



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES.

**“EVALUACIÓN DE LA CITOCOMPATIBILIDAD
Y CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA
DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL
CULTIVADAS EN ANDAMIOS BASADOS
EN POLIURETANO BIODEGRADABLE
Y NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO”**

Emmanuel Gregorio Morelli Becerra

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1130342

Santiago – Chile

2016



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES.

**“EVALUACIÓN DE LA CITOCOMPATIBILIDAD
Y CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA
DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL
CULTIVADAS EN ANDAMIOS BASADOS
EN POLIURETANO BIODEGRADABLE
Y NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO”**

Emmanuel Gregorio Morelli Becerra

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1130342

Santiago – Chile

2016

Este trabajo está cariñosamente dedicado:

A mi familia, en especial a mis padres y hermana,
nido desde donde hoy emprendo el vuelo

Al paciente,
origen y fin de mi vocación de servicio en salud

A mis amigos y amigas,
a todos y cada uno
por llenar mi vida de afecto
y enseñarme la humildad

Y a Dios,
quien a pesar de mi obstinación
sigue guiando mis pasos y sacando lo mejor de mí

Desde la comuna de Recoleta,
en Santiago de Chile.

Junio 2016

AGRADECIMIENTOS

En toda tesis y trabajo hay muchos datos y mucha información. Es un alivio disponer de esta sección, la de agradecimientos, para hacer una pausa, respirar profundo, y mirar atrás en mi camino, para ver a tantas y tantas personas que han entregado de sí hacia mí. Siento el corazón y mi formación personal y profesional lleno de todos ellos.

Gracias a Augusto y Marcela, mis queridos padres, por su compromiso conmigo y la entrega gratuita de tantos años y canas (no tantas canas, ¿eh?) que me han permitido ser la persona que soy, y con mucha libertad. A Mariela, mi hermana, mi compañera de la infancia y de la vida, de tantas aventuras y aprendizajes, que hoy es una gran psicóloga, fiel y disponible siempre.

Gracias a mis abuelos, bueli Meche, tata Juan (hacia el Cielo), tata Augusto y mama María, y a todos mis tíos y tías, primas y primos; mi gran familia.

Gracias al profesor Cristián Covarrubias, tutor de este trabajo y de tantos otros, por su paciencia y disponibilidad permanente, por transmitirme a lo largo de un año, su conocimiento y pasión por la investigación, por su apoyo en los momentos críticos y su exigencia en los momentos fructíferos.

Gracias al gran equipo del laboratorio de Nanobiomateriales. A la Monse y Amaru, compañeros de trabajo constantes y generosos. A Gisse Escobar, por su compromiso con el proyecto y por instruirme en la teoría y la práctica del cultivo celular y sus ensayos. A Carlita Cerca, por su constante ayuda y presencia en el día a día del laboratorio. A Rocío Orellana y Pablo Mendoza, por su asistencia en la microscopía. A María Elena y Flavia, del INTA, por su paciencia al enseñarme los primeros pasos del cultivo celular.

Gracias a la facultad. A tantos profesores, amigos, compañeros y funcionarios que cada día de mi paso por esta bella casa me ayudaron a sentirla Mi Casa, incluso en los momentos más difíciles. Mis más ruidosos agradecimientos al equipo de Trabajos Voluntarios de nuestra facultad, especialmente a Patricio y Pilar, que desde el primer año me incluyeron en sus filas, me acompañaron en todo momento y me vieron crecer, junto a Marco, Gonzalo, Rommel e Ignacio. (Muchos emmanuellis para todos ellos).

Gracias muy especialmente a Lorena Ponce, amiga fiel e incansable de alegrías y pesares, en la carrera y en la vida, presente en todo momento en el camino que hoy culmina, y en muchos caminos que de cerca o de lejos espero siempre compartamos.

Gracias a tantos y tantos amigos. A todos mis amigos de la Parroquia Nuestra Sra. del Rosario, en especial a la familia Espinosa Palau, a Beatrice (mamá espiritual), y a Rodrigo, amigo y padrino de confirmación. A mis amigos de la Vicaría de la Zona Cordillera, a mis amigos de la Parroquia Nuestra Sra. de los Dolores, a la comunidad de Forjadores de Schoenstatt. A tantos sacerdotes y consagrados, y a tantos amigos individuales que la vida me ha regalado, Alvaro, María Paz, Antje, Diana, Karen, Cristóbal, Ana, Patricio (ahijao querido), Pamela, Marité, Claudia, y tantos, tantos más.

Gracias a Paulina, mi polola, por su amor fiel y seguro, y a su familia por su acogimiento y cariño espontáneo y cálido.

Finalmente, gracias a usted, lector(a) de este trabajo, espero que le sea útil en su investigación. Si tiene preguntas de este trabajo puede escribirme a: manugmb@gmail.com.

Afectuosamente para todos,
Emmanuel.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
METODOLOGÍA	20
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	51

RESUMEN

Introducción. Existen múltiples razones por las que a lo largo de la vida de un individuo diferentes cantidades de tejido óseo pueden perderse y generar un defecto. Cuando este defecto es mayor a cierto tamaño, el organismo no es capaz de regenerarlo y puede requerir asistencia externa. El tratamiento más frecuente para los defectos óseos es el autoinjerto, que presenta desventajas y limitaciones en su aplicación, al igual que otras alternativas de tratamiento. La Ingeniería Tisular Ósea (ITO) tiene como objetivo la regeneración de tejidos perdidos que conserven las condiciones morfológicas y fisiológicas del tejido original. Los tres pilares de la ITO son células madre, partículas bioactivas y andamios o scaffolds. En los últimos años, andamios de poliuretano (PU) biodegradable y partículas cerámicas de vidrio bioactivo han mostrado resultados promisorios de viabilidad y diferenciación osteogénica en búsqueda de una combinación que pueda ser aplicada en regeneración ósea *in vivo*, con células madre mesenquimales. En el último tiempo ha sido demostrado que el manejo a nanoescala de estos materiales da mejores resultados que las actuales alternativas en tamaño micrométrico, sin embargo, la evaluación de la viabilidad, comportamiento de adhesión y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales de pulpa dental en estos materiales no ha sido estudiada.

Objetivo. El objetivo de este trabajo es evaluar en forma preliminar la citocompatibilidad de bionanocompósitos (BNC) de PU cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG), y de su capacidad de diferenciación osteogénica de células madre de la pulpa dental (DPSCs).

Material y métodos. Se cultivaron DPSCs de terceros molares incluidos y semi-incluidos, en andamios nanocompósitos de poliuretano (PU) cargados con nanopartículas de nBG, y se evaluó su respuesta celular mediante ensayos de viabilidad cuantitativo (MTS) y cualitativo (AO/PI), adhesión a través de microscopía electrónica de barrido, y el grado de diferenciación osteogénica mediante ensayo cuantitativo (ALP) y cualitativo (NBT/BCIP), que miden el grado de actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP).

Resultados. Andamios nanocompósitos de PU no disminuyeron la viabilidad de DPSCs cultivadas en ellos, medida a diferentes tiempos por MTS. A través

del ensayo de AO/PI se observó que DPSCs cultivadas en PU nBG 5% presentó una levemente mayor densidad de células que los otros andamios. Se observó que el comportamiento de adhesión de DPSCs en andamios nanocompuestos fue más íntimo que el de DPSCs en andamios sin nanopartículas. Los ensayos de diferenciación muestran que la adición de nanopartículas a andamios de PU acelera y aumenta el proceso de diferenciación osteogénica de células madre de la pulpa dental.

Conclusiones: Andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo son citocompatibles, mejoran la adhesión celular y presentan capacidad para acelerar la diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre de la pulpa dental. Estos materiales aparecen como una alternativa promisorio para su futuro estudio como constructo bioactivo en ITO, especialmente en la reducción de tiempos de tratamiento en regeneración ósea.

INTRODUCCIÓN

El sistema óseo humano está compuesto por 206 huesos cuyo componente tisular es altamente dinámico y diverso en su morfología y fisiología, en constante remodelación, y organizado en patrones estructurales de acuerdo a las cargas que recibe (cortical o trabecular). Pese a su complejidad, la estructura interna que lo conforma es relativamente simple, y consta de un componente orgánico (65%), el cual consiste principalmente en fibras de colágeno I, de 25-50 nanómetros (nm) de diámetro, que conforman la matriz extracelular, y uno inorgánico (35%), compuesto por minerales en forma de láminas de apatita carbonatada de 4 nm de diámetro. Esta composición nanométrica es esencial para los requisitos compresivos y de alta resistencia a la fractura que le son característicos al sistema óseo (Kalfas IH y cols., 2001; Brydone AS y cols., 2010; Amini A y cols., 2013).

En el periodo de vida de un individuo, existen múltiples razones que determinan la existencia de un mayor volumen de reabsorción en comparación con el volumen de aposición, y que tienen como resultado la generación de un defecto óseo. Por ejemplo, luego de una exodoncia en los maxilares, el hueso alveolar pierde el estímulo que recibía constantemente de la articulación dentoalveolar (o gonfosis) y que mantiene en equilibrio el proceso dinámico de reabsorción y aposición ósea (Alikhani M y cols., 2015). Este fenómeno que sucede a la extracción de un órgano dentario y que conduce a la subsecuente reabsorción ósea, es conocido como Reabsorción del Rebordado Residual (RRR) y está definido en la literatura como una enfermedad crónica, localizada y dependiente de múltiples factores (Atwood DA., 1971). En Chile, un 79,7% de la población entre 35-44 años de edad y un 69,8% de la población entre 65-74 años de edad, corresponde a pacientes desdentados parciales (Encuesta Nacional de Salud, 2003), mientras que más de un 20% de los adultos mayores de 60 años son desdentados totales. Estos pacientes, por lo tanto, están expuestos a la mencionada reabsorción ósea. Asimismo, entre un 56,44% y un 100% de la población chilena está afectada por enfermedad periodontal (Gamonal J y cols., 1998), la cual también deja como secuela una pérdida irreversible de tejido óseo. Por otro lado, si se considera el sistema óseo general, sólo en Estados Unidos hay una incidencia anual de 100.000 tumores óseos (Méndez I., 2012) cuya exéresis deja defectos óseos de variables

dimensiones, que exceden la capacidad regenerativa y/o reparativa del paciente. Más aún, un 5-10% de los 6 millones de fracturas anuales producidas por trauma, osteoporosis o enfermedad genética en el mismo país, tienen consolidación tardía o no consolidan nunca (Newman MR y cols., 2016).

Considerando lo anteriormente expuesto, se hace fehaciente la necesidad de tratamientos cuyo objeto sea la reposición del tejido óseo perdido tanto en el área máxilofacial como en el sistema óseo general.

