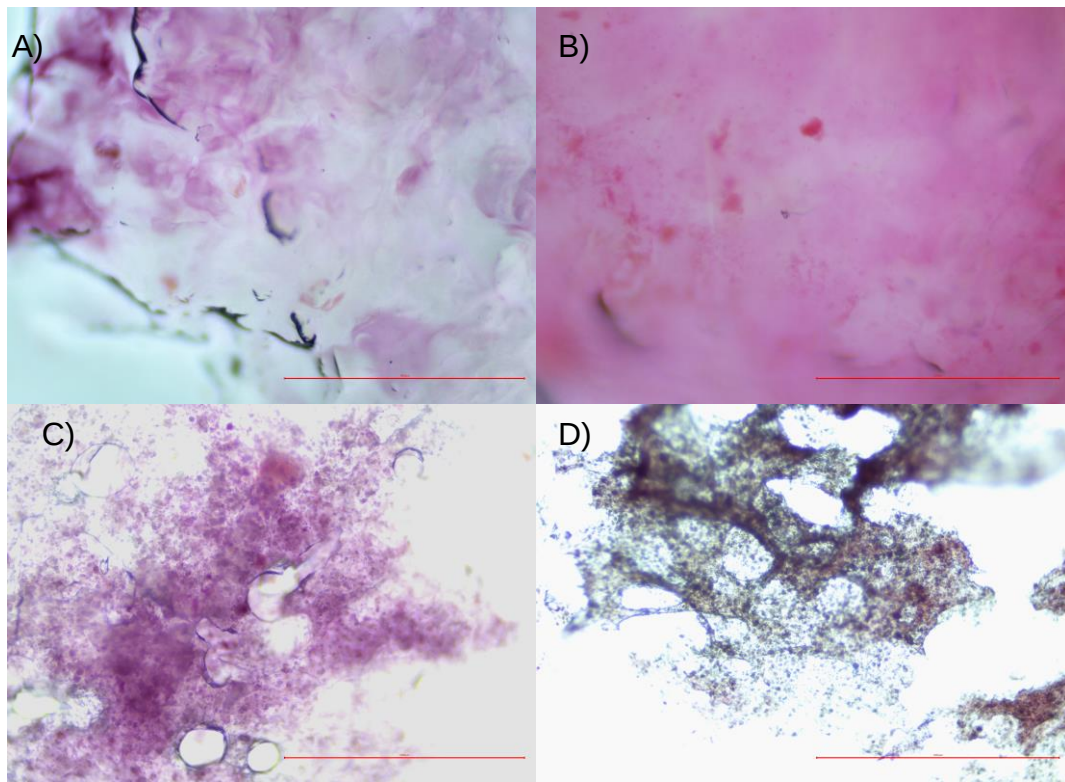
- Con los datos de absorbancia obtenidos se generó un promedio para cada concentración de alizarina y generamos una curva con respecto a la absorbancia en relación a la concentración.
- Por último graficamos y obtuvimos una curva con la cual se pueden comparar las muestras obtenida.

X. RESULTADOS

Tinción de las muestras.

Las muestras de los andamios fueron teñidas y procesadas para su lectura en un lector de absorbancia CroMate[®] a una longitud de onda de 405 nm. Se empleó de igual manera un blanco con los reactivos utilizados para eliminar la posibilidad de un falso positivo. En comparación todos los andamios, sin importar su porcentaje de HA, presentaron una respuesta positiva a la tinción, por lo que todos sin excepción formaron cristales.

Se puede observar a simple vista la presencia de puntos rojos en las muestras, por lo que se eligieron aquellas que presentaron una coloración más intensa para su observación al microscopio, para esto los andamios se transportaron a portaobjetos y se buscaron las zonas con mayor cantidad de puntos de Alizarina Roja (figura 41).



Figuras 41 Fotomicrografías a 10x de acercamiento donde se distinguen los puntos de formación de cristal; A) andamio de alginato puro; B) Andamio de alginato/HA al 30%; C) Andamio de alginato/HA 40%; D) Andamio alginato/HA 50 %. F.D.

Aquí se apreció que en efecto existe una inducción para la formación de cristales de calcio en los andamios tratados con células troncales derivadas de la pulpa dental, siendo los andamios con concentraciones del 40% de HA los que presentaron una mayor cantidad de puntilleo a la tinción.

Concentraciones de alizarina

Las absorbancias de cada uno de los andamios se compararon con la curva de alizarina que se realizó a diferentes concentraciones mili-Molar (mM) de la misma. Esta curva representa la concentración de alizarina que presenta una

muestra en relación a la absorbancia obtenida en cada una de las muestras, la curva es la siguiente (figura 42).

