

Rodríguez AA, Lozano MA, Benedetti AE, Munévar JC, Sarmiento JA, Gómez RA. Evaluación *in vitro* de la adhesión de células troncales mesenquimales a matrices dentales impresas en tercera dimensión. Univ Odontol. 2014 Jul-Dic; 33(77). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo36-77.eact>

SECCIÓN: Ciencias básicas, biotecnología y bioinformática

TITULILLO: Evaluación de hDPSCs en matrices 3D

Evaluación *in vitro* de la adhesión de células troncales mesenquimales a matrices dentales impresas en tercera dimensión

***In Vitro* Evaluation of the Adhesion of Mesenchymal Stem Cells to Three-Dimensional Printed Matrices**

Álvaro Andrés Rodríguez Sáenz

Odontólogo, Residente Cirugía Oral y Maxilofacial Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

María Alejandra Lozano Macías

Odontóloga, Residente Ortodoncia Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Astrid Eugenia Benedetti Canabal

Odontóloga, Residente Periodoncia y Medicina Oral, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Juan Carlos Munévar Niño

Profesor asociado Odontología. Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Jorge Alberto Sarmiento O'Meara. Profesor asistente diseño industrial. Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Roberto Alfonso Gómez Bahamón. Instructor asistente diseño industrial. Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Rodríguez AA, Lozano MA, Benedetti AE, Munevar JC, Sarmiento JA, Gómez RA. Evaluación *in vitro* de la adhesión de células troncales mesenquimales a matrices dentales impresas en tercera dimensión. Univ Odontol. 2014 Jul-Dic; 33(77). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo36-77.eact>

Recibido para publicación: 25/10/2016

Aceptado para publicación:30/11/2017

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

RESUMEN

Antecedentes: En la ingeniería de tejidos es fundamental estudiar el sinergismo entre las células troncales mesenquimales y el biomaterial para tener un mayor control sobre los biomiméticos. De esto depende el éxito de tratamientos de lesiones de tamaño crítico. **Objetivo:**

Evaluar la adhesión celular *in vitro* de células troncales de la pulpa dental humana (hDPSCs) en matrices impresas con ácido poliláctico (APL). **Métodos:** Se utilizaron muestras de hDPSCs criopreservadas y expandidas, cultivadas sobre 24 matrices dentales impresas 3D en APL durante 1, 7 y 15 días. Se evaluó la fenotipificación de la hDPSCs por citometría de flujo y la adhesión celular a la matriz por medio de microscopio electrónico de barrido (SEM). Los datos fueron reportados en porcentajes, tanto para marcador analizado, como para la cantidad de células adheridas. **Resultados:** hDPSCs expresaron positivamente anticuerpos CD73 y CD90 de casi 100 % y CD105 de 56,7 %. Así mismo, expresaron negativamente, anticuerpos CD34 y CD45 mayor a 98 %. Se observó en SEM que a los 15 días el 99,88 % de las hDPSCs presentaron forma fusiforme o estrellada lo que significa que estas células se adhirieron a la matriz de APL. **Conclusión:** El APL no es citotóxico para las hDPSCs por su composición y características biocompatibles, lo que proporcionó que las células se adhirieron y proliferaron sobre la matriz dental impresa en 3D demostrando ser un método *in vitro* efectivo para emplear en futuros estudios de regeneración de tejidos en odontología.

PALABRAS CLAVE

ácido poliláctico; biomateriales; células madre; impresión 3D; pulpa dental; regeneración tisular.

ÁREAS TEMÁTICAS

diseño industrial; ingeniería tisular; odontología

ABSTRACT

Background: The study of synergy between mesenchymal stem cells and biomaterial in tissue engineering is fundamental in order to have greater control over the biomimetics for the success of critical clinical treatments depends on this. **Objective:** to evaluate *in vitro* cellular adhesion of human dental pulp stem cells (hDPSCs) in three-dimensional printed matrices synthesized with poly-lactic acid (PLA). **Method:** The study used passage-expanded cryopreserved dental stem cell samples cultivated on 24 three-dimensional dental matrices of PLA during 1, 7 and 15 days. Phenotypification of the DMSC was carried out with flow cytometry and the cellular adhesion to the matrix with morphological analysis using an SEM electron microscope. Data were reported in percentages for each marker in the phenotypification as well as for the amount of adhered cells per time period. **Results:** The hDPSCs expressed positively, CD73 and CD 90 antibodies of almost 100 % while the CD 105 only had 56, 7 %. The cells presented negative expression of the CD34 and CD45 antibodies in more than 98 %. The SEM showed that 99, 88 % of the DMSC had a fusiform or star shape after 15 days meaning that they had adhered to the matrix. **Conclusion:** PLA biomaterial is not cytotoxic for the DMSC due to its composition and biocompatible characteristics, which helped the cells, adhere themselves and proliferate on the matrix. This proved to be an effective *in vitro* method, which may be used in future studies of critical- size tissue lesion studies in dentistry.

KEYWORDS

Biomaterials; dental pulp; poly-lactic acid; stem cells; three-dimensional impression; tissue regeneration.

THEMATIC FIELDS

Industrial Design; odontology; tissue engineering.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales humanas son células con propiedades pluripotenciales, multipotenciales, progenitoras y precursoras. Estas células tienen un potencial proliferativo elevado con capacidades de generar tejidos en el proceso embrionario y regenerar posterior a procesos traumáticos (1,2). El estudio de la células troncales inicia entre los años 1960 y 1970 con estudios en ratones, hamsters y cobayos por Friedenstein y colaboradores con células troncales mesenquimales en el que describen células de la médula ósea que hacían parte de un estroma medular y este origina un microambiente hematopoyético a las que llamaron Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastos (UFC-F).

Luego en el año 1983 Owen y colaboradores describen la capacidad de estas células de generar hueso, cartílago y tejido conjuntivo con poca cantidad de las células de la médula ósea inoculadas en una cámara de difusión en modelos *in vivo* (3). En 1974 Friedenstein y su equipo demostraron que estas células tienen propiedades de autorenovación y elevado potencial de proliferación (4). Teniendo estos conceptos más claros, a finales de los 80 estos dos autores y sus colaboradores concluyeron que había una célula troncal presente en la médula ósea con la capacidad de originar distintos tipos celulares entre los que se incluía el hueso, a esta célula la denominaron célula troncal estromal. Años más tarde en 1992 Caplan y colaboradores propusieron realizar un estudio en humanos en el que cultivaban y trasplantaron células mesenquimales de humanos adultos para observar la formación del hueso (5,6).

Este tipo de células indiferenciadas contribuyen a la formación de tejidos durante el desarrollo y para la regeneración de los tejidos en el período postnatal o acontecimientos traumáticos que generan la pérdida estructural y funcional de los mismos. En los últimos años, la investigación con células troncales se desarrolla de manera exponencial y ya se reportan por encima de 10 fuentes de células troncales mesenquimales en el complejo oral y maxilofacial y su número va en aumento (7). La creciente evidencia demuestra que las células troncales se encuentran principalmente en nichos y que ciertos tejidos contienen más células troncales que otros. Entre estos nichos, la pulpa dental se considera una fuente rica de células troncales mesenquimales humanas que son adecuadas para ser aplicadas en la ingeniería de tejidos (8).

Las hDPSCs tienen el potencial de diferenciarse en varios tipos de células, incluyendo odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, y adipocitos. En particular, la pulpa dental obtenida de dientes con extracción indicada previo consentimiento informado es sin duda la fuente más accesible de células troncales mesenquimales postnatales. Diferentes biomateriales ya sea de origen natural como esferas de celulosa o cerámicas sintéticas como la hidroxiapatita, han sido usadas como matrices para el uso clínico en reconstrucción de la función y la forma en defectos de tamaño crítico, especialmente bajo las condiciones biológicas y mecánicas de la mandíbula en la cavidad oral (9).