La respuesta tisular ósea frente a la pérdida de estructura depende de distintos factores: la especie del individuo, el hueso o tejido afectado, el tiempo desde la injuria, la estabilidad de los fragmentos y la dimensión del defecto generado. Con el propósito de realizar estudios comparables en tejido óseo, desde hace 30 años se utiliza el concepto de “defecto óseo de tamaño crítico” ó “*critical bone size defect*” (CBSD) por su nombre original en inglés, que se define como “el tamaño más pequeño de una injuria intraósea en una especie animal en particular, que no sanará completamente en el periodo de vida del individuo” (Schmitz JP y cols., 1986; Watanabe Y y cols., 2016). En los defectos menores al CBSD, el hueso será capaz de autoregenerarse, y de esta forma restituirse morfológica y funcionalmente en su estructura, mientras que en pérdidas mayores de volumen, como son 8 mm de diámetro y 15 mm de profundidad (defecto en modelo ovino validado), el organismo no será capaz de regenerar por sí mismo el defecto y el tejido que llenará el mismo será cicatrizal (Hutchens SA y cols., 2016; Champion C y cols., 2011). El CBSD es variable de acuerdo a la especie, localización anatómica y grado de compromiso del tejido blando, aunque como consideración general la literatura describe que un defecto óseo alcanza su tamaño crítico cuando su largo supera los 2 centímetros y su diámetro supera la mitad del diámetro del hueso afectado (Watanabe Y y cols., 2016).

Para tratar los defectos óseos que alcanzan o superan el CBSD, en el mundo se realizan anualmente 2,2 millones de cirugías de injertos de hueso, de los cuales la gran mayoría y *gold standard* son los autoinjertos, y en menor proporción, aloinjertos, xenoinjertos y el uso de materiales sintéticos o aloplásticos (Lewandrowski K y cols., 2000). Del mismo modo, otros tratamientos que tienen como objeto ayudar al organismo en la recuperación

del tejido óseo perdido involucran el plasma rico en plaquetas (PRP), las membranas de regeneración ósea guiada, la distracción osteógena, materiales poliméricos y materiales compuestos (o polímeros combinados con partículas inorgánicas) (Peral B y cols., 2008). Estas alternativas de tratamiento para defectos óseos han demostrado una aceptable capacidad reparativa, pero una insuficiente capacidad regenerativa (Lewandrowski K y cols., 2000), entendiéndose por regeneración aquel proceso en que un tejido específico es reemplazado a través de proliferación celular, luego de que se pierde o daña (Mason C y cols., 2008), es decir, comprende la producción de un nuevo tejido con idénticas características morfológicas y funcionales a las del tejido perdido. En este sentido, se debe hacer la diferencia entre este concepto y el de reparación, que corresponde a una “adaptación” del tejido dañado, cuya pérdida se reemplaza por tejido cicatrizal, creando una discontinuidad entre el tejido original y el nuevo (Mason C y cols., 2008).

En relación a la regeneración y reparación ósea, el proceso se divide en tres etapas que se sobreponen entre sí: etapa inflamatoria temprana, etapa reparativa y etapa de remodelación tardía. La primera etapa es inmediata, se extiende por unas horas hasta dos semanas, y resulta en la síntesis de tejido de granulación o cicatrización alrededor del cual comienza la angiogénesis y migración de células osteoprogenitoras (OPG). En la segunda etapa, este tejido se condensa y se llena de cartílago para formar un callo fibrocartilaginoso, quedando como puente de unión entre los límites del defecto o pérdida ósea. Esto ocurre en un periodo promedio de 6 semanas. Este proceso da comienzo a la tercera etapa, en la que el tejido cartilaginoso se mineraliza, completando la formación de tejido óseo, que toma en total un promedio de tres a seis meses, y es guiada por factores de crecimiento tanto endógenos (BMP, CDF, TGF β , BDGF) como exógenos (EGF, FGF, PDGF, TGF α , TGF β) (Kalfas IH y cols., 2001; Hankenson KD y cols., 2015).

De esta forma se promueve un proceso que inicia con la injuria y culmina con la activación y diferenciación de las células osteoprogenitoras presentes en el periostio y endostio sano que rodea al defecto óseo original, el cual finalmente produce nuevo tejido óseo (Kalfas IH y cols., 2001).

Adicionalmente al hecho de que las actuales opciones de tratamiento (en su intento por estimular la osteogénesis) no logran la regeneración del defecto óseo, estos tratamientos tienen otras desventajas; por ejemplo, la necesidad de dos cirugías en el caso de los autoinjertos, junto con su limitado volumen de obtención y complicaciones en el 30% de los casos, que incluyen dolor reportado en el sitio donante, infección y hematoma, entre otras (Lichte P y cols., 2011; Watanabe Y y cols., 2016). Asimismo, presentan algunas limitaciones, como en el caso del PRP, que tienen alto costo económico, y los factores de crecimiento, con una vida media variable en el tiempo (Thor A y cols., 2007). Sin embargo, el aspecto más importante es que aún no es posible alcanzar la regeneración completa del tejido óseo a través de estas opciones, sino que sólo la reparación. Estas limitaciones abren la necesidad de desarrollar nuevas alternativas cuyo objetivo sea alcanzar la regeneración ósea y la restitución morfológica y fisiológica del tejido perdido por el defecto óseo (Ueda M, 2011; Amini A y cols., 2012; Mazzucco L y cols., 2009).

Para tratar los defectos óseos de grandes proporciones que no pueden ser regenerados por el mismo tejido circundante (tamaño crítico de defecto óseo), se hace necesario asistir al tejido óseo en la regeneración y es aquí donde se introducen los injertos óseos y los conceptos de ingeniería tisular (IT) y medicina regenerativa (Amini A y cols., 2013).

La **ingeniería tisular (IT)** es una disciplina desarrollada dentro de la investigación médica y odontológica con proyecciones muy promisorias, específicamente desde la década de 1990, y definida por Langer R y Vacanti JP (1993) como *“aquel campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos u órganos completos”*. Así, la IT se propone con el objeto de regenerar tejidos perdidos y restaurar funciones de órganos y tejidos dañados.

La IT involucra e interrelaciona tres grandes elementos entre sí, que son los pilares de la medicina regenerativa y tienen funciones complementarias (Bottino J y cols., 2012; Sedgley C y Botero T, 2012; Suchánek M y cols., 2012). Estos elementos se describen a continuación:

- a) **Células madre indiferenciadas**, que deben diferenciarse y producir el tejido deseado.
- b) **Señales morfogénicas o partículas bioactivas**, que estimulan a las células madre a diferenciarse a una línea celular específica.
- c) **Andamio o scaffold**, que sostiene y guía la aposición de tejido en las tres dimensiones del espacio.

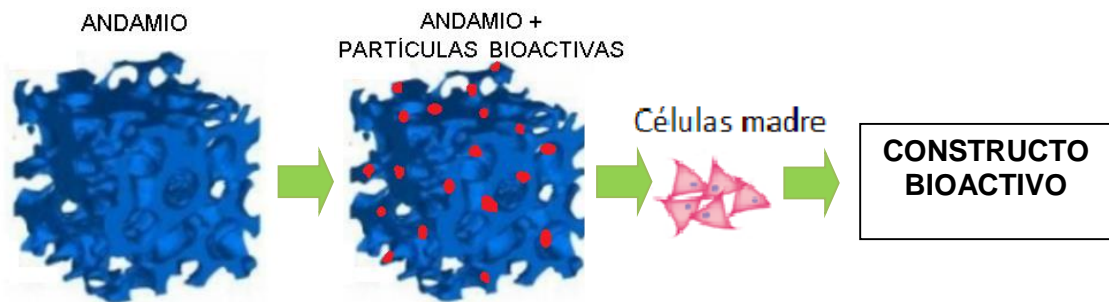


Figura 1. Esquema de la formación de un constructo bioactivo.

Fuente: Elaboración propia.

El objetivo final de estos tres elementos es la formación de un **constructo bioactivo (Figura 1)**, un dispositivo que combina el uso de un andamio con partículas bioactivas en el que se cultivan células madre, y que luego será incorporado en su conjunto al defecto, ya sea inmediatamente después de ser cargado con células madre, o tras un tiempo de incubación y expansión de las mismas, para una producción previa de tejido y/o matriz extracelular (Balanda C, 2013). Esto con el fin de entregarle al constructo los tres atributos principales descritos para regeneración ósea, a saber: osteogénesis, osteoinducción y osteoconductividad (Giannoudis P y cols., 2005).

La capacidad de osteogénesis se refiere a que el constructo contiene células osteocompetentes, que pueden diferenciarse a osteoblastos y producir tejido óseo.

La capacidad de osteoinducción alude a la habilidad de las partículas bioactivas para estimular células (presentes en el tejido circundante al defecto o en el constructo), a diferenciarse a osteoblastos y producir así la regeneración ósea.

Y en tercer lugar, la capacidad de osteoconducción describe el soporte y guía que provee el constructo a los vasos sanguíneos y a la formación de nuevos sistemas de Havers (Lichte P y cols., 2011), con funciones semejantes a la matriz extracelular.

En relación a las **células madre**, Fischbach GD y cols., (2004) las definen como “células clonogénicas capaces de auto-renovarse y diferenciarse en múltiples linajes”. Existen múltiples tipos según su origen, plasticidad y fuente de obtención. Su descubrimiento data de 1868, con el biólogo alemán Haeckel, apareciendo por primera vez en la literatura científica internacional luego de que el histólogo ruso Alexander Maksimov describiera su presencia en la médula ósea, permitiendo el establecimiento de la medicina regenerativa, cuyo objeto es el reemplazo o regeneración de células, tejidos u órganos con propósitos terapéuticos (Bansal R y cols., 2015).

En relación a la clasificación de las células madre según su origen, pueden ser embrionarias (ESCs) o adultas (ASCs). En el caso de las ASCs, existen múltiples tejidos donde se pueden encontrar en pequeñas cantidades, suficientes para mantener cierta capacidad reparativa del tejido donde se ubican. Según su plasticidad, la literatura describe 4 tipos de células madre (Perez M y Lorenti A, 2006): totipotentes, que pueden generar un embrión completo (más de 200 tipos de células distintas) con sus tejidos extraembrionarios, pluripotentes, que pueden dar origen a tejidos específicos de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo, ectodermo). Estos dos tipos mencionados se obtienen casi exclusivamente a partir de un embrión en desarrollo, lo cual trae consigo evidentes planteamientos éticos, con la sola excepción del cordón umbilical, que también permite la obtención de células madre pluripotentes.

Los otros dos tipos de células madre son multipotentes, que pueden generar distintos tejidos, pero sólo de una de las tres capas embrionarias, y unipotentes, que sólo dan origen a una línea celular específica. Kumar R y cols., (2010) hacen la diferencia entre el concepto de “células madre”, las cuales son indiferenciadas, y el concepto de “células progenitoras”, las cuales provienen de células madre, pero tienen características de una línea específica.

Bajo esta definición, las células madre “propriadamente tal” serían sólo aquellas totipotentes y pluripotentes, mientras que las multipotentes y unipotentes corresponderían a células progenitoras, y son las que se encuentran en el individuo adulto (ASCs), con roles reparativos.