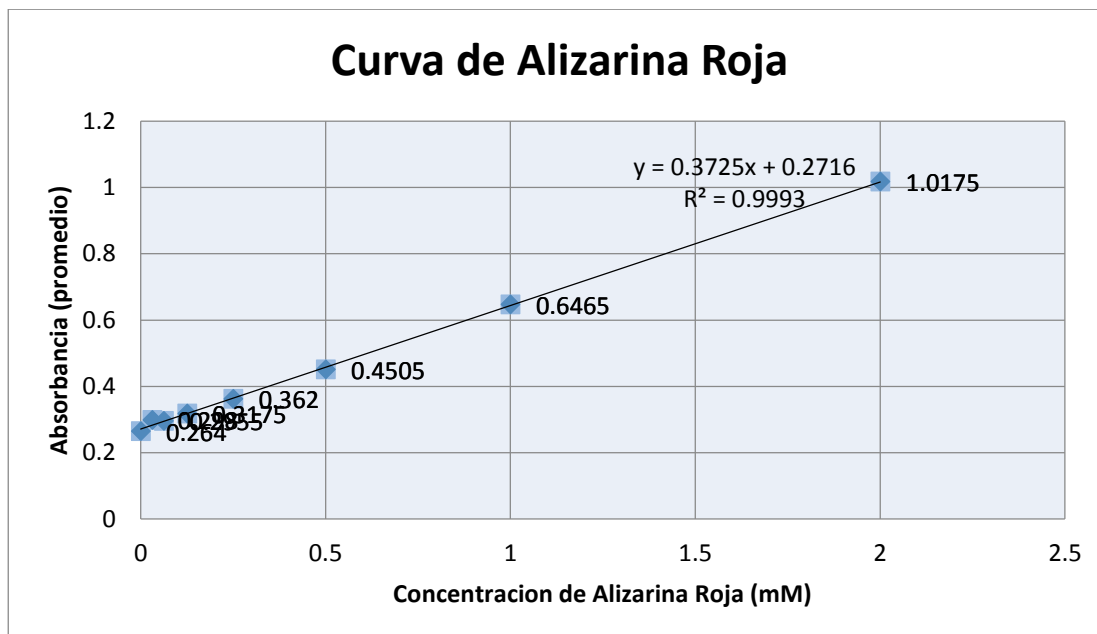


Figura 42 Curva estándar de alizarina roja. F.D.

En la figura 42 se observa una gráfica de dispersión con los valores de absorbancia en el eje de las “Y” y la concentración de alizarina en mM en el eje de las “X”, donde se sacó la ecuación de la recta.

Con la relación obtenida a partir de la curva se obtuvieron los valores de concentración de cada una de las muestras procesadas y se graficaron en grupos según el porcentaje de HA de cada andamio. Los valores obtenidos para los andamios fueron; Alginato $0.396932222 \pm 0.01468871$ mM; Alginato/HA 30% $0.403802778 \pm 0.01063384$ mM; Alginato/HA 40% $0.413215278 \pm 0.05182095$ mM; y Alginato/HA 50% $0.409141944 \pm 0.01630205$ mM. Como se puede observar en la gráfica la mayor dispersión de datos se dio en los andamios con una concentración de HA de 40% (figura 43).