Se han descubierto distintos tejidos donde podemos encontrar fuentes de células troncales gracias a diversos marcadores moleculares que han facilitado la búsqueda para la detección de estas. Estos marcadores son específicos para cada célula e *in vivo* codifican proteínas especializadas que funcionan como receptores y a su vez cumplen funciones de señalización, adhesión y responden a señales extrínsecas. Cada célula tiene en su superficie celular una expresión específica de receptores que la hace diferente de las otras células de otros linajes. Los 3 linajes de células con mejor caracterización son las células troncales embrionarias, neurales y hematopoyéticas. Para poder identificar los marcadores de las células troncales se

utilizan nombres basados en moléculas que están unidas a su superficie, para esto se han desarrollado técnicas para detectar los marcadores específicos con un componente fluorescente. (6)

Las distintas estrategias en Ingeniería Tisular basadas en células troncales y biomateriales podrían aplicarse para reconstruir estructuras complejas maxilofaciales. Los biomateriales servirían de moldes y a la vez como medios de soporte de matrices extracelulares sintéticas para promover los procesos de regeneración (10). Los biomateriales impresos representan una herramienta prometedora que puede personalizarse al tamaño, configuración, morfología y arquitectura del defecto a regenerar. Teniendo en cuenta que Rasperini y colaboradores en el 2015 reportaron el empleo de una matriz impresa 3D en policaprolactona bioreabsorbible para promover la reparación en un defecto periodontal con resultados sin éxito a largo plazo, es necesario continuar con más estudios al respecto para obtener aplicaciones clínicas personalizadas en odontología regenerativa. Se planteó como hipótesis del estudio la posibilidad que las matrices impresas 3D en biomateriales convencionales promuevan la adhesión de las hDPSCs. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la adhesión celular *in vitro* de hDPSCs en matrices impresas con APL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio piloto se clasifica como experimental *in vitro*. 250.000 hDPSCs expandidas en pasaje 4 postcriopreservación se consideraron como la población de estudio. Posteriormente estas hDPSCs se depositaron en 24 matrices dentales impresas 3D de ácido poliláctico. Se realizó un muestreo probabilístico de tipo aleatorio simple, previa enumeración de cada una de las 24 matrices 3D de APL donde se sembraron 250.000 células hDPSCs por matriz. Los datos obtenidos de adhesión celular se consignaron en un instrumento de recolección de datos para ejecutar el análisis estadístico de los datos.

Como criterios de inclusión se tuvieron en cuenta pulpa de dientes permanentes humanos, hDPSCs criopreservadas y expandidas hasta pasaje 4, así como APL como material de impresión. Como criterios de exclusión para este estudio se aplicaron a dientes temporales humanos^[1], cultivos celulares contaminados^[1], crioviales con baja densidad celular (< 200.000 hDPSCs / mL) y pasaje 5. Este estudio de investigación fue aprobado por el comité de ética de investigación de la Universidad El Bosque con el código PCI 2014 - 55. A continuación se describe cómo se construyó la matriz y como se prepararon las células que fueron cultivadas en las matrices impresas en 3D.

Scanner y digitalización de los dientes humanos

A partir de los modelos físicos del diente se utilizó la tecnología de fabricación de digital para obtener modelos virtuales utilizando la ingeniería inversa, por medio de software para captura de imágenes como Scan Studio 3D de Nextengine bajo la versión 1.3.2. se modificaron de acuerdo a las características morfológicas. Posteriormente se realizó la retopología de la imagen para obtener modelos digitales con menor número de mallas o NURBS. Previa ubicación vertical y fijación del modelo físico del diente en el soporte del escáner o Autodrive, se inició el proceso de calibración y alineación del sistema, determinando el número de familias o grupos de imágenes que se deben obtener para capturar la mayor información posible del diente y ubicando puntos de referencia en el modelo, de este modo se elimina el ruido en la imagen del modelo. Se seleccionaron los parámetros de scanner como calidad, número de imágenes, tiempo y ángulo de escaneo. En el caso del diente se obtuvo una familia de 16 imágenes en calidad HD. Con esta información se realizó la alineación, corte unión, pulido de

la imagen y se exportó a un formato .stl y .obj para corregir la malla poligonal desde el software Meshmixer realizando la retopología digital. El archivo digital obtenido para la impresión 3D presenta de esta manera imágenes de menor peso digital, facilitando la exportación, edición, topología y preparación superficial del modelo digital en los programas Rhinoceros y Solidworks para diseñar la estructura y textura superficial.

Definido el protocolo de Impresión 3D de matrices dentales, los modelos digitales de las diferentes piezas dentales se enviaron a impresión 3D para lo cual se utilizó un material biodegradable como el APL. En el control y preparación del archivo de la impresión 3D se utilizó el software CURA y una impresora 3D marca WASP modelo delta 2040 con una resolución de 0,05 mm (50 micrones). Se contemplaron los parámetros como formato del archivo digital, Slicing, altura de la capa, soportes, orientación de la pieza, velocidad de impresión, contracción del material, temperatura del material y de la plataforma, espesor de pared, Infill density y Flow para obtener una impresión de alta resolución, esto es permitido porque esta impresora cuenta con una boquilla de extrusión de 0,3 mm. El archivo final se exportó a formato GCODE y se envía posteriormente a impresión con tecnología FDM utilizando un material termoplástico.

Obtención de las Células hDPSCs por descongelación

Las células troncales de pulpa dental criopreservadas en pasaje 3 se sometieron a descongelación lenta -1 °C por minuto mediante Mr. Frosty y cultivadas en cajas T25 de poliestireno en 3 ml de medio de cultivo DMEM High Glucose suplementado con Suero Fetal Bovino y antibióticos. Luego de 1 hora de adhesión de 2 ml de suspensión celular en la incubadora se agregó 2.000 µl de medio Dulbecco's Modified Eagle's Media DMEM GIBCO® bajo en glucosa suplementado con Penicilina 100 U / ml / estreptomina 100 µg / ml y anfotericina 2,5 µg / ml de Hyclone y dejándolo en incubación a 37 °C, atmósfera húmeda y 5 % de CO₂, hasta obtener un 70 % de confluencia celular. Se revisó y cambió el medio de cultivo cada dos días para observar proliferación, confluencia celular y descartar contaminación, observando al microscopio de contraste de fase a 20X y 40X. Cuando las células alcanzaron confluencia (> 70 %) se disocian enzimáticamente, para su posterior inmunofenotipificación y siembra en las matrices 3D impresas de APL.

Evaluación del fenotipo troncal mesenquimal post criopreservación mediante caracterización por citometría de flujo

Al mismo tiempo de iniciar la expansión de las células troncales mesenquimales se confirmó el fenotipo y viabilidad de las células troncales mesenquimales dentales por citometría de flujo (citómetro BD Accuri C6®). Cuando el cultivo alcanzó el 90 % de confluencia en el pasaje 3, las hDPSCs se lavaron con solución tamponada de fosfato (PBS), se agregó tripsina a una concentración de 0.25 %, se centrifugó a 1.500 g por 4 minutos y posteriormente las células se contaron en microscopio invertido con azul Tripán dilución 1/1. Para el experimento se tomaron 4 tubos de microcentrífuga; 1) Contenía 2.5 x 10⁵ células sin marcar, 2) Corresponde al control de isotipos que contiene CD105 marcado con ficoeritrina (PE) conjugado con IgG1 y CD45 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) marcado con IgG2, 3) Contenía 2.5 x 10⁵ células con los anticuerpos CD105 marcado con PE conjugado con IgG1, CD34 marcado con FITC conjugado con IgG2a, CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PERCP) conjugado con IgG2a y CD90 marcado con aloficocianina (APC) conjugado con IgG1, 4) Contenía 2.5 x 10⁵ células con los anticuerpos CD73 marcado con (PE) conjugado con IgG1.