Finalmente, las células madre adultas (ASCs) también se pueden clasificar según su fuente de obtención, vale decir, el tejido del cual provienen. Existen ASCs en la médula ósea (*gold standard*), en el cerebro, en la pared de los vasos sanguíneos, en el hígado, en la retina, en la piel, en el páncreas, en los músculos, en la sangre periférica, en el tejido adiposo y en el tejido dentario (Sedgley C y Botero T, 2012).

En el área específica de la IT de tejido óseo o IT ósea (ITO), las células madre que despiertan interés son las células madre mesenquimales (MSCs). Estas por definición se caracterizan por dos propiedades: (i) Renovación constante a través de mitosis, hasta una cantidad mayor al límite de Hayflick, y (ii) la capacidad de diferenciarse a células de la línea mesenquimal, como adipocitos, condroblastos, mioblastos, osteoblastos, etc. (Figura 2).

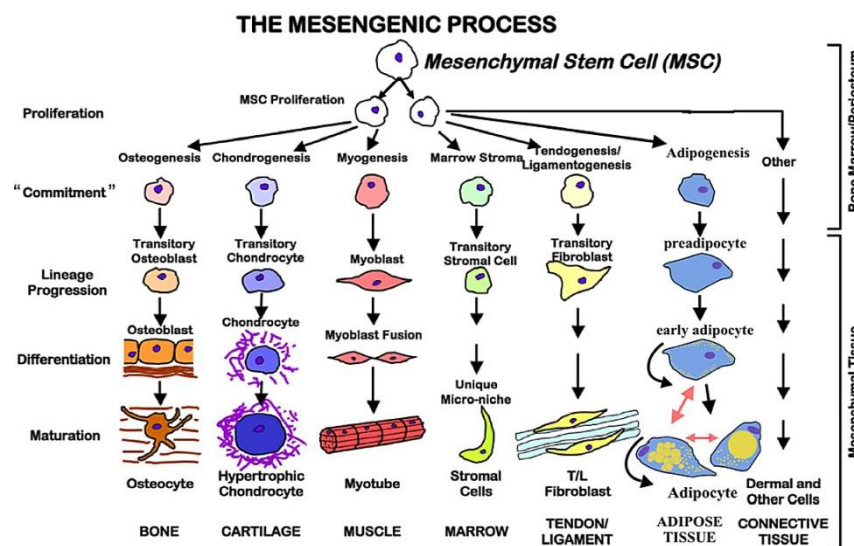


Figura 2. Diferenciación de células madre mesenquimales (MSCs).

Fuente: Bonfield TL y cols., 2010.

En relación a las fuentes de obtención, Phuc Pham Van (2011) realizó una revisión sistemática y resumió todos los tejidos de los cuales se han obtenido

MSCs (**Figura 3**). El acceso a la mayoría de ellos involucra una acción invasiva, vale decir, requieren de una incisión quirúrgica en un sitio sano para acceder a la fuente. En este contexto, destaca la identificación y aislamiento de una población de células odontogénicas progenitoras en la pulpa dental adulta, por Gronthos S y cols., (2000), ya que implica el uso de un tejido con previa indicación terapéutica de extracción. Estas células fueron llamadas células madre de pulpa dental (DPSCs por sus siglas en inglés). Desde su descubrimiento, la investigación en torno a las aplicaciones de las DPSCs ha sido extenso, y pese a que las primeras publicaciones sugirieron una capacidad limitada de tejidos en los que estas células se podrían diferenciar, con los años se ha hecho patente su plasticidad, al punto de regenerar tejido del bazo, pulmonar, muscular, hepático, vascular y neuronal entre otros (Ledesma E y cols., 2016).



Figura 3. Fuentes de obtención de MSCs. Fuente: Elaboración propia.

En el área específica de DPSCs osteocompetentes para Ingeniería Tisular Ósea (ITO), una tesis adscrita a este mismo proyecto analizó distintas variables en relación a la fuente de origen y técnica de aislamiento más apropiada de células aisladas de tejidos dentales, concluyendo que DPSCs aisladas por digestión enzimática a partir de terceros molares incluidos y semi-incluidos, es una alternativa promisorio para aplicación en ITO (Balanda C, 2013).

El segundo pilar de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, en pos de la creación del constructo bioactivo que otorgue al tejido óseo asistencia en su regeneración, son las **partículas bioactivas**, que en términos sencillos, son una alternativa artificial a los factores de crecimiento (GF) dentro del andamio y en contacto con las células madre, con la particularidad de ser más estables en el tiempo que los GF, además de ser una opción más económica. Existen varios ejemplos de estas partículas, su clasificación general las divide en tres tipos de materiales: (i) Fosfatos tricálcicos, como la hidroxiapatita, (ii) Polímeros, como el ácido poliláctico y (iii) los Vidrios Bioactivos, con fórmula general $\text{CaO-SiO}_2\text{-PO}_4\text{-NaO}$, como el Bioglass (BG). Estos materiales han sido ampliamente usados en el tratamiento de defectos óseos como injertos aloplásticos (Best SM y cols., 2008).

De estas partículas, la que mejores resultados *in-vitro* e *in-vivo* ha presentado es el vidrio bioactivo 45S5 (llamado así debido a que tiene un 45% de SiO_2) y comercializado como Bioglass® (BG). A partir de su creación en el año 1969, ha sido el vidrio más investigado en aplicaciones biomédicas (Hench LL, 1998). Su mayor propiedad es ser el primer material artificial de la historia que ha logrado unirse químicamente al hueso, lo cual ha permitido que desde su creación se haya utilizado en más de 1 millón de pacientes para tratar defectos óseos en mandíbula y tratamientos de ortopedia, junto con otros usos conforme a modificaciones, tales como injerto óseo para restituir la audición luego de una infección (MEP®), tratamiento en fusión espinal secundario a una hernia, injerto en reabsorción ósea secundaria a periodontitis severa y también como injerto previo a implante de titanio (PerioGlass®), implante dental (ERMI®), para tratar fracturas de piso de órbita, en una pasta dental para tratar la sensibilidad (NovaMin®), entre otros (Jones JR, 2013). Se ha demostrado la capacidad de los vidrios bioactivos de estimular la neoformación de hueso *in vivo* (Wheeler y cols., 1997; Wheeler y cols., 1998), de promover la proliferación ósea en forma más rápida que la hidroxiapatita (HA) sintética (Oonishi y cols., 1999), de estimular la expresión osteoblástica (Xynos y cols., 2001) y de promover la angiogénesis (Gorustovich y cols., 2010), características que han mantenido a los vidrios bioactivos vigentes por décadas en la biomedicina, y cuya investigación sigue entregando opciones de aplicación a la clínica.

El mecanismo a través del cual el vidrio bioactivo se une químicamente al hueso comienza al ser expuesto a medio fisiológico, y se encuentra ampliamente estudiado, como se presenta a continuación (Jones JR, 2013):

- 1) Rápido intercambio de iones Na^+ y Ca^{2+} por H^+ del medio, creando enlaces Si-OH en la superficie del material. El pH de la solución aumenta y se forma un área rica en sílice cerca de la superficie del vidrio. El fosfato también se disuelve en el medio acuoso.
- 2) El pH básico conlleva a un ataque a la red silicada en la superficie del vidrio, y a la ruptura de los enlaces de Si-O-Si, liberándolos al medio en forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$, dejando más grupos Si-OH en la interfase medio-material.
- 3) Conforme estos grupos (Si-OH) se acumulan en la superficie, se condensan y repolimerizan la capa rica en sílice, dejándola porosa.
- 4) Se produce migración de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} hacia la superficie del vidrio, formando una película amorfa de fosfato de calcio a través de la capa rica en sílice, a la cual se integran proteínas sanguíneas, factores de crecimiento, colágeno y otros elementos biológicos. En este momento, ha pasado alrededor de una hora desde la exposición del material al medio fisiológico.
- 5) Entre 2 y 5 horas después (*in vitro*), el fosfato de calcio cristaliza hacia una capa de apatita hidroxycarbonatada (HCA), la cual forma la capa descrita como responsable de la unión química al hueso.
- 6) Al continuar la reacción, más iones de Na^+ y Ca^{2+} son liberados desde el material, permitiendo la formación continua de capas de HCA, una al lado de la otra, hasta alcanzar un grosor de alrededor de 100 μm .

Toda esta reacción toma aproximadamente 12-24 horas desde la implantación del material, tiempo tras el cual las células osteogénicas (sean osteoblastos o

MSCs), “se encontrarán” con un material biológico como es la hidroxiapatita y se adherirán a éste en un tiempo promedio de 24 a 72 horas, y los productos de disolución del material estimularán la dirección osteogénica (Greenspan DC, 1999).

El vidrio bioactivo se ha encontrado en el mercado por varias décadas y ha significado un amplio avance en las opciones terapéuticas para los defectos óseos. El formato en el que está vigente en el comercio es una presentación con tamaño de partícula de dimensiones micrométricas: Bioglass® (100-300 μm), Perioglass® (90-710 μm), Biogran® (300-355 μm), entre otros (Jones JR, 2013). En los últimos años, la literatura ha reportado las ventajas del uso de partículas cerámicas bioactivas en una **escala nanométrica**, principalmente del vidrio bioactivo. Misra SK y cols., (2008) y Schneider y cols., (2008) reportaron que la incorporación a nanoescala de rellenos en una matriz polimérica mejora las propiedades mecánicas y propiedades superficiales del andamio (nanotopografía, humectabilidad, etc), mientras que Misra SK y cols., (2009) describieron que la presencia de partículas nanométricas (10-20 nm) de vidrio bioactivo en andamios aumentó significativamente la rugosidad de los mismos, otorgando mayor humectabilidad y citocompatibilidad en distintos polímeros (Loher S y cols., 2006). Asimismo, dos tesis adscritas a este mismo proyecto han corroborado las ventajas de la incorporación de nanopartículas bioactivas en andamios: Arroyo F (2013) demostró que un tamaño nanométrico entrega mejores propiedades bioactivas que una nanoporosidad interna en andamios con MSCs, mientras que Celhay I (2014) describió que andamios cargados con nanopartículas cerámicas (especialmente vidrio bioactivo) presentan propiedades *in vitro* adecuadas para su potencial uso en ITO, debido a la mayor razón de aspecto (relación entre área superficial v/s volumen de partícula) de los materiales nanométricos.

Desde la primera década del 2000, la nanotecnología y el trabajo a nanoescala de los materiales en general, ha abierto un amplio camino en la industria y la medicina para el mejoramiento de la calidad de vida de las personas, llegando a estar en la vida diaria, desde el procesamiento de alimentos hasta la construcción arquitectónica y la energía, pasando por la administración de fármacos, el diagnóstico de enfermedades y la ingeniería de tejidos. La biología

en general y el tejido óseo en particular han demostrado responder mejor a materiales artificiales trabajados en escala nanométrica, especialmente en lo que se refiere a la ITO y al trabajo con vidrio bioactivo nanométrico (nBG) (Hench L y cols., 2015).