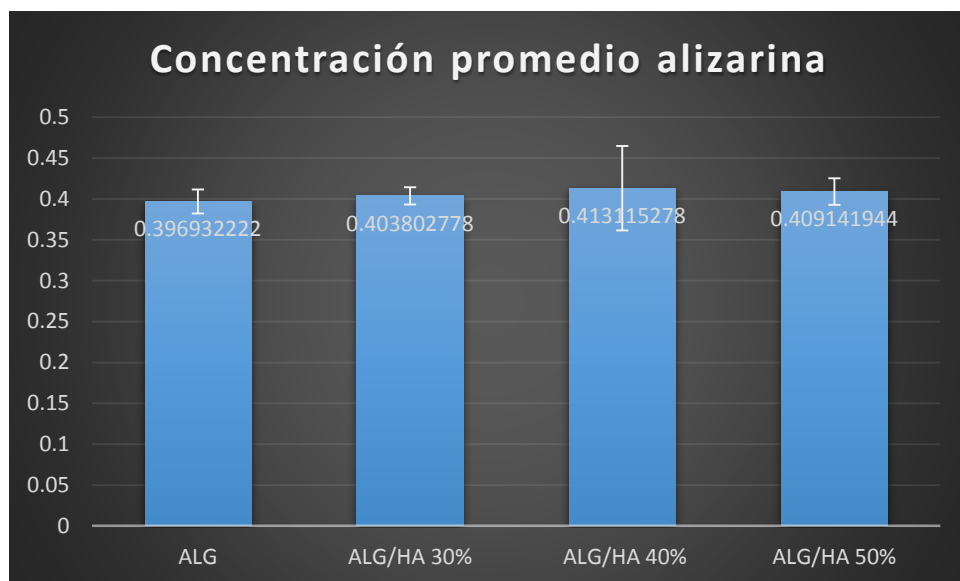


Figura 43 Gráfica de la concentración de alizarina de las diferentes muestras. F.D.

XI. DISCUSIÓN

Las células troncales derivadas de pulpa dental son un descubrimiento relativamente nuevo y por lo mismo sigue brindando muchos datos y expectativas para su uso en regeneración. Las pruebas de tinción con alizarina han demostrado que estas células presentan un gran potencial para la formación de matrices de calcio, esto al ser implantadas en andamios e inclusive por si solas. De Colli, Marianna *et al* muestra en su estudio con placas de titanio tratadas por arenado ácido a las que además se les adiciona una capa de CaMg y con células troncales derivadas de pulpa dental, que existe una formación de cristales notoriamente mayor, en comparación con su muestra control, después de los 28 días de cultivo, por lo que concuerda con nuestro trabajo al probar que existe una formación de cristales al estar en contacto las DPSC's.

Por su parte los estudios realizados con las diferentes células troncales aisladas de los tejidos bucales han demostrado tener también un alto potencial generador de cristales. La mayor parte de los estudios para formación de tejido óseo, se han enfocado en la aplicación de las células troncales del ligamento periodontal y de la papila apical, pero todos demuestran una importante constante, que son las superficies de HA o de materiales biocerámicos, razón por la cual concuerdan todos los estudios en que existe una inducción de las células para la formación de depósitos de calcio a manera de cristales, concordando en los 21 días de cultivo como un mínimo para que se comience dicho proceso.

Además de las DPSC's, las células troncales derivadas del ligamento periodontal han comprobado tener una capacidad inductora similar al estar en contacto con HA, como lo demuestra Tanriratanawong, Kallapat *et al* en su investigación. Por lo tanto es prudente decir que las células obtenidas de

los tejidos dentales tienen un amplio potencial para generar tejidos óseos en las condiciones adecuadas.

Existe una amplia relación de sinergismo por parte de las DPSC's al estar en contacto con biocerámicas, ayudando a la diferenciación hacia osteoblastos y odontoblastos y brindando a su vez la materia prima necesaria para la formación de nuevos tejidos.

XII. CONCLUSIONES

Podemos determinar que no existe una mayor inducción a formación de cristales al aumentar la cantidad de HA en los andamios, ya que no se observó una diferencia considerable entre la concentración de alizarina entre las diferentes muestras. No obstante se puede concluir que las células troncales derivadas de la pulpa dental producen mineralización de la matriz cálcica y de fosfatos provenientes de la HA del andamio, por ende, estas células troncales tienden a diferenciarse al estar expuestos a medios con matrices con calcio.