Todos se incubaron durante 2 horas antes de ser leídos en el citómetro de flujo Becton & Dickinson.

Estandarización del protocolo de cultivo de las células troncales de la pulpa dental humana en matrices impresas 3D sintetizadas con ácido poliláctico

Los cultivos de hDPSCs se mantuvieron en cajas T 25 de poliestireno estériles hasta alcanzar el cuarto pase en la cabina de flujo laminar a 37 °C, 5 % CO₂ en atmósfera húmeda. Cuando las células hDPSCs en expansión alcanzaron el 70 % de confluencia se disociaron enzimáticamente con Tripsina 0,25 % / EDTA 0,5 % en cajas de cultivo de poliestireno T25. Posteriormente, se cultivaron 50.000 hDPSCs, 75.000 hDPSCs, 100.000 hDPSCs y 150.000 hDPSCs por triplicado sobre las matrices dentales 3D impresas en cajas de 24 pozos. Para el cultivo celular en las matrices se empleó una caja de 24 pozos, se agregó para cada pozo 1 ml de medio DMEM High glucose, suplementado con SFB al 10 % y antibióticos a las matrices experimentales y a las matrices control. El medio fue cambiado 3 veces durante estos 7 días y se mantuvo en agitación constante.

Análisis de la morfología de las células troncales de la pulpa dental humana cultivadas en matrices impresas 3D sintetizadas con ácido poliláctico

La evaluación morfología de las células y adhesión se realizó en SEM, para esto, la matriz fue fijada con glutaraldehído al 2,5 % tamponado con fosfato salino (PBS) 0.1M con pH de 7,4, este se dejó por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS por 10 min y se deshidrató en series crecientes de etanol (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 % y 100 %) durante 10 min en cada concentración. En el último cambio de etanol se llevó a secado a punto crítico que se realizó por 1h, luego se recubrió con oro y se visualizó en SEM para corroborar la adhesión de las células en el constructo 3D dental impreso.

Evaluación de la Adhesión de las hDPSCs a las matrices 3D impresas

Pertinente a la adhesión celular se empleó el protocolo modificado de Vohra y colaboradores en el 2.008, en el cual se siembra las hDPSCs en los tipos de matrices en concentraciones de $2,5 \times 10^5$, en una placa de 24 pozos y se someten a adhesión en los diferentes tiempos establecidos en el protocolo mediante lavado PBS, las células que permanecieron adheridas a la matriz, se micro fotografiaron por SEM. Para efectuar el recuento del número de células viables sembradas sobre los sustratos, se lavaron los andamios con PBS 1X estéril para eliminar las células no adherentes y las células muertas. Posteriormente, se incubaron en solución enzimática 0,5 ml de tripsina al 2 % a 37 °C durante 5 minutos. El proceso de tratamiento con tripsina se detuvo mediante la adición de 0,5 ml de DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 %. Después de la tinción con azul Tripán, el número de células se contaron usando la cámara de Neubauer bajo el microscopio invertido (Nikon Eclipse, TS100, Japón).

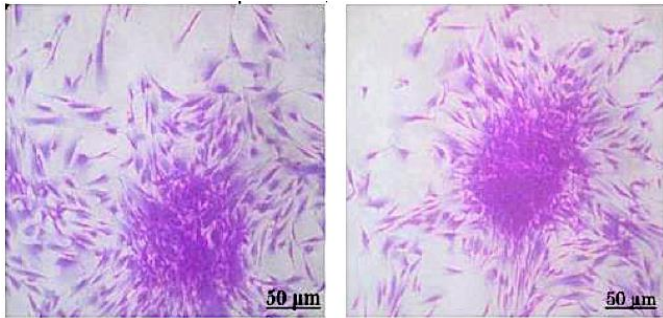
Las matrices impresas en 3D se recubrieron con suero fetal bovino durante toda la noche a 4 °C en una placa de 24 pozos, pero sin hDPSCs se consideraron como controles negativos. Después de la tripsinización las células troncales se resuspendieron en DMEM libre de suero para depositarlas en las matrices 3D impresas de APL y dejarlas en adhesión durante una hora a 37 °C en los pozos de la caja de poliestireno. Pasado el intervalo de adhesión celular de una hora, las matrices 3D dentales se lavaron una vez con PBS para eliminar las células no adherentes. El grado de adhesión celular se evaluó mediante SEM.

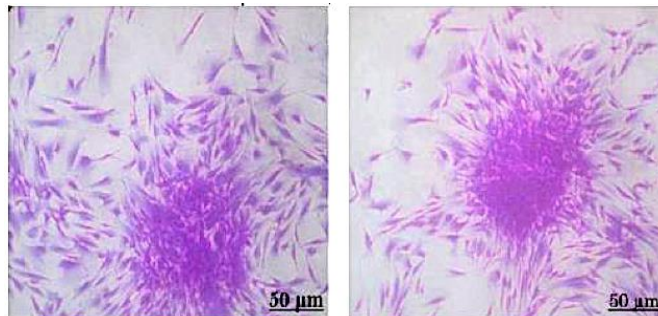
Las matrices tridimensionales de APL se analizaron mediante SEM, mostrando que la morfología externa de la matriz obtenida es altamente porosa con un rango en el tamaño poro de 400 μm , estos resultados sugieren que la matriz tridimensional o scaffold contiene poros de submicroescala, microescala y macroescala. La morfología celular que adoptan las células dependen de las características topográficas de la superficie del sustrato; en este sentido, la adhesión y proliferación y los procesos de diferenciación celular están influenciados por la forma, rugosidad y porosidad del sustrato. A este respecto, se observó, que las matrices de APL y las hDPSCs cultivadas durante 7 días, se adhieren a la superficie a través de proyecciones citoplasmáticas delgadas locales correspondientes a filopodios, demostrando de esta forma la interconectividad celular y con la matriz.

RESULTADOS

Evaluación morfológica *in vitro* post criopreservación de las Células Troncales de Pulpa Dental

A partir de la primera semana de cultivo se evaluó la morfología celular mediante microscopía invertida; se observaron células individuales con morfología fibroblastoide adherentes al plástico, además se observaron UFC-F al ser teñidas según los protocolos internacionales con el colorante Azul de Evans, características del cultivo de células troncales mesenquimales (figura 1).

FIGURA 1.
MICROFOTOGRAFÍAS DE LAS CFU-F A LA SEMANA DE EXPANSIÓN CELULAR POST CRIOPRESERVACIÓN. 

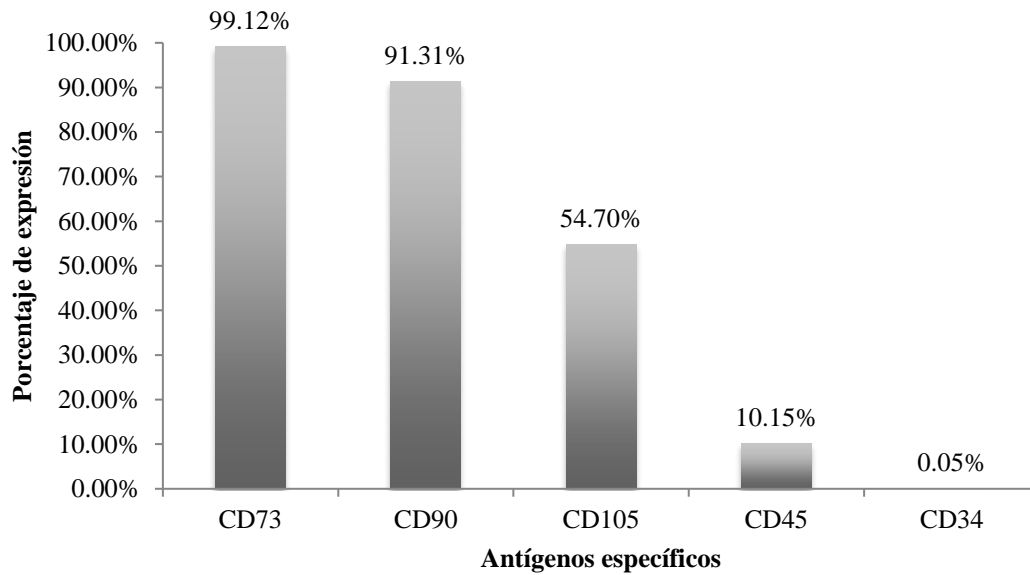


Análisis del fenotipo de las Células Troncales de Pulpa Dental hDPSCs expandidas post criopreservación