En trabajos más recientes, Covarrubias C. y cols., (2015b) mostraron que vidrio bioactivo nanométrico (nBG, con tamaño promedio de partícula 70 nm) estimula mayor cristalización de apatita en suero fisiológico (SBF), a 24 horas, atribuido a su mayor área superficial, mayor tasa de degradación, formación más rápida de HCA, y concluyeron que las propiedades de nBG son promisorias para una regeneración ósea más rápida y para ser aplicadas en ITO.

El tercer pilar de la IT son los **andamios o scaffolds**, definidos por Lichte P y cols., (2011) como “dispositivos tridimensionales temporales utilizados para guiar la regeneración ósea”, los cuales idealmente deben estimular los mecanismos propios del organismo para la regeneración. Dado que serán ubicados en el sitio del defecto óseo, para su uso en ITO los andamios deben cumplir con funciones de carga y sostén inherentes al mismo tejido, y de hecho, cercanas a las que otorga la matriz extracelular al hueso sano. Hollister SJ y cols., (2011) clasificaron en 4 los aspectos técnicos más importantes que deben cumplir los andamios para ITO, resumidas en las “**4 F**”:

- Forma (para llenar el defecto)
- Función (capacidad de resistir carga)
- Fijación (que haya interfase e interconexión con tejido)
- Formación (de tejido óseo).

Asimismo, las publicaciones han definido que las propiedades que debe cumplir un andamio óptimo para ITO (Lichte P y cols., 2011; Billström y cols., 2013; Jones JR, 2013) son:

- Bioactividad
- Biocompatibilidad (del material y sus productos de disolución)
- Tasa de degradación igual a tasa de síntesis de tejido
- Unión y absorción celular
- Resistencia mecánica

- Porosidad interconectada
- Flexibilidad
- Posibilidad de ser esterilizado
- Posibilidad de ser producido en masa
- Adoptar la forma del defecto

Para la fabricación de andamios se han usado múltiples materiales naturales y sintéticos (metales, cerámicas, polímeros y compósitos), dentro de los cuales, los polímeros son los que han tenido los resultados más promisorios (Lichte P y cols., 2011). Los polímeros de origen natural más usados son los polisacáridos (gelatina, quitosano, celulosa, etc) y las proteínas (colágeno, fibroína de la seda), con propiedades como su capacidad de reabsorción, baja toxicidad y costo económico, y desventajas como poca posibilidad para controlar la degradación, riesgo de transmitir infección y de producir rechazo inmune (Janik H y cols., 2015). Los polímeros de origen sintético más usados son los poliésteres, especialmente el ácido poliglicólico (PGA), poliláctico (PLA) y su copolímeros (PLGA), y superan parcialmente a los polímeros naturales (Jones JR, 2013). Sin embargo, aún con estos materiales sintéticos no es posible crear un andamio con las propiedades mecánicas y de bioactividad necesarias para ITO, debido a su carácter fino, falta de unión al hueso (Wang L y cols., 2009), y debido a que su degradación por hidrólisis de enlaces ésteres genera productos de disolución ácidos, que provocan una importante inflamación local (Janik H y cols., 2015). Además, al ser materiales hidrofóbicos, presentan poca adhesión celular e interacción (Place ES y cols., 2009).

Además del material del que se fabrican, los andamios pueden diferenciarse por su porosidad interna, tamaño de poro y estructura de superficie, la cual cuando es rugosa mejora la adhesión, proliferación y adhesión celular (Wang L y cols., 2009). La porosidad y el tamaño de poro son importantes para permitir el ingreso de nutrientes en el constructo bioactivo y con ello el crecimiento celular y la aposición de tejido (Campion C y cols., 2011). Watson JT y cols., (2015) destacan que la formación de tejido osteoide requiere un tamaño mínimo de poro de 100 μm , con un ideal de tamaño entre 300 y 500 μm , al mismo tiempo de que exista conectividad entre los poros dentro del andamio, para evitar la formación de espacios ciegos y permitir el crecimiento vascular y

la fluida circulación de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento (Lichte P y cols., 2011).

Dentro de los polímeros sintéticos, y como alternativa a los andamios de poliéster, han aumentado paulatinamente en los últimos años las investigaciones en torno a copolímeros de poliuretano (PU), del cual se describe una buena flexibilidad, biodegradación y citocompatibilidad (Wang L y cols., 2009), además de un considerable rango de propiedades físico-químicas (Tsai MC y cols., 2015), lo cual permite que su uso en la medicina esté ampliamente establecido, por ejemplo en válvulas cardiacas, membranas de diálisis, implantes mamarios, injertos aórticos y adhesivos óseos (Gogolewski S, 1997; Lamba MK y cols., 1998), y si bien hay efectos tóxicos reportados de los productos de disolución del PU en medio fisiológico, estos pueden ser significativamente reducidos reemplazando agentes aromáticos por agentes alifáticos o cíclicos (Wang L y cols., 2009; Agüero A, 2016). Durante la copolimerización, el PU adquiere consistencia espumosa, lo cual permite la fabricación de un andamio poroso. La estructura segmentada del PU es única, y permite la incorporación de elementos puros y aditivos, dando un rango de posibilidades en la variación de sus propiedades físicas y químicas, que se traducen en degradación, resistencia mecánica, etc. (Janik H y cols., 2015), presentándolo como una alternativa viable de andamio para ITO.

En una revisión sistemática Janik H y cols., (2015) afirman que la porosidad del andamio de PU ideal es del orden del 90% con un tamaño de poro de máximo 200-400 μm cuando es utilizado en hueso. Estas características dependen tanto del material como de su método de fabricación, los cuales pueden variarse para asemejar la degradación del PU a la tasa de formación de tejido óseo, así como para mejorar su citocompatibilidad y adhesión celular (Guelcher S y cols., 2007).

Considerando todas estas condiciones, la mayor dificultad al momento de escoger el andamio más apropiado para ITO es encontrar el material que otorgue la suficiente resistencia mecánica (existencia de poros v/s capacidad de sostén) a la vez que iguale su tasa de degradación en medio fisiológico con la tasa de formación de tejido óseo (Jones JR, 2013). Para vencer estas dificultades, la comunidad científica ha probado unir las propiedades de las

partículas bioactivas con las de los andamios, y una de las más importantes creaciones ha sido la de los biocompósitos. Estos son matrices de polímeros biodegradables combinados con partículas bioactivas como relleno, manteniendo ambas partes su individualidad. Al igual que con las partículas bioactivas, en los últimos años la investigación en torno a andamios en formato nanométrico ha ido creciendo paulatinamente, y del mismo modo, los andamios poliméricos tradicionales se pueden fabricar a nanoescala y combinar con nanopartículas bioactivas para producir nanocompósitos bioactivos o **bionanocompósitos** (BNC).

En relación a esto último, el uso en ITO de PU en formato nanométrico, no ha sido tan estudiado. Hung KC y cols., (2014) modificaron el PU para reducir su carácter hidrofóbico en condrocitos, concluyendo que la versatilidad del PU nanoparticulado lo hace candidato para usos biomédicos, mientras que Tsai MS y cols., (2015) probaron andamios de PU en nanopartículas comparándolas con andamios de PLA de acuerdo su capacidad de diferenciar MSCs a condroblastos, concluyendo que con el PU nanoparticulado se obtiene mejor respuesta celular y Kuo YC y cols., (2014) sugirieron que andamios de PU en nanofibras podrían ser ventajosos para IT ósea y de cartílago.

En trabajos previos del proyecto en el cual se enmarca esta tesis, se ha estudiado un tipo de andamio nanocompósito basado en poliuretano cargado con partículas nanométricas de vidrio bioactivo en diferente concentración (Agüero A, 2016). Aquí se desarrolló un método de preparación de andamios nanobiocompósitos a base de PU biodegradable, en donde las nanopartículas son incorporadas de manera "in situ" durante la reacción de polimerización, y a baja temperatura ($\approx 400^{\circ}\text{C}$), en contraste con los 1300°C de preparación del Bioglass®, lo cual mejora la bioactividad y bioreactividad de las nanopartículas (Celhay I, 2014; Kim H y cols., 2000). Estos nanocompósitos han probado su capacidad para inducir la formación de HA tipo ósea en medio fisiológico simulado (Covarrubias y cols., 2015a); sin embargo, la respuesta de células madre mesenquimales frente a estos materiales nanocompósitos no ha sido evaluada. Para propósitos de IT y medicina regenerativa, es necesario que el andamio bionanocompósito o BNC sea citocompatible e idealmente que pueda presentar actividad de diferenciación osteogénica (Tsai MC y cols., 2015), para

así integrarlo como elemento dentro del constructo bioactivo. La presencia de las nanoparticulas de BG en el andamio de PU podría afectar la viabilidad y adhesión celular, así como impartirle al material propiedades para inducir la diferenciación osteogénica de las células madre.

Basado en los antecedentes expuestos, en el presente trabajo se realizará una evaluación preliminar de la citocompatibilidad de los bionanocompuestos de PU cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG), y de su capacidad de diferenciación osteogénica de células madre de la pulpa dental.

2. Hipótesis

Andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo son citocompatibles y presentan capacidad para estimular la diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre de la pulpa dental.

3. Objetivo General

Evaluar la citocompatibilidad de andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo y su capacidad para estimular la diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre de la pulpa dental.

4. Objetivo Específicos

1. Determinar la viabilidad de DPSCs cultivadas con andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nBG.
2. Conocer el comportamiento de adhesión de DPSCs en la superficie de los andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nBG.
3. Determinar la capacidad de diferenciación osteogénica de DPSCs cultivadas con andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nBG.

5. Metodología

El presente estudio es de carácter experimental e *in vitro*. Se llevó a cabo en el laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los bionanocompósitos utilizados fueron preparados en proyectos previos en el mismo laboratorio. Las células madre mesenquimales fueron aisladas durante este trabajo, según se describe a continuación, a partir de la pulpa de terceros molares incluidos o semi-incluidos de pacientes de 18-25 años de edad, con cirugía planificada por motivos externos a este estudio y con el debido consentimiento de los pacientes donantes.

5.1 Aislamiento de células madre.

5.1.1 Recolección de muestras de dientes.

Se realizó el aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales a partir de la pulpa dental de terceros molares incluidos y semi-incluidos extraídos de pacientes de 18-25 años de edad que ingresaron a la clínica odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile durante el año 2015, para su extracción en los pabellones de la misma, de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Ético y Científico de dicha facultad (Anexo I). El tejido pulpar de cada tercer molar extraído fue aislado y cultivado individualmente.