Entre los valores observados de las concentraciones individuales de alizarina en cada uno de los andamios, se destacan los valores de los andamios con concentraciones del 40% de HA, aunque en promedio es relativamente parecida al resto de las muestras. Por lo tanto determinamos que es necesaria una mayor cantidad de muestras en futuros experimentos para poder determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liao X, Lu S, Zhuo Y, et al. Bone physiology, biomaterial and the effect of mechanical/physical microenvironment on mesenchymal stem cell osteogenesis. *Cell Mol Bioeng.* 2011;4(4):579-590. doi:10.1007/s12195-011-0204-9
2. Wong D. Manejo de injerto óseo alveolar: preparar a los pacientes para el éxito. Biohorizon. <http://es.biohorizons.com/socket-grafting-management-setting-patients-up-for-success.aspx>. Accessed March 14, 2019.
3. Tarchala M, Engel V, Barralet J, Harvey EJ. A pilot study: Alternative biomaterials in critical sized bone defect treatment. *Inj Int J care Inj.* 2018;49:523-531. doi:10.1016/j.injury.2017.11.007
4. Zircon Prior. Implantes dentales. Injerto oseo - Implantes dentales Zircon-prior. <http://es.zircon-prior.com/injerto-oseo.html>. Accessed March 15, 2019.
5. Ortiz-Magdaleno DDS M, Isabel Romo-Tobías DDS A, Romo-Ramírez DDS F, María Escobar DDS D, Flores-Reyes DDS H, Pozos-Guillén DDS A. Behavior of Mesenchymal Stem Cells Obtained From Dental Tissues: A Review of the Literature Comportamiento de células mesenquimales obtenidas de tejidos dentales: Revisión de literatura. *Rev Lit J Dent Sc.* 21(1):31-40. doi:10.15517/ijds.v0i0.34884
6. MUBESA. Robert Langer y Joseph Vacanti. https://twitter.com/mubesa_muk/status/978991996709851136. Accessed March 15, 2019.
7. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: A review of Old concepts with New standards. *J Dent Res.* 2012;91(8):736-744. doi:10.1177/0022034511435260
8. Nassif L, Sabban M El. Mesenchymal Stem Cells in Combination with Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel).* 2011;4:1793-1804. doi:10.3390/ma4101793
9. Flavio Fernando, Demarco; Marcus Cristian, Conde; Neves Cavalcanti, Bruno; Casagrande, Luciano; Sakai VNJ. Dental Pulp Tissue Engineering. *Braz Dent J.* 2011;22(1):3-14.
10. DE COLLI M, RADUNOVIC M, ZIZZARI VL, et al. Osteoblastic differentiating potential of dental pulp stem cells *in vitro* cultured on a chemically modified microrough titanium surface. *Dent Mater J.* 2018;37(2):197-205. doi:10.4012/dmj.2016-418
11. Miller AA, Takimoto K, Wealleans J, Diogenes A. Effect of 3 Bioceramic Materials on Stem Cells of the Apical Papilla Proliferation and Differentiation Using a Dentin Disk Model. *J Endod.* 2018;44(4):599-

603. doi:10.1016/j.joen.2017.12.018
12. Tanriratanawong K, Wongwan P, Ishikawa H, Nakahara T, Wongravee K. Cellular responses of periodontal ligament stem cells to a novel synthesized form of calcium hydrogen phosphate with a hydroxyapatite-like surface for periodontal tissue engineering. *J Oral Sci.* 2018;60(3):428-437.
 13. Wongwatanasanti N, Jantararat J, Sritanaudomchai H, Hargreaves KM. Effect of Bioceramic Materials on Proliferation and Odontoblast Differentiation of Human Stem Cells from the Apical Papilla. *J Endod.* 2018;44(8):1270-1275. doi:10.1016/j.joen.2018.03.014
 14. TAKECHI M, OHTA K, Yoshiaki N, et al. 3-dimensional composite scaffolds consisting of apatite-PLGA-atelocollagen for bone tissue engineering. *Dent Mater J.* 2012;31(3):465-471. doi:10.4012/dmj.2011-182
 15. Pardiñas C dental. Prótesis dentales en A Coruña. <http://www.clinicapardinas.com/protesis-dentales-coruna.html>. Accessed March 15, 2019.
 16. Clinica dental menta. Prótesis totales en Acrílico de Alto Impacto. <http://www.clinicament.com/protesis.html>. Accessed March 15, 2019.
 17. Marędziak M, Lewandowski D, Tomaszewski KA, Kubiak K, Marycz K. The Effect of Low-Magnitude Low-Frequency Vibrations (LMLF) on Osteogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Mol Bioeng.* 2017;10(6):549-562. doi:10.1007/s12195-017-0501-z
 18. Liu T, Wu G, Gu Z, Wismeijer D, Liu Y. Letter to the Editor. A critical-size bone defect. *Bone.* 2014;68:163-164. doi:10.1016/j.bone.2014.07.016
 19. María de Los Ángeles Fernández T, Carolina Ulloa M, Marcelo Mardones M, Christian Pedemonte T, Rodrigo Bravo A. Traumatología máxilo facial: diagnóstico y tratamiento. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2015;22(5):607-616. doi:10.1016/s0716-8640(11)70472-2
 20. Gorostieta J. Extracciones multiples y protesis inmediata. https://deskgram.net/p/1586499449353922988_319248499. Published 2017. Accessed March 12, 2019.
 21. Zucchelli G, De Sanctis M. Nueva estrategia para minimizar la recesión en el tratamiento de los defectos óseos verticales | Dentared. *Journal Periodontol.* <http://www.dentared.com/caso/nueva-estrategia-para-minimizar-la-recesión-en-el-tratamiento-de-los-defectos-óseos-verticales>. Published 2008. Accessed March 15, 2019.
 22. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 2 Volumes : 2 Volumes*. 6th ed. Hoboken: Wiley; 2015.
 23. Verónica Gómez Arcila D, Benedetti Angulo G, Camilo Castellar Mendoza E, Fang Mercado L, Díaz Caballero A. *Regeneración Ósea*

Guiada: Nuevos Avances En La Terapéutica de Los Defectos Óseos
Guided Bone Regeneration: New Advances in the Treatment of Bone
Defects. Vol 51.; 2014.