El análisis de citometría de flujo se realizó empleando el software del citómetro BD Accuri C6 después de adquirirse 5.000 eventos del tipo celular evaluado (hDPSCs), en donde el porcentaje de células positivas fue calculado restando el porcentaje de células sin marcar del porcentaje de células fluorescentes. Se encontró que los tres tipos celulares expresan los antígenos CD105+, CD73+ y CD90+ los cuales debe expresar una célula troncal mesenquimal según lo estipulado por la Sociedad Internacional de Terapia Celular en el 2006.

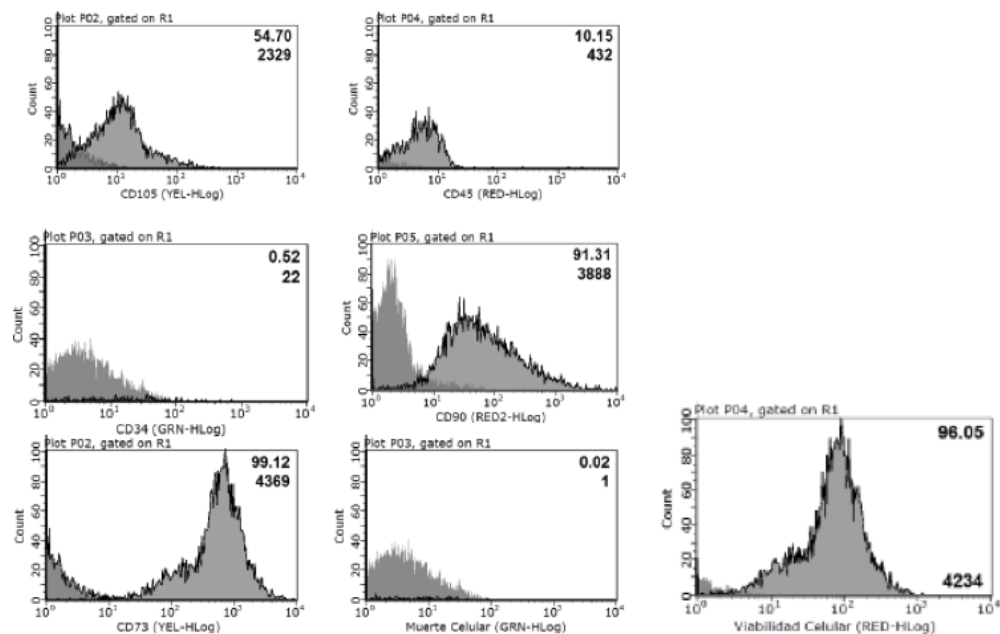
Para los antígenos hematopoyéticos, que no deben ser expresados por células troncales mesenquimales encontramos una baja expresión del antígeno CD45 en las células hDPSCs. Para el antígeno CD34 las hDPSCs tienen una expresión inferior al 2 % (figura 2). Estos resultados demostraron que las células hDPSCs que fueron empleadas en este estudio corresponden al fenotipo troncal mesenquimal, pero probablemente iniciaron un compromiso de diferenciación celular (11).

FIGURA 2
 PORCENTAJE DE EXPRESIÓN *IN VITRO* DE LOS MARCADORES DE hDPSCS EN EL ESTUDIO.



En conclusión, se verificó la viabilidad y se inmunocaracterizaron las hDPSCs mediante la expresión de marcadores de superficie que definen el fenotipo de CD73+, CD105+, CD90+, CD34- y CD45- (figura. 3)

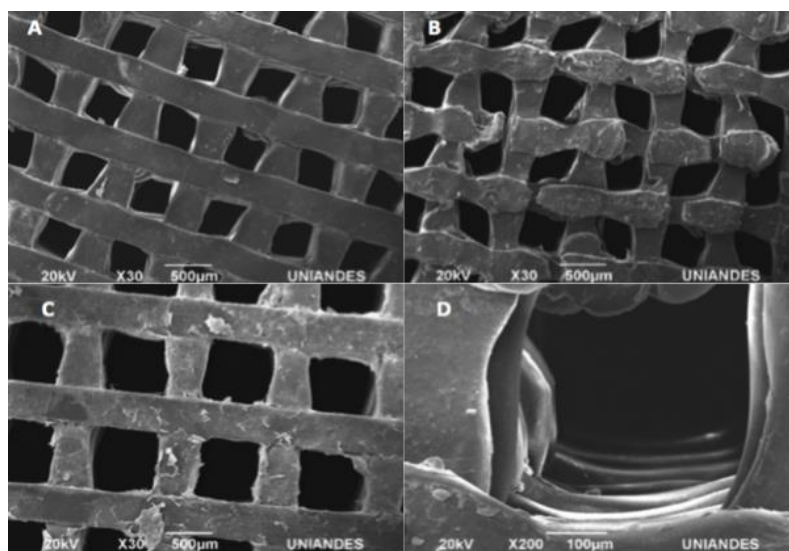
FIGURA 3
 VERIFICACIÓN DEL FENOTIPO TRONCAL MESENQUIMAL DE LAS hDPSCS POR CITOMETRÍA DE FLUJO



Evaluación *in vitro* de la adhesión de las hDPSCs en matrices dentales 3D de ácido poliláctico

Se realizaron pruebas preliminares para implementar el protocolo de cultivo de hDPSCs en matrices dentales en 3D de APL. En efecto, en primer lugar se imprimieron unas matrices en APL cuadriculadas con poros interconectados. (figura 4). Esto nos mostró que el APL no solo es no citotóxico, sino que su superficie es lisa, homogénea, con una matriz que presenta poros interconectados de 400 μm de diámetro que permiten el depósito de factores solubles, la colonización de células y posiblemente de vasos sanguíneos. Las hDPSCs no solo se adhirieron a las matrices 3D de APL durante 24 y 48 horas, además penetraron los poros interconectados de las mismas. Esto nos permitió continuar con la impresión de matrices 3D dentales en APL.

FIGURA 4.
CULTIVOS PRELIMINARES DE hDPSCs EN MATRICES 3D CUADRICULADAS IMPRESAS EN APL CON POROS INTERCONECTADOS.



Una vez se evidenció adhesión de las hDPSCs a los prototipos de APL y establecido el protocolo de cultivo sobre las matrices 3D impresas en APL se procedió a determinar el número de hDPSCs a depositar sobre las matrices dentales 3D impresas en APL. De este modo, se depositaron en una caja multipozos de poliestireno 50.000, 75.000, 100.000 y 150.000 hDPSCs por pozo y por triplicado dejándolas en adhesión durante 1 hora en 500 μl de DMEM bajo en glucosa suplementado con suero fetal bovino al 10 % y antibióticos (Penicilina 100 U / ml / Estreptomicina 100 μg / ml) bajo agitación constante en incubadora a 37 °C y en atmósfera húmeda.