Las muestras dentales que calificaron para ser procesadas se depositaron en una solución compuesta por medio de cultivo α -MEM, el cual contiene nutrientes específicos detallados por el fabricante (Hyclone), suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina y 0,25 μ g/ml de anfotericina B, y fueron transportadas a 4°C al laboratorio de Nanobiomateriales, según protocolo descrito anteriormente por Balanda C (2013).

Criterios de inclusión

Para calificar y poder ser procesados, los terceros molares extraídos debieron estar sanos, libres de caries y enfermedad periodontal, e íntegros, vale decir que durante la cirugía no sufrieran odontosección para su extracción. Asimismo, sólo se incluyeron en este estudio los dientes de pacientes que

firmaron libre y voluntariamente el consentimiento informado (anexo II), antes de ingresar a pabellón.

Criterios de exclusión

Los dientes que sufrieron odontosección durante la extracción, aquellos que se encontraban afectados por caries o enfermedad periodontal, los que presentaron su ápice cerrado, o estaban asociados a algún proceso infeccioso, no calificaron para ser procesados. Del mismo modo, aquellos pacientes que prefirieron abstenerse de participar, fueron excluidos de la toma de muestras.

5.1.2 Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales

Lo más cercanamente posible al tiempo post-extracción (tiempo menor a 24 horas), se realizó la sección del tercer molar para obtención de la pulpa dental, mediante disco de corte carborundum en un motor eléctrico Dremel modelo 300-N, previo lavado con alcohol al 70% y retiro de restos de capuchón pericoronario y ligamento periodontal. El aislamiento de células madre (DPSCs) se realizó mediante el método de digestión enzimática (ver anexo III), el cual consiste en incubar el tejido pulpar extraído del molar seccionado, en una solución de enzima colagenasa tipo I y dispasa tipo II, con una concentración de 1 mg/ml en medio de cultivo alfa-MEM. El tiempo de esta digestión fue de 90 minutos en condición de 37 °C y 5% de CO₂, con agitación cada 20 minutos, de 30 segundos de duración. Transcurrido el tiempo de digestión enzimática, se realizaron dos centrifugaciones consecutivas (a 1500 ppm), luego de las cuales el tejido pulpar tratado se sembró en placas de Petri plásticas para cultivo celular, de 35 mm de diámetro (marca: Nunc), con medio de cultivo α-MEM suplementado (SBF al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycinina) para la incubación y crecimiento celular, según protocolo modificado a partir de Seo BM y cols., (2004) y Seo BM y cols., (2005), en una incubadora en condición de 37 °C y 5% de CO₂.

Conforme la confluencia celular alcanzaba el 80-90% de la placa, se realizó el cambio consecutivo primero a una placa de 60 mm (**Figura 4**) y luego a una de 100 mm de diámetro, según protocolo descrito en anexo IV, usando siempre medio α-MEM suplementado.

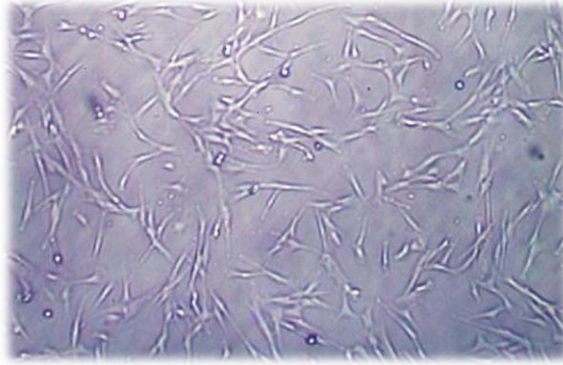


Figura 4. DPSCs cultivadas en placa de 60 mm.

5.2. Bionanocompósitos

Las nanopartículas y andamios nanocompósitos que se utilizaron en este trabajo de tesis fueron preparados y caracterizados estructuralmente en etapas anteriores del proyecto de investigación (Agüero A, 2016); lo esencial de la fabricación de ellos se describe brevemente a continuación.

5.2.1 Nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG)

Se utilizaron nanopartículas de vidrio bioactivo que fueron preparadas a través del método sol-gel, compuesto por tres etapas y descrito en Hong Z y cols. (2009). Para obtener una mayor bioactividad se usó la siguiente composición molar: $58\text{SiO}_2:40\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5$ (Valenzuela F y cols., 2012).

5.2.2 Bionanocompósitos de Poliuretano

Los bionanocompósitos de PU que se utilizaron fueron preparados mediante el método *in situ* con formación de espuma simultánea, con agentes no tóxicos y seguros, entre ellos el diisocianato alifático de isoforona (IPDI), que al reaccionar en el PU permitió la liberación de CO_2 permitiendo la expansión del PU, creando una esponja. Se mezclaron el aceite de ricino y las nanopartículas (nBG) en los porcentajes de 2,5% y 5% del peso total del polímero, de tal modo que estas quedaron incorporadas en la red del polímero (**Figura 5**) (Agüero A, 2016).

Bionanocompósitos de PU puro (sin nanopartículas) se incorporaron dentro de los ensayos, como control.

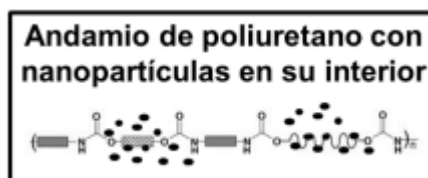


Figura 5. Esquema del bionanocompuesto, con las nanopartículas incorporadas en la red del polímero. Fuente: Agüero A, 2016.

5.3 Cultivo celular de andamios nanocompuestos.

5.3.1 Corte, esterilización y acondicionamiento de los scaffolds

Los bionanocompuestos preparados fueron cortados en dimensiones estándar usando hojas de bisturí y luego esterilizados mediante radiación gamma en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN). Posteriormente, con el propósito de liberar elementos de disolución que puedan ser tóxicos para las células, los andamios bionanocompuestos se dispusieron en el fondo de los pocillos de una placa de cultivo celular de 48 pocillos, en triplicado, y fueron acondicionados en medio de cultivo α -MEM no suplementado, durante 24 horas con cambio de medio cada 3-4 horas, antes de cultivar con DPSCs (**Figura 6**).

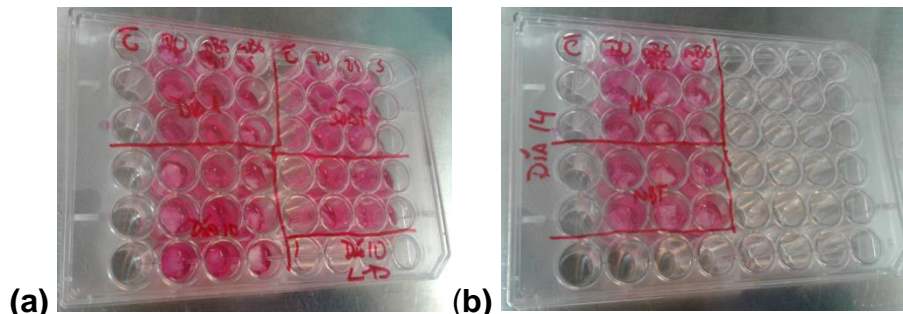
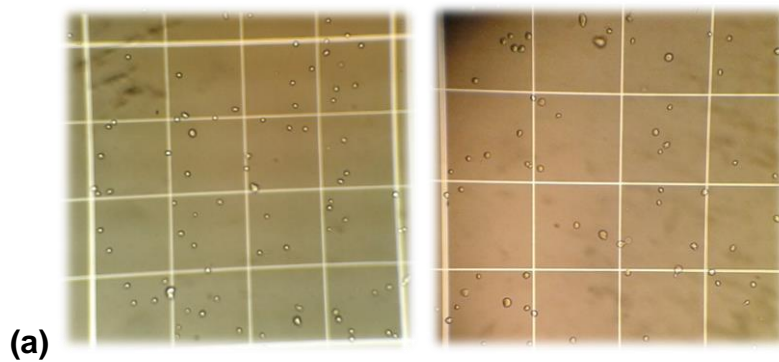


Figura 6. Acondicionamiento de nanocompuestos de PU, previo a cultivo con DPSCs para ensayos de viabilidad **(a)** y diferenciación **(b)**.

5.3.2 Cultivo celular

Luego de acondicionar los andamios nanocompuestos, se dispuso de las DPSCs en solución, a partir de placas de cultivo de 100 mm de diámetro con (aprox 1.5×10^6 células), y en cada uno de los pocillos se sembraron 15.000 células con 500 μ L de medio α -MEM suplementado (lo suficiente para cubrir completamente el andamio). Para contar las células se utilizó una cámara de Neubauer (marca: Marienfield) (**Figura 7a**), y se aplicó la fórmula indicada por el fabricante (**Figura 7b**).



(a)

$$\text{N}^{\circ}\text{células} / \text{Vol. solución} = \frac{\text{N}^{\circ}\text{células vivas}}{\text{N}^{\circ}\text{ de cuadrantes contados}} \times \text{factor de dilución} \times 10.000$$

(b)

Figura 7. Cuadrantes de la cámara de Neubauer **(a)** y fórmula utilizada para calcular el total de células en suspensión **(b)**.

5.3.3 Viabilidad celular

La viabilidad y proliferación celular sobre los bionanocompuestos fue evaluada cuantitativamente luego de 1, 7, 10 y 14 días de incubación utilizando el KIT CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), según las instrucciones del fabricante (Anexo V), tras lo cual se realizó la medición de absorbancia del sobrenadante a 492 nm en un lector de placa ELISA. La absorbancia observada corresponde al formazán, producto formado de la reducción del reactivo MTS por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables presentes en el cultivo.

Como complemento, la viabilidad celular también se evaluó cualitativamente mediante ensayo con el AO/PI Cell Viability Kit ® (Logos Biosystems) en un microscopio de fluorescencia Nikon modelo Eclipse Ti-E, en donde las células viables fluorescen de color verde, mientras que las células muertas lo hacen de color rojo. Para este ensayo se adaptó la técnica del fabricante con el objeto de ser ocupado en el microscopio de fluorescencia, según se resume a continuación:

- El fabricante indica la suspensión de las células (previa centrifugación) en medio, tomar 18 µL, mezclar con 2 µL de reactivo y disponer en el lector (Cellometer Vision AB), que realiza medición cuantitativa de las células vivas, junto con dar imagen de fluorescencia.

- La adaptación que se realizó de esta técnica consistió en re-suspender el pellet de células en 200 μL de PBS (incoloro) y aplicarle 20 μL del reactivo (respetando proporción \approx 1:10 del reactivo en relación a la solución). Esto permitió que se pudieran observar las células en el microscopio de fluorescencia, y determinar cualitativamente la viabilidad, como muestra la **Figura 8**.