24. Leslie P. Gartner JLH; traducción de JHN. *Atlas En Color y Texto de Histología.*; 2015.
25. González Vázquez AG. Implicaciones del Calcio Extracelular y su Receptor en Membrana (CaSR) en la Angiogénesis y la Osteogénesis . Relevancia en Ingeniería Tisular . 2013.
26. *Fisiología y Envejecimiento Sistema Esquelético.*
<https://web.ujaen.es/investiga/cvi296/Gerontologia/MasterGerontologia/Tema03.pdf>. Accessed March 18, 2019.
27. Periosteum and Endosteum. https://www.lifeder.com/wp-content/uploads/2017/07/607_Periosteum_and_Endosteum-min.jpg. Accessed March 18, 2019.
28. Colegio Médico de México FENACOME. Médula ósea, importante en la donación para la leucemia infantil.
<http://www.colegiomedicodemexico.org/index.php/portfolio/medula-osea-importante-en-la-donacion/>. Accessed March 18, 2019.
29. Gokhan ARTAS Mehmet GUL Izzet ACIKAN Mustafa KIRTAY Alihan BOZOGLAN Sercan SIMSEK Ferhan YAMAN Serkan DUNDAR I. Original research A comparison of different bone graft materials in peri-implant guided bone regeneration. doi:10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0059
30. Boeckel DG, Shinkai RSA, Grossi ML, Teixeira ER. Cell Culture–Based Tissue Engineering as an Alternative to Bone Grafts in Implant Dentistry: A Literature Review. *J Oral Implantol.* 2012;38(S1):538-545. doi:10.1563/AAID-JOI-D-11-00197
31. Akintoye S. The distinctive jaw and alveolar bone regeneration. *Oral Dis.* 2018;24(1-2):49-51. doi:10.1111/odi.12761
32. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10:S96-S101. doi:10.1007/s005860100282
33. ¿Qué es el osteoide? <https://curiosoando.com/que-es-el-osteoide>. Accessed March 18, 2019.
34. asociación española de científicos. Evolución de las Biocerámicas: de inertes a regenerativas. Artículos de interés Científico. - ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE CIENTÍFICOS.
<http://www.aecientificos.es/escaparate/verpagina.cgi?idpagina=20624995>. Accessed March 18, 2019.
35. Janssen NG, Weijs WLJ, Koole R, Rosenberg AJWP, Meijer GJ. Tissue engineering strategies for alveolar cleft reconstruction: a systematic review of the literature. doi:10.1007/s00784-013-0947-x
36. Rica Altamirano Valencia C, Ali A, Becerril V, et al. Biocompatibilidad