Durante estos experimentos al realizar la observación de la caja de 24 pozos en los distintos tiempos no se evidenció contaminación bacteriana de los cultivos sobre las matrices dentales impresas 3D en APL. Se observaron al microscopio invertido algunas células adheridas al fondo del cada pozo, sin embargo con esta técnica solo es posible observar algunas células adheridas a las distintas superficies de las matrices 3D impresas en APL. Por esta razón, procedimos a analizar la adhesión y morfología de las células al microscopio electrónico en la Unidad de Microscopía de la Universidad de los Andes.

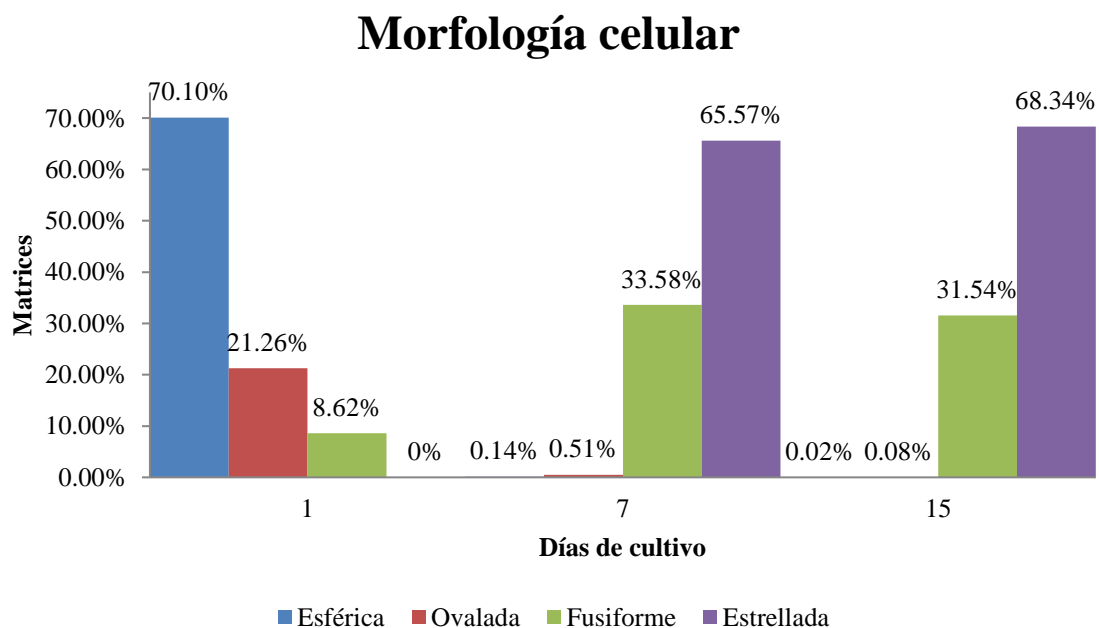
Evaluación morfológica de las células en las matrices dentales 3D impresa

La morfología *in vitro* de hDPSCs se estudió en matrices 3D de ácido poliláctico. En primer lugar, los andamios con células restantes después de los distintos días en cultivo celular se lavaron dos veces con PBS para eliminar células no adherentes y luego se fijaron durante 4 horas usando una solución de glutaraldehído al 2,5 % a 4 °C. Las matrices 3D en APL se deshidrataron en solución de etanol con concentraciones crecientes en serie de 30, 50, 70, 90, y 100 % v / v durante 15 minutos para cada concentración antes de ser secadas al aire durante la noche.

Las células hDPSCs exhibieron diversas morfologías bajo el SEM al estar en contacto con las matrices dentales 3D impresas. Principalmente, se observó que la morfología de las células sobre las matrices fue esférica, oval, fusiforme y estrellada. Inicialmente predominaron células con morfología esférica y oval pero a medida que transcurría el tiempo se evidenció un incremento de células con morfología fusiforme y estrellada con prolongaciones citoplasmáticas.

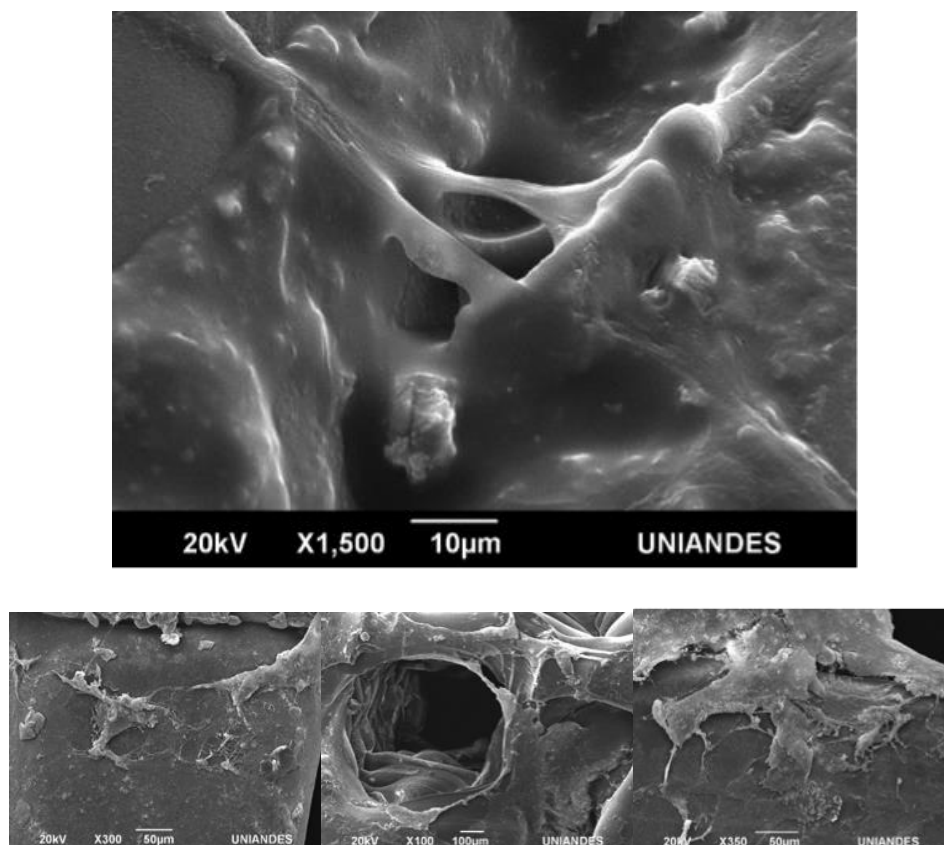
De este modo observamos en el primer día hubo un predominio del 70 % de células con morfología esférica, al 7 día había presencia de un 65 % de células estrelladas y observamos como a los 15 días ya estas células adoptan forma fusiforme en un 31 %. En efecto, se observó al día 15 un predominio de células troncales mesenquimales de pulpa dental humana con un núcleo central y amplios citoplasmas con morfología estrellada, numerosas prolongaciones citoplasmáticas elongadas. (figura. 5)

FIGURA 5
MORFOLOGÍA CELULAR *IN VITRO* SOBRE LAS MATRICES DENTALES 3D IMPRESAS EN DIFERENTES TIEMPOS (1, 7 Y 15 DÍAS).



Las hDPSCs son células de aproximadamente 50 μm de diámetro, poseen largas prolongaciones citoplasmáticas que se interconectan entre sí, ampliamente adheridas y distribuidas a la superficie del sustrato. Adicionalmente, se evidenció depósitos de matriz extracelular sobre la superficie del APL (figura 6).