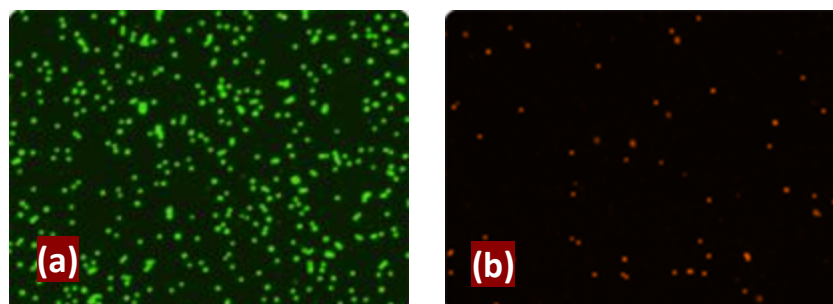


Figura 8. Células fluorescentes luego de aplicar reactivo AO/PI.

(a) Células vivas nucleadas teñidas con Naranja Acridina.

(b) Células nucleadas muertas teñidas con Ioduro Propidium.

5.3.3 Análisis de adhesión celular

Para aquellos materiales que resultaron citocompatibles, se evaluó la adhesión celular de las DPSCs en su superficie. Para este propósito, luego de 3 horas de incubación del andamio nanocompósito con las células ($n= 15.000$), las muestras fueron fijadas en 2,5% de glutaraldehído, deshidratadas progresivamente en etanol al 70%, secadas con CO_2 supercrítico (sistema de deshidratación celular con CO_2 gaseoso), y recubiertas con oro para la observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), en un microscopio Jeol, modelo JSM-IT300.

5.3.4 Diferenciación osteogénica

5.3.4.1 Ensayos de actividad de Fosfatasa Alcalina.

La capacidad de diferenciación osteogénica de las DPSCs cultivadas en los andamios nanocompósitos se evaluó cuantitativamente midiendo la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). Para este propósito, las DPSCs se cultivaron en los andamios durante 7, 10 y 14 días con medio de cultivo α -MEM suplementado, sin la adición de suplementos osteogénicos. Completado el

tiempo de cultivo, el medio se retiró y las DPSCs cultivadas en los bionanocompuestos se fijaron en una solución de 90% de etanol y 10% de formaldehído (cuya concentración es de 37%) durante 30 segundos, tras lo cual se lavaron con una solución tampón fosfato salino (TBS) y se agregó el reactivo en buffer de reacción, según consta en anexo VI. El principio de la medición cuantitativa de la actividad de ALP se esquematiza a continuación:

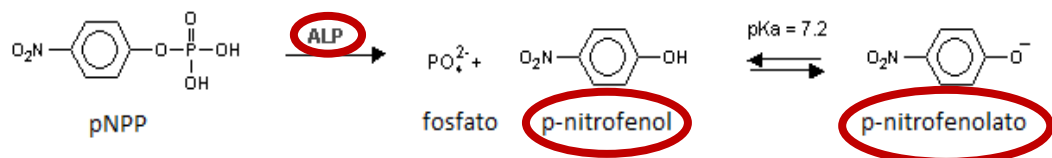


Figura 9. Reacción de hidrólisis del pNPP en presencia de ALP.

Las células fijadas se incubaron con fosfato de p-nitrofenol a pH básico (pNPP, incoloro) durante 20 min a 37 °C, tiempo durante el cual el pNPP es lisado en presencia de ALP, liberando p-nitrofenol, que en condiciones fisiológicas pierde un protón generando p-nitrofenolato, de color amarillo. La cantidad de p-nitrofenolato generado es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina, y se midió por absorbancia a 405 nm en un lector de placa ELISA.

La actividad de ALP también se analizó cualitativamente mediante el ensayo con la tinción Nitroazul de tetrazolio (NBT) -5-bromo-4cloro-3-indolilfosfato p-toluidina (BCIP) (Promega). La fosfatasa alcalina secretada por las células en actividad osteogénica produce la escisión del grupo fosfato de BCIP. Este BCIP desfosforilado se oxida en presencia de NBT, formando un precipitado insoluble azul índigo oscuro. Al mismo tiempo, el NBT reducido forma otro precipitado azul oscuro que intensifica y hace más sensible la tinción, que fue observada en un microscopio óptico para determinar si hubo actividad de fosfatasa alcalina. La **Figura 10** muestra el esquema de la reacción.

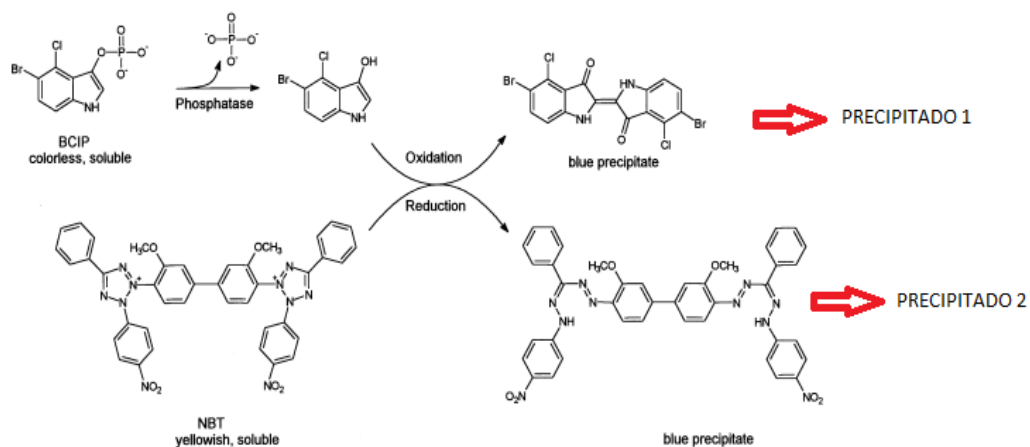


Figura 10. Esquema de formación de precipitados en reacción de NBT/BCIP por actividad de ALP. Fuente: Roche.

5.4 Análisis estadístico

Los valores de absorbancia de los reactivos de MTS y ALP conformaron los datos cuantitativos. Para corroborar la normalidad de la distribución de estos datos se aplicaron las pruebas estadísticas de Kolmogorow- Smirnov y Shapiro Wilk, con el programa estadístico IBM SPSS, versión 21.0. Una vez comprobada la normalidad de los datos, se aplicó test de ANOVA y luego la prueba HSD de Turkey, para comparaciones múltiples a un mismo tiempo y, para comparaciones en los diferentes tiempos. Se utilizó un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

6. Resultados

Los resultados se expondrán en relación a los objetivos planteados para el trabajo, como sigue a continuación.

6.1 Viabilidad celular

6.1.1 Ensayo MTS

La **Figura 11** grafica la absorbancia obtenida viendo el reactivo MTS para los andamios en cuatro tiempos distintos. Se observa la presencia de viabilidad celular en todos los tiempos y para todos los andamios. A 1, 7 y 14 días no hay diferencias estadísticamente significativas entre los materiales. A 10 días se observan diferencias estadísticamente significativas entre DPSCs y DPSCs + PU puro, así como entre DPSCs y DPSCs + PU nBG 5%. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre DPSCs + PU puro y DPSCs + PU nBG 5% a 10 días ($p < 0,05$).

Considerando el mismo grupo en los distintos tiempos, se observa que para cada muestra la evolución de la viabilidad en el tiempo es significativamente mayor ($p < 0,05$), excepto en el tiempo de 10 a 14 días, donde ninguna de las muestras de DPSCs cultivadas en andamios mostró diferencias significativas de viabilidad por el ensayo de MTS.

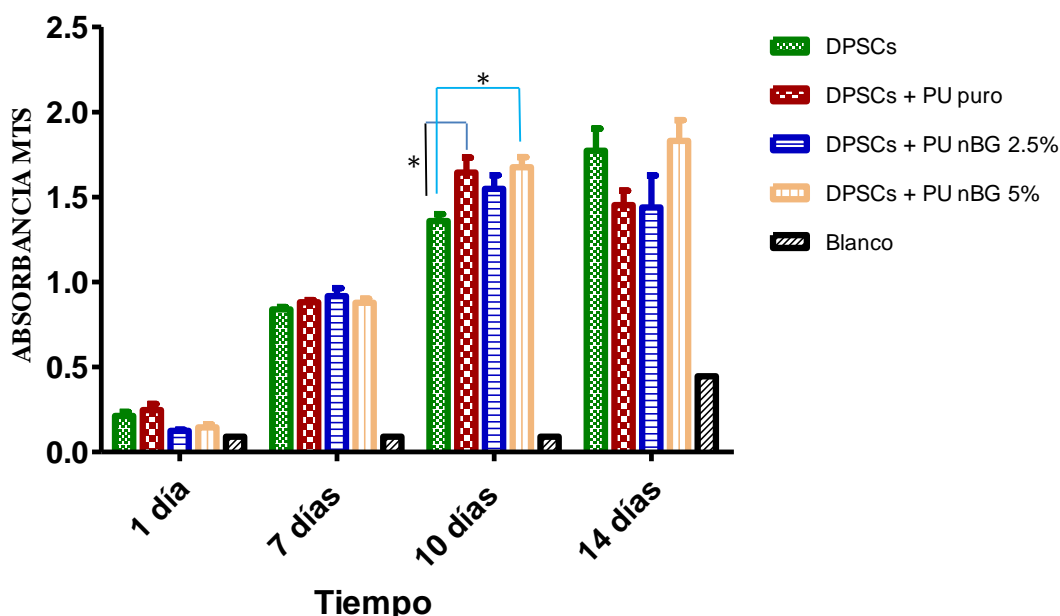


Figura 11. Viabilidad cuantitativa de DPSCs en andamios. Valores de absorbancia de ensayo de viabilidad celular MTS, medida a 492 nm, de DPSCs cultivadas con los diferentes materiales en función de cuatro tiempos de incubación. Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos estudiados ($p < 0,05$).

6.1.2 Ensayo AO/PI

La **Figura 12** muestra imágenes de fluorescencia mediante el ensayo AO/PI, mostrando la viabilidad de las DPSCs a los 7 días de incubación en los 3 tipos de andamios.