- de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA/Hidroxiapatita. doi:10.15517/ijds.v0i0.25987
37. Torroella Saura G, Mareque Bueno S, Mereque Bueno J, Hernandez Alfaro F, Ferrés Padró E. Injertos óseos de mentón para la reconstrucción de defectos óseos: A propósito de un caso. *Rev Odontológica Espec.* 2010. http://www.infomed.es/rode/index.php?option=com_content&task=view&id=231&Itemid=2. Accessed March 18, 2019.
 38. Navarre (Spain). Departamento de Salud. M, Valentí A. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*. Vol 29. Gobierno de Navarra, Departamento de Salud; 2006. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272006000400012. Accessed March 18, 2019.
 39. Molina Moguel JL, Ávila Vázquez R, Ruíz Iniesta H. Injerto Oseo en Masilla. Molina Moguel Cirugía Maxilofacial. <https://www.maxilofacialeimplantes.com/implantes-dentales-mx/injerto-oseo-masilla/>. Published 2018. Accessed March 18, 2019.
 40. Reales G, Locher A. Biología del Tejido Óseo. In: AlphaBio Simplantology, ed. *Manual de Implantología Básica*.
 41. Nappe C, Baltodano C. Regeneración ósea guiada para el aumento vertical del reborde alveolar. *Rev Clin periodoncia Implantol oral*. 2013;6(1):38-41. doi:10.1016/S0718-5391(13)70119-8
 42. Clínicas Propdental. Regeneración ósea guiada. Blog de implantes dentales. <http://www.implantedental.net/blog/implantes/regeneracion-osea-guiada/>. Published 2013. Accessed March 18, 2019.
 43. Carrel Anselm Wiskott Mira Moussa Philippe Rieder Susanne Scherrer St ephane Durual J-P, Carrel J-P, Wiskott A, et al. A 3D printed TCP/HA structure as a new osteoconductive scaffold for vertical bone augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2014;00(00):1-8. doi:10.1111/clr.12503
 44. Li J, Stocum DL. Fracture Healing. In: *Basic and Applied Bone Biology*. Elsevier; 2014:205-223. doi:10.1016/B978-0-12-416015-6.00010-1
 45. Rosales-Ibañez, Raul; Ojeda Gutierrez, Francisco; Alvarado-Estrada K. Ingeniería Tisular en Odontología. *Rev ADM*. 2012:164-167.
 46. Khan Y, Laurencin CT. *Regenerative Engineering: Advanced Materials Science Principles*. 1°. (Khan Y, Laurencin CT, eds.). New York: CRC Press Taylor & Francis Group; 2018.
 47. Sultana N. *Biodegradable Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. doi:10.1007/978-3-642-34802-0
 48. New bone implant technology. Sheffield Drives Forward Robotics Research As Part Of New Uk Network. <https://pintherest.eu/sheffield-drives-forward-robotics-research-as-part-of-new-uk-network.html>.

Accessed March 19, 2019.

49. Sabino MA, Loaiza M, Dernowsek J, Rezende R, Da Silva JVL. TÉCNICAS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS CON APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS. *Rev Latinoam Metal y Mater.* 2017;37(2):120-146. <http://rlmm.org/ojs/index.php/rlmm/article/view/822>.
50. Pacelli S, Basu S, Berkland C, Wang J, Paul A. Design of a Cytocompatible Hydrogel Coating to Modulate Properties of Ceramic-Based Scaffolds for Bone Repair. *Cell Mol Bioeng.* 2018;11(3):211-217. doi:10.1007/s12195-018-0521-3
51. León de Ulloa J, López Cruz A, González Ruíz JE, Pérez Rodríguez YV. Diseño de andamios personalizados para la regeneración de una mandíbula con dimensiones reducidas. *Rev Cuba Investig Biomed.* 2017;36(1). http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol36_1_17/ibi01117.htm. Accessed March 15, 2019.
52. Poll D, Parekkadan B, Borel Rinkes IHM, Tilles a. W, Yarmush ML. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs. *Cell Mol Bioeng.* 2008;1(1):42-50. doi:10.1007/s12195-008-0001-2
53. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. *Kelley y Firestein. Tratado de Reumatología, Décima Edición.* 10°.; 2018. https://www-clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/service/content/pdf/watermarked/3-s2.0-B9788491133070000072.pdf?locale=es_ES. Accessed January 29, 2019.
54. EquiCord. Que son las células madre. Células madre Mesenquimales (MSCs). <http://www.equicord-ymas.com/index.php/es/que-son-las-celulas-madre/celulas-madre-mesenquimales-mscs/>. Accessed March 18, 2019.
55. Carlos Munévar Niño Od J, Coordinador Cultivo celular Regeneración Tisular D, del Pilar Becerra Calixto BCI A, Asistente I, Bermúdez Olaya Estudiante C. ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES DE LAS CÉLULAS MADRES INVOLUCRADOS EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS CON APLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA ODONTOLÓGICA. *Acta Odontológica Venez.* 2008;46(3). [www.actaodontologica.com](http://www.actaodontologica.com/fuente:www.actaodontologica.com/ediciones/2008/3/aspectos_celulares_moleculares_celulas_madres.asp)fuente:www.actaodontologica.com/ediciones/2008/3/aspectos_celulares_moleculares_celulas_madres.asp. Accessed March 15, 2019.
56. Navarrete ES, Vargas Ulloa LE, Patricia M, et al. Células pluripotenciales de la pulpa dental humana. El futuro de la regeneración en Odontología. *Odontol Actual.* 2014;11(130):4-14.
57. Ibarretxe G, Luzuriaga J, Unda F, et al. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of

craniomaxillofacial tissues. *Front Physiol.* 2015;6(October):1-10.
doi:10.3389/fphys.2015.00289