FIGURA 6
SÍNTESIS DE MATRIZ EXTRACELULAR ORGÁNICA DEPOSITADA SOBRE EL SUSTRATO DE APL POR LAS hDPSCs
EXPANDIDAS A 4 PASAJE POST CRIOPRESERVACIÓN. 1.500X



La SEM reveló la continuidad de su interconectividad entre las superficies profundas y superficiales de las matrices entre 80-90 % y la penetración de las prolongaciones celulares de las hDPSCs. A partir de la segunda y tercera semana se observó un gran número de células que forman una monocapa celular confluyente cubriendo la superficie de la caja de cultivo T-25.

Análisis de la adhesión de las hDPSCs a las matrices 3D impresas.

Las 24 matrices de APL que se sintetizaron en el laboratorio, se cargaron con células troncales dentales humanas. Estas hDPSCs demostraron adhesión a la superficie del APL así como exhibieron morfologías variadas. Además, se observó que la presencia de estas células en las capas profundas de la matriz confirmó su penetración en el interior de las matrices. La SEM reveló la continuidad de su interconectividad entre las superficies profundas y superficiales de las matrices entre 80-90 % y facilitó la penetración de las prolongaciones celulares de las hDPSCs (figura 6)

Figura 6. Evaluación de la adhesión de las hDPSCs al sustrato de APL por SEM (A) 300X (B) 350X.

La SEM reveló buena adhesión y distribución de las hDPSCs en la matriz de APL. Adicionalmente, se observó secreción de matriz extracelular depositada en la matriz de APL. Incluso se presentó proliferación y estiramiento celular bajo el microscopio electrónico de barrido, lo que indica que las hDPSCs tienen buena adhesión al material sintético de impresión (tabla 1).

TABLA 1.
PORCENTAJE DE ADHESIÓN *IN VITRO* DE LAS hDPSCs SOBRE LAS MATRICES DENTALES 3D IMPRESAS EN DIFERENTES TIEMPOS.

Días	Nº de hDPSCs cultivadas por matriz 3D	Porcentaje de adhesión de hDPSCs	Promedio de hDPSCs adheridas %
1	50.000	65,5	0,087
	75.000	69,25	0,048
	100.000	76,5	0,050
	150.000	84,25	0,036
7	50.000	72,25	0,714
	75.000	75,5	0,464
	100.000	82,25	0,341
	150.000	89,9	1,2
15	50.000	79,7	2,536
	75.000	82,3	0,001
	100.000	92,6	1,276
	150.000	96,7	0,832

De este modo observamos en el 1 día un porcentaje de adhesión de hDPSCs cuando se cultivaron 50.000 células de un 0,087 %, al 7 día hubo presencia de 0,714 % de adhesión de las hDPSCs, a los 15 días ya observamos un incremento de 2,536 %. Cuando se cultivaron 75.000 células al 1 día un 0,048 %, al 7 día un 0,464 %, a los 15 días un 0.001 %. Cuando se cultivaron 100.00 células al 1 día un 0,050 %, al 7 día un 0,341 %, a los 15 días un 1,276 %. Cuando se cultivaron 150.000 células al 1 día un 0,036 %, al día 7 un 1,2 %, a los 15 días 0,832 %. Por lo tanto, se observó un incremento con el transcurso de los días de la presencia de células fusiformes y estrelladas, así como un aumento en el porcentaje de células adheridas a las matrices dentales impresas en 3D.

DISCUSIÓN

Los defectos óseos provocados por traumas, anomalías congénitas, infecciones o resecciones de tumores no se reparan espontáneamente, lo que representa un importante desafío para la ingeniería tisular. La regeneración de tejidos a través del uso de biomateriales y mediadores biológicos proveen nuevas herramientas para la medicina regenerativa debido a la

implementación de la triada de la ingeniería tisular la cual involucra biomateriales, células y factores de crecimiento. El deseo de crear alternativas biológicas para la implantación permanente de materiales sintéticos ha inspirado el campo de la ingeniería de tejidos, la cual involucra el diseño, construcción, modificación, reparación y regeneración de los tejidos vivos (12).

Los constructos sintetizados en Ingeniería Tisular poseen el potencial de promover la regeneración de tejidos y órganos irreversiblemente afectados como consecuencia de enfermedades congénitas, cáncer o trauma. Para implantar estos constructos o matrices tridimensionales es fundamental emplear células troncales o diferenciadas así como factores solubles de acuerdo al tipo de defecto y su ubicación en el organismo del paciente (13). Uno de los desafíos más importantes en terapia celular con matrices 3D es analizar el comportamiento *in vitro*, específicamente la adhesión a los biomateriales. De hecho, la adhesión celular es un proceso mediado por interacciones entre las moléculas de la superficie celular mediante el cual las células interactúan entre sí y se adhieren a una superficie o sustrato natural (colágeno, fibronectina, hidroxiapatita, etc.) o sintético (APL, PLGA, ABS, etc.). La adhesión celular es esencial para mantener la estructura multicelular en los tejidos naturales o en sustitutos tisulares, así como para regular los mecanismos de transducción de señales durante la integración del biomimético. Por lo tanto, es prioritario garantizar que las células troncales mesenquimales están siendo cargadas en el sitio de la injuria en el paciente que así lo requiera. (13,14)

La tecnología de impresión 3D tiene el potencial de cambiar el futuro de la producción de prototipos médicos y odontológicos, generando beneficios a pacientes y profesionales de la salud. Con esta tecnología se puede emplear materiales termoplásticos biocompatibles para crear un constructo tridimensional. Pese a que esta tecnología actualmente es costosa, se está volviendo paulatinamente más asequible. Aunque hay una gran diversidad de técnicas de procesamiento disponibles para la ingeniería de tejidos, los métodos de prototipado rápido tienen varias ventajas sobre otros métodos actuales de fabricación de esqueleto de polímero. Estos métodos tienen el potencial de crear órganos y tejidos, matrices complejas que se adaptan a cualquier necesidad, incluso, posiblemente, a un paciente específico. La impresión tridimensional (3D), en particular, proporciona una vía para la fabricación eficiente, automática y repetible de los soportes con estructuras altamente controladas. A diferencia de otros métodos comunes de procesamiento, es posible fabricar andamios 3D con arquitecturas sintonizables que modelan un órgano deseado. Utilizando un enfoque de capa por capa, materiales sintéticos o naturales, células y otras moléculas se imprimen y se apilan en forma de andamio que imita la estructura fisiológica y reemplaza precisamente el sitio del defecto en el tejido dañado o ausente (15).

En los últimos años, injertos autógenos e alogénicos han sido utilizados como sustitutos en el tratamiento de tejidos dañados. La ingeniería de tejidos es un enfoque prometedor para modular *in vivo* la regeneración de tejidos dañados, debido al gran impacto que tienen en la calidad de vida de los pacientes, surge la necesidad de generar estrategias terapéuticas eficaces, con el menor número de contraindicaciones y facilidades que sean aplicables en la práctica clínica médica y odontológica. En este enfoque, las células deben ser capaces de adherirse y proliferar en un andamio adecuado con el fin de regenerar tejidos dañados. Diversos sustitutos viables pueden implantarse en el tejido periférico al sitio de la zona lesionada. Para este propósito, se han utilizado polímeros sintéticos y biodegradables o naturales biocompatibles para desarrollar andamios especialmente diseñados para imitar o mimetizar la estructura biológica y función de la matriz extracelular nativa (16)

El estudio de Razavi y colaboradores en el 2015, trabajó en un método de preparación de andamios en donde se utilizó el electrospinning para dispersar nanofibras de quitosano a través de un andamio de ácido poliláctico / co glicólico (PLGA). Ellos encontraron que el andamiaje de nano fibras con un alto porcentaje de nanopartículas de quitosano promovió la adhesión y proliferación celular. La adhesión celular al andamio de PLGA / CS se incrementó al aumentar el contenido de CS. En nuestro estudio se observó que las hDPSCs en matrices de APL se adhirieron a los constructos desde el día 1 y durante los 3 tiempos de evaluación. Sin embargo, estas células experimentaron un cambio morfológico evidente como se observa en las microfotografías, de este modo observamos en el primer día hubo un predominio del 70 % de células con morfología esférica, al 7 día había presencia de un 65 % de células estrelladas y observamos como a los 15 días ya estas células adoptan forma fusiforme en un 31 %. En efecto, se observaron al día 15 células troncales mesenquimales de pulpa dental humana con un núcleo central y amplios citoplasmas con morfología estrellada, numerosas prolongaciones citoplasmáticas elongadas (17).