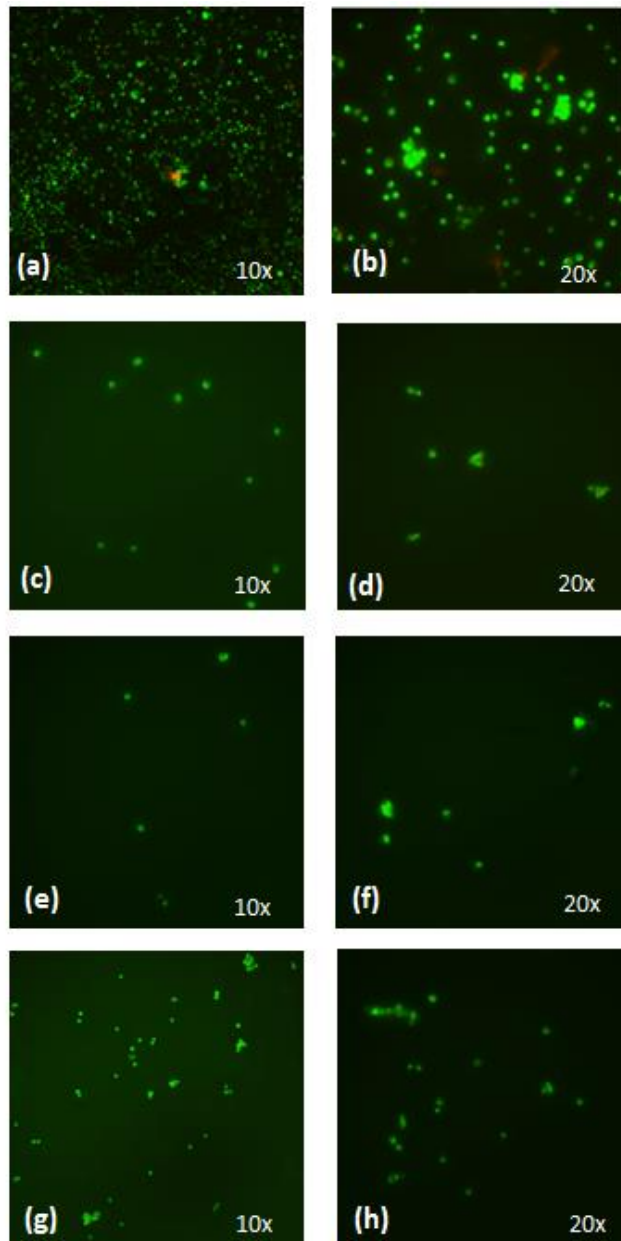


Figura 12. Viabilidad cualitativa de DPSCs en andamios. Fotografías de fluorescencia mediante ensayo de viabilidad AO/PI de DPSCs cultivadas luego de 7 días; **(a)** y **(b)**, y cultivadas en presencia de PU puro; **(c)** y **(d)**, PU nBG 2,5% **(e)** y **(f)**, y PU nBG 5% **(g)** y **(h)**.

Las células vivas fluorescen de color verde y las muertas de color rojo. Se puede observar la presencia de células viables después de 7 días, además de la ausencia de células muertas en cada uno de los andamios. Comparados con las DPSCs sin andamio, las células cultivadas en andamios presentan menor densidad. Se observa una densidad similar de las células en cada andamio

comparado con los otros dos, con probablemente mayor cantidad de células en el andamio PU nBG 5%.

6.2 Adhesión celular.

La **Figura 13** muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido de las DPSCs en la superficie de los tres tipos de andamios, luego de tres horas de incubación.

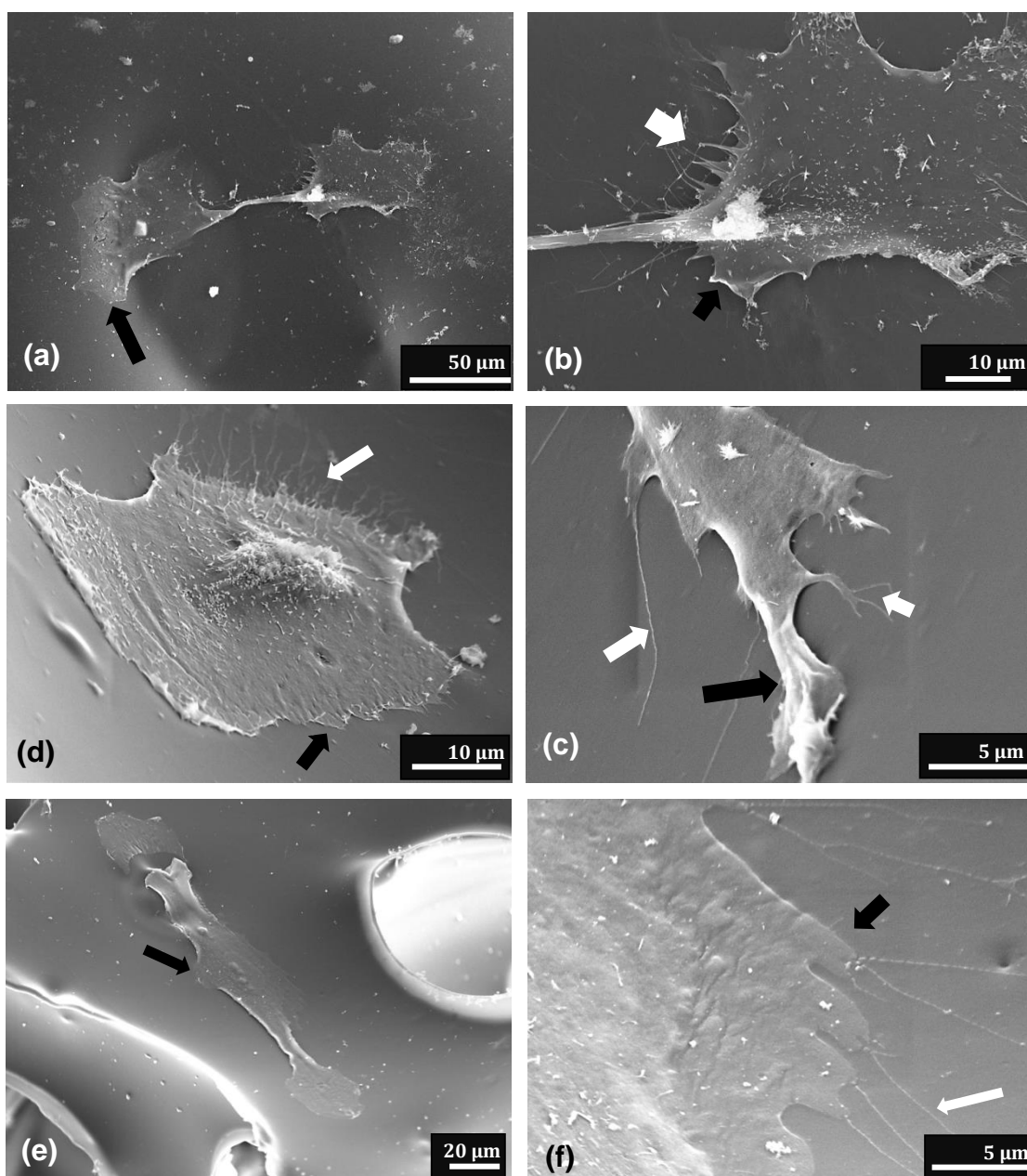


Figura 13. Imágenes SEM de DPSCs en andamios. PU puro en (a) y (b), PU nBG 2,5% en (c) y (d) PU nBG 5% en (e) y (f). Las flechas blancas indican el desarrollo de extensiones celulares tipo lamelopodios y filopodios. Las flechas negras contrastan el grado de contacto entre la célula y la superficie del material.

Se observa que las DPSCs se adhieren a todos los andamios, desarrollando extensiones tipo lamelopodios y filopodios en la superficie de los materiales. Las imágenes SEM de mayor aumento indican que las células tienen aparentemente un contacto más íntimo con la superficie de los andamios PU nBG 2,5% y PU nBG 5%, comparados con los de PU puro.

6.3 Diferenciación osteogénica

6.3.1 Ensayo de fosfatasa alcalina (ALP).

La **Figura 14** grafica los valores de absorbancia de actividad de la enzima ALP. Se observa actividad de ALP de DPSCs en todos los andamios, especialmente en los tiempos de 10 y 14 días. A los 7 días no fue posible la medición de ALP, ya que los valores de absorbancia medidos se encontraban por debajo del rango de la curva de calibración del ensayo colorimétrico (anexo IX). A 10 días, se destaca como significativamente mayor la absorbancia medida para DPSCs + PU nBG 2,5% comparada con los demás grupos, incluyendo las DPSCs sin andamio ($p < 0,05$). Asimismo, el valor de absorbancia medido para DPSCs + PU es mayor que el de las DPSCs puras y que el de DPSCs + PU nBG 5%, mientras que entre DPSCs puras y DPSCs + PU nBG 5% no se observaron diferencias significativas.

A los 14 días, se observa una mayor absorbancia para DPSCs + PU nBG 5% respecto a DPSCs + PU, a la vez que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre la absorbancia medida para las células cultivadas en andamios respecto de las que fueron incubadas sin ellos.

Considerando cada muestra en diferente tiempo, se observa que la evolución de 10 a 14 días de la actividad cuantitativa de fosfatasa alcalina es significativamente mayor ($p < 0,05$), especialmente para DPSCs + PU nBG 5%.

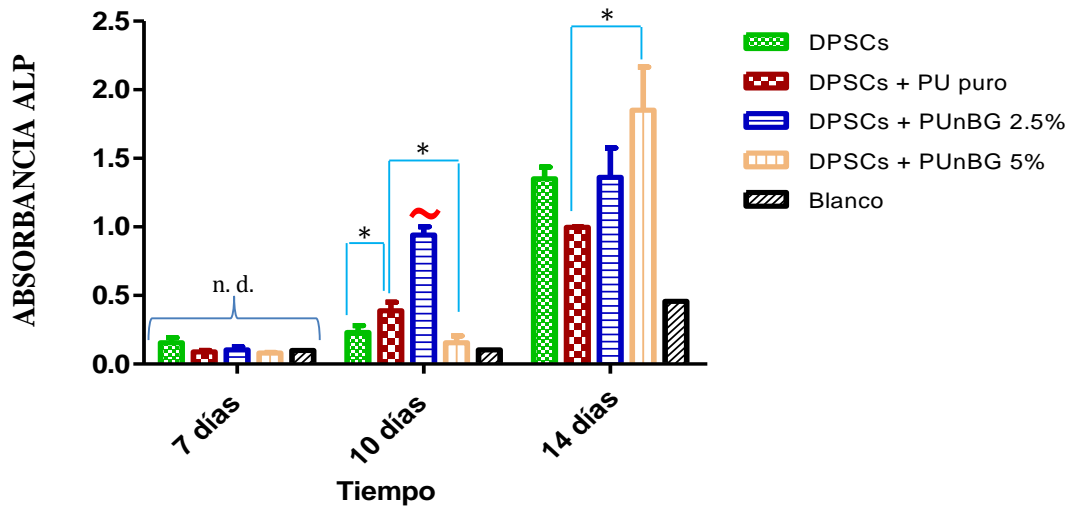


Figura 14. Actividad cuantitativa de fosfatasa alcalina en andamios. Valores de absorbancia ALP de DSCPs puras y cultivadas con los andamios a diferentes tiempo de incubación. Asteriscos = diferencias estadísticamente significativas. Virgulilla = diferencias estadísticamente significativas con todas las muestras.

6.3.2 Ensayo de NBT/BCIP

La **Figura 15** muestra imágenes de microscopía óptica de las DPSCs puras y cultivadas con los andamios a diferentes tiempos, teñidas con el reactivo NBT/BCIP específico para la detección de actividad de la enzima ALP. Se puede observar la tinción para ALP de las células en todas las condiciones estudiadas. Sin embargo, a los 7 días de incubación se destaca una mayor tinción en las DPSCs cultivadas con los andamio de PU modificados con las nanopartículas de nBG (PU nBG 2,5% y PU nBG 2,5%), mientras que a los tiempos de incubación de 10 y 14 días, no se observaron diferencias entre las células incubadas con los andamios y aquellas cultivadas sin ellos.

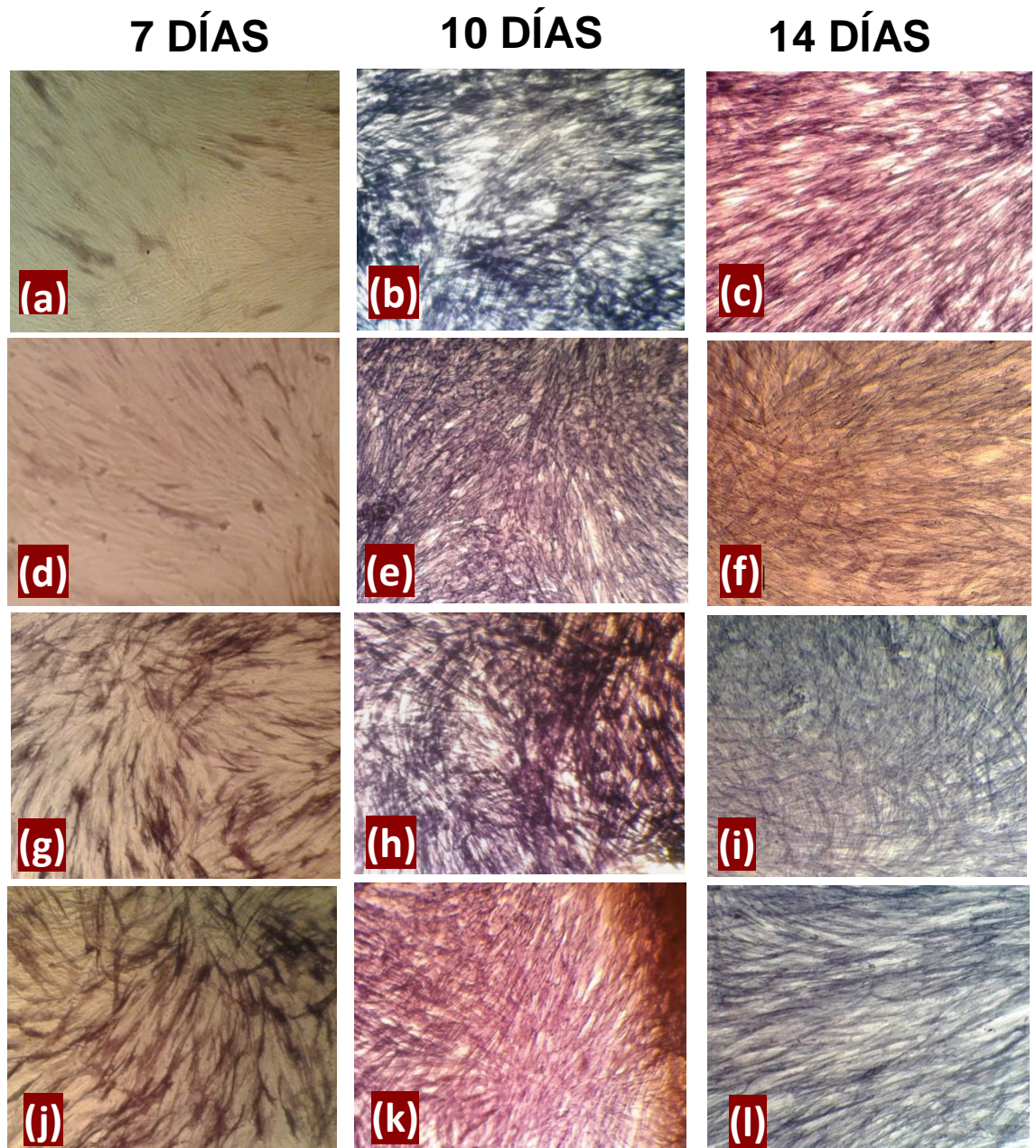


Figura 15. Actividad cualitativa de fosfatasa alcalina en andamios. Fotografías en microscopio óptico de DPSCs cultivadas en andamios a 7 días, teñidas con reactivo NBT/BCIP. **(a), (b) y (c)** = DPSCs sin andamio. **(d), (e) y (f)** = DPSCs + PU puro. **(g), (h) e (i)** = DPSCs + PU nBG 2,5%. **(j), (k) y (l)** = DPSCs + PU nBG 5%.

7. Discusión

Desde su descubrimiento y primer aislamiento llevado a cabo por Gronthos S y cols., (2000), las DPSCs han demostrado que su cultivo y aplicación en ITO es promisorio, además de la ventaja no invasiva de su obtención, cuando su fuente de origen es de terceros molares incluidos o semi-incluidos. Hasta el momento, no ha habido estudios que evalúen la respuesta de estas DPSCs en materiales nanocompósitos de poliuretano con nanopartículas de vidrio bioactivo, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue unir estos tres elementos (células madre, nanopartículas bioactivas y andamios de poliuretano a nanoescala), y evaluar la respuesta celular *in vitro*, en búsqueda de una combinación de ellos que pueda ser aplicada como constructo bioactivo en ITO.

Las partículas cerámicas bioactivas que priman en el mercado tienen dos características en común: están en dimensiones micrométricas y se preparan a altas temperaturas. Las nanopartículas y su síntesis por técnicas basadas en sol-gel (baja temperatura) utilizadas en este trabajo permiten una nanoestructura controlada y más bioactiva, debido a la mayor razón de aspecto y humectabilidad, que da como resultado una disolución más rápida de sus productos y una mayor bioactividad (Celhay I, 2014; Covarrubias C y cols., 2015b).

En relación a las células madre utilizadas para evaluar la respuesta celular en andamios BNC, para todo cultivo celular existen dos tipos de origen: de línea celular (en venta en el mercado) y de cultivo primario (a partir de una muestra biológica directa). Las ventajas de una y otra opción están reportadas en la literatura, y las opiniones de la comunidad científica están divididas en relación al uso de células madre de uno u otro origen. Stacey G (2005), recomienda el uso de línea celular para los estudios *in vitro*, para estandarización, mientras que para experimentos *in vivo*, los resultados obtenidos de células de cultivo primario se aceptan como más confiables. Por otro lado, Pan C y cols., (2009) reportó importantes diferencias entre línea celular y cultivo primario de hepatocitos, destacando que la línea celular pierde funciones específicas que la célula primaria mantiene, comparadas con el organismo del cual provienen.

La visión que primó en este proyecto coincide con la de este último autor, de modo que en este trabajo se realizó el aislamiento y cultivo de DPSCs a partir de tejido dentario (cultivo primario), de acuerdo a las técnicas evaluadas en etapas anteriores del proyecto (Balanda C, 2013), con el objeto de estudiar el comportamiento *in vitro* de estas células al cultivarse en andamios de PU a nanoescala cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo.

En relación a la obtención de MSCs a partir de terceros molares incluidos, la literatura acentúa la ventaja relativamente no invasiva de la misma, cuando existe indicación terapéutica para extracción de los mismos. Kabir R y cols., (2014) realizaron una revisión sistemática relacionando células madre de tejido dentario con ingeniería tisular y regeneración tisular, y concluyeron que el tejido dental es una fuente destacable de aislamiento de células madre mesenquimales, con una suficiente cantidad, expandible y de fácil obtención, que además está disponible en toda la vida del individuo, especialmente en jóvenes con terceros molares incluidos o semi-incluidos, debido a su estado de menor desarrollo, con promisorios prospectos de aplicación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, andamios nanocompósitos de poliuretano cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo son citocompatibles y presentan capacidad para estimular la diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre de la pulpa dental (DPSCs).

7.1 Viabilidad de DPSCs

La respuesta celular es importante de evaluar frente a un material cuyo objetivo final es ser aplicado en Ingeniería Tisular, ya que puede generar toxicidad y en tal caso debe ser descartado. A través del ensayo de MTS y fluorescencia se observó que las DPSCs son viables en todos los materiales y a todos los tiempos, lo cual coincide con lo visto por Hung KC y cols., (2014), en relación a que los andamios de PU son citocompatibles. Al mismo tiempo, la adición de nanopartículas de vidrio bioactivo a andamios de PU no resultó ser tóxica ni inhibir la proliferación celular en relación al control de PU sin nanopartículas. Los resultados también demuestran que la proliferación celular es mayor en algunos casos, en presencia de los materiales andamios (PU puro y PU + nBG 5% a los 10 días). Este efecto podría ser explicado por factores como la mayor

superficie que supone la presencia del andamio para el crecimiento celular, la proliferación celular en tres dimensiones (en contraste con las dos dimensiones del pocillo plástico) y la topografía del andamio, que favorece la adhesión y proliferación celular (Hung KC y cols., 2014; Schneider y cols., 2008).

A los 7 días, el ensayo de viabilidad cuantitativo (MTS) no dio diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Sin embargo, el ensayo AO/PI (fluorescencia) a los 7 días mostró una densidad de células levemente mayor en el andamio de PU con nBG 5%, mientras que a los 10 días, la viabilidad por MTS fue mayor en estos andamios BNC en comparación con las células cultivadas sin andamios. Estos resultados sugieren que los andamios con nanopartículas no sólo no afectan, sino que en algunos casos pueden favorecer la viabilidad celular. El aumento de viabilidad de células madre debido a las nanopartículas ha sido observado por otros autores, y se puede explicar debido al ambiente alcalino generado por el intercambio de iones entre el vidrio y el medio, que aumenta la sensibilidad de los canales de calcio de la membrana celular (Valerio P y cols., 2004).

En relación al tiempo de cultivo en los andamios, las células aumentaron significativamente su proliferación en cada material con respecto al tiempo anterior, especialmente entre el día 1 y los 10 días, lo cual demuestra que la viabilidad celular en los andamios nanocompuestos es estable en el tiempo. No hubo diferencias importantes desde el día 10 al día 14, lo cual sugiere que el cultivo de DPSCs en andamios nanocompuestos a 10 días es suficiente para afirmar que son citocompatibles, y que la adición de nanopartículas de vidrio bioactivo no alteró la viabilidad celular del andamio de PU. Los productos de disolución del vidrio no generaron un ambiente desfavorable para la proliferación celular, y las concentraciones de nanopartículas escogidas fueron adecuadas para la proliferación de células madre mesenquimales.

Estos resultados de viabilidad también indican que la porosidad del andamio a nanoescala fue adecuada, lo cual coincide con lo descrito por Campion C y cols., (2011). La presencia de poros en la nanoestructura del andamio favorece la proliferación de las células dentro del mismo, así como la llegada de nutrientes y oxígeno a través del mismo.

7.2 Adhesión