La SEM reveló buena adhesión y distribución de las hDPSCs en la matriz de APL, lo que indica que las hDPSCs tienen buena adhesión al material sintético de impresión Además, se observó que la presencia de estas células en el interior de la matriz confirmó su penetración en el interior de las matrices.

Muchos investigadores han empleado la técnica de electrospinning para sintetizar andamios biocompatibles y biodegradables. Se han fabricado matrices nano estructuradas de (PLGA) y (PLGA / quitina), compuesta de nanofibras de PLGA y nano partículas de quitina, para examinar sus efectos sobre la adhesión celular y la propagación normal de fibroblastos. Ellos encontraron que la matriz compuesta por PLGA superó la matriz de PLGA / quitina en relación con la adhesión celular y la propagación de los queratinocitos humanos normales. La fabricación de nano fibras de quitosano puro, está limitada por las altas fuerzas de repulsión entre los grupos iónicos dentro de la cadena principal del polímero que pudiera derivarse de la aplicación de un alto campo eléctrico durante electrospinning (17).

El vertiginoso desarrollo tecnológico y el avance de las impresoras 3D de próxima generación con alta resolución y múltiples materiales de impresión están aumentando la velocidad en que las ideas novedosas generan prototipos a ser evaluados en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa así como el reemplazo de órganos enteros. Rosenzweig y colaboradores en el 2015, estudiaron el comportamiento de células del núcleo pulposo vertebral y condrocitos en andamios de APL y ABS impresos en 3D. En esa investigación se analizó la adhesión y el crecimiento celular a los 7, 14 y 21 días por microscopía de contraste de fase. La adhesión de las células fue inmediatamente visible, y el crecimiento de ambos tipos de células fue aumentando a los 7 y 14 días, incluso observaron que después de 21 días las células en medio de cultivo, mantuvieron sus propiedades. Estos datos, sientan un precedente importante para el diseño y la generación de constructos 3D impresos que posean propiedades mecánicas y estructurales estrechamente asimilables a los tejidos nativos. Estos andamios proporcionan un entorno adecuado para el crecimiento celular y la regeneración de la matriz de cartílago en el caso de futuras aplicaciones de reparación de disco. La impresión 3D con estos materiales combinados con el cultivo de células es una puerta de entrada para generar estrategias en ingeniería de tejidos. En este estudio se observó que las células troncales de pulpa dental humana presentaron adherencia *in vitro*, una morfología fibroblastoide con la capacidad de formar Unidades Formadoras de Colonias (17).

En la inmunofenotipificación se expresan los antígenos CD 73+ en un 99,12 %, CD105+ en un 54,70 %, CD73+ en un 91,31 % y presentaron una baja expresión de CD45 10,15 % y CD34

0,50 %. Estos hallazgos en conjunto demuestran, que las células obtenidas del tejido pulpar son células stem mesenquimales, pues cumplen los criterios mínimos establecidos. Sin embargo, vale la pena destacar variaciones en los porcentajes de expresión de los marcadores de las células troncales mesenquimales post criopreservación que se observó en este estudio. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos en otros estudios, pues es posible que sean subpoblaciones heterogéneas de células troncales mesenquimales obtenidas post criopreservación (8,11). Las hDPSCs se emplearon en este estudio por su fácil obtención y como lo reportan otros estudios porque tienen un alto potencial de diferenciación *in vitro*, demostrando de este modo que las hDPSCs son células prometedoras para regeneración tisular (8, 18,19).

La morfología y la adhesión de las hDPSCs sembradas en las matrices de APL, se evaluaron a través de SEM; se observó que las hDPSCs en matrices de APL se adhirieron a los constructos en los 3 tiempos, sin embargo estas células experimentaron un cambio morfológico evidente en las microfotografías. Se observó que la morfología de las células sobre las matrices fue esférica, oval, fusiforme y estrellada. Inicialmente predominaron células con morfología esférica y oval pero a medida que transcurría el tiempo se evidenció un incremento de células con morfología fusiforme y estrellada con prolongaciones citoplasmáticas prolongaciones correspondientes a filopodios y estructuras vesiculares sobre la superficie celular compatibles con vesículas de la matriz, este fenómeno se visualizó a los 7 días de cultivo. La SEM reveló buena adhesión y distribución de las hDPSCs en la matriz de APL. Adicionalmente, se observó secreción de matriz extracelular depositada en la matriz de APL, incluso se presentó proliferación y estiramiento celular, lo que indica que las hDPSCs tienen buena adhesión al material sintético de impresión. Además, se observó que la presencia de estas células en las capas profundas de la matriz confirmó su penetración en el interior de las matrices. La SEM reveló la continuidad de su interconectividad entre las superficies profundas y superficiales de las matrices entre 80-90 % y facilitó la penetración de las prolongaciones celulares de las hDPSCs (20).

En el estudio de Ferlin y colaboradores en el 2015, estudiaron la interacción entre células y un biomaterial subyacente, demostrando ser importante para promover la adhesión, proliferación y función celular. Ha sido previamente demostrado que el resultado en andamios impresos con precisión, con parámetros como el tamaño de los poros, porosidad, y espesor de precisión de hasta un 91 % llegan a promover el intercambio de nutrientes, factores solubles, y señales celulares. Aquí, demuestran la capacidad de lograr una red interconectada de poros de tamaño uniforme impresos con alta reproducibilidad. Adicionalmente, No se encuentran extractos de los productos de degradación que lleguen a inducir significativamente la muerte celular. En nuestro estudio se realizaron pruebas preliminares para implementar el protocolo de cultivo de hDPSCs en matrices dentales en 3D de APL. En efecto, en primer lugar se imprimieron unas matrices en APL cuadrículas con poros interconectados. Esto nos mostró que el APL no solo es no citotóxico, sino que su superficie es lisa, homogénea, con una matriz que presenta poros interconectados de 400 μm de diámetro que permiten el depósito de factores solubles, la colonización de células y posiblemente de vasos sanguíneos. Las hDPSCs no solo se adhirieron a las matrices 3D de APL durante 24 y 48 horas, además penetraron los poros interconectados de las mismas. Esto nos permitió continuar con la impresión de matrices 3D dentales en APL (21,22).

Teniendo en cuenta el referente teórico en ingeniería de tejidos, es fundamental la elección del material, considerando las propiedades de este mismo. Anteriores estudios *in vitro* han destacado que la porosidad y el alto peso molecular del PLGA ofrecen tanto características de

compatibilidad biomecánica como celular, haciéndolo un sustituto osteogénico potencial para el uso en esta disciplina. Tayton y colaboradores en el 2012, demostró en su estudio el potencial de los polímeros sintéticos como sustitutos alogénicos en la ingeniería de tejidos ósea, empleando constructos tridimensionales de PLGA con células stem mesenquimales humanas. Sin embargo, se ha reportado que este polímero puede llegar a presentar una desventaja; ser propenso a deformación por un mecanismo denominado arrastre porque tiende a tener un módulo de elasticidad bajo, por esto se ha creído necesario reforzar los soportes de PLGA con una fase cerámica y se emplee como biocompuesto en la ingeniería de tejidos. Estos hallazgos reportados, crearon la necesidad de comparar el comportamiento de células sembradas en dos tipos de constructos (PLGA y PLGA/HA).

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que los andamios empleados se diseñaron adecuadamente, con morfología de superficie, lo que permite la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Por otra parte, la aparición de estructuras similares a vesículas de matriz en las hDPSCs sembradas en matrices de PLGA/HA con medio completo de cultivo, puede sugerir que este biocompuesto es bioactivo y posee un efecto osteoinductor por la presencia de hidroxiapatita. (10,23). Por lo tanto, hay muchos constructos, incluido el de este estudio, que presentan buena biocompatibilidad y podrían reemplazar los materiales utilizados actualmente en la ingeniería de tejidos. En resumen, el material demostró ser capaz de brindar las características necesarias para la, adhesión celular, sin embargo, se necesitan investigaciones *in vivo* que puedan servir de base para la obtención de nuevos tejidos sintetizados *in vitro* mediante ingeniería de tejidos (14).

El rápido aumento de la fabricación de impresoras 3D y la disponibilidad de múltiples materiales funcionales para uso en tales sistemas están revolucionando el camino de construcción para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Los andamios de APL proporcionan estabilidad mecánica para el desarrollo de nuevos tejidos, se demuestra que las células se adhieren y crecen bien, produciendo una amplia matriz dentro del poro en los andamios (13).

Basándose en el análisis de la literatura existente, y nuestro propio juicio clínico y de investigación, cada vez es más claro que la odontología adoptará nuevos conceptos de la regeneración de tejidos en su práctica clínica. Es probable que estos enfoques implican el uso de terapias basadas en células troncales combinados (o no) con enfoques biomiméticos. Aunque el uso de células trae muchas nuevas oportunidades terapéuticas, y quizás permita el tratamiento de afecciones dentales que no pueden tratarse con materiales y procedimientos actuales, se debe proceder con precaución. Es imperativo para la clínica utilizar procedimientos con células troncales que apoyan sólidamente la investigación básica y traslacional (24)

CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos la capacidad de diseñar y construir prototipos dentales impresos en 3D con APL a los cuales se les pueden adherir hDPSCs. [11] [SEP]

Para la cirugía oral y maxilofacial, periodoncia y endodoncia se evidencia que este tipo de células troncales mesenquimales son una excelente fuente de obtención para emplearlas en terapia celular y en regeneración tisular.

El biomaterial APL no es citotóxico para las hDPSCs por su composición y características biocompatibles, por que las células se adhirieron y proliferaron sobre la matriz dental impresa en 3D. [11] [SEP]

RECOMENDACIONES

Es necesario desarrollar nuevos proyectos de investigación donde se identifique si existe diferenciación celular al momento de ser cultivadas las células en las matrices de APL.

Futuros estudios podrían evaluar el comportamiento del fenotipo y diferenciación celular en los constructos, ya sea por citometría de flujo, qPCR, luminex o western blot en momento específicos, antes, durante y después del cultivo.

REFERENCIAS

1. Munévar J, Becerra A, Hernández A. Biología de las células stem. NOVA - Publicación Científica 2005 Enero; 3(3): 95-108.
2. Flores E, Montesinos J, Mayani H. Células troncales mesenquimales historia, biología y aplicación clínica. Revista de investigación clínica 2006; 58(5):498-511.
3. Owen JJ, Jenkinson EJ, Kingston R. The ontogeny of T lymphocytes. Ann Immunol (Paris) 1983 Jul-Aug; 134D (1): 115-122.
4. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 1974; 2(2): 83-92.
5. Nakata K, Nakahara H, Kimura T, Kojima A, Iwasaki M, Caplan AI, et al. Collagen gene expression during chondrogenesis from chick periosteum-derived cells. FEBS Lett 1992 Mar 16; 299(3): 278-282.
6. D'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. J Exp Zool B Mol Dev Evol 2009 Jul 15; 312B (5): 408-415.
7. Gaitán AJC, Velosa TC, Rodríguez AED, Rodríguez AA, Niño JCM. Células troncales mesenquimales de la papila apical y su papel prometedor en la biología radicular. Revista Mexicana de Estomatología 2017 /01/01; 3(2): 61-74.
8. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Dec 05; 97(25): 13625-13630.
9. Qian J, Xu W, Yong X, Jin X, Zhang W. Fabrication and in vitro biocompatibility of biomorphic PLGA/nHA composite scaffolds for bone tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2014 Mar; 36(1): 95-101.
10. Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Zielins ER, et al. Biomaterials for craniofacial bone engineering. J Dent Res 2014 Dec; 93(12): 1187-1195.
11. Duailibi MT, Kulikowski LD, Duailibi SE, Lipay MVN, Melaragno MI, Ferreira LM. Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. J Mol Histol 2012 Feb; 43(1):89-94.
12. Morales D. Tissue engineering as a pillar of regenerative medicine in dentistry. Rev Cubana Estomatol 2014; 51(3): 288-304.
13. Rasperini G, Pilipchuk SP, Flanagan CL, Park CH, Pagni G, Hollister SJ, et al. 3D-printed Bioresorbable Scaffold for Periodontal Repair. J Dent Res 2015 September; 94(9): 153-157.
14. Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials. J Biol Eng 2015; 9(1): 4.
15. C. Mauth, A. Huwig, U. Graf-Hausner and J-F. Roulet. Restorative Applications for Dental Pulp Therapy. Topics in Tissue Engineering 2007 Enero; 3(3):1-32.
16. Rendón J, Jiménez LP, Urrego PA. Stem cells in dentistry. CES Odontología 2011; 24 (1): 51.

17. Razavi S, Zarkesh-Esfahani H, Morshed M, Vaezifar S, Karbasi S, Golozar MA. Nanobiocomposite of poly (lactide-co-glycolide)/chitosan electrospun scaffold can promote proliferation and transdifferentiation of Schwann-like cells from human adipose-derived stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2015 Aug; 103(8): 2628-2634.
18. Forriol F, Esparza R. Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica. *Trauma (Majadahonda)* 2008 abr-jun; 19(2): 88-101.
19. Quesenberry PJ, Aliotta JM. The paradoxical dynamism of marrow stem cells: considerations of stem cells, niches, and microvesicles. *Stem Cell Rev* 2008 Sep; 4(3): 137-147.
20. Vohra S, Hennessy KM, Sawyer AA, Zhuo Y, Bellis SL. Comparison of mesenchymal stem cell and osteosarcoma cell adhesion to hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 2008 Dec; 19(12): 3567-3574.
21. Ferlin KM, Prendergast ME, Miller ML, Kaplan DS, Fisher JP. Influence of 3D printed porous architecture on mesenchymal stem cell enrichment and differentiation. *Acta Biomater* 2016 Mar; 32(1): 161-169.
22. Rosales-Ibáñez R, Alvarado-Estrada KN, Ojeda-Gutiérrez F. Ingeniería Tisular en Odontología. *Rev ADM* 2012; 69(4): 164-167.
23. Tayton E, Fahmy S, Purcell M, Aarvold A, Smith JO, Kalra S, et al. An analysis of polymer type and chain length for use as a biological composite graft extender in impaction bone grafting: a mechanical and biocompatibility study. *J Biomed Mater Res A* 2012 Dec; 100(12): 3211-3219.
24. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 2011 Jan; 99(1): 1-7.

CORRESPONDENCIA

Álvaro Andrés Rodríguez Sáenz.
alvaro.rodriiguez@outlook.com

Astrid Eugenia Benedetti Canabal.
chachy_benedetti12@hotmail.com

María Alejandra Lozano Macías.
malejaka_19@hotmail.com

Juan Carlos Munevar Niño.
munevarjuan@gmail.com

Jorge Alberto Sarmiento O'Meara.
sarmientojorge@unbosque.edu.co

Roberto Alfonso Gómez Bahamón.
gomezroberto@unbosque.edu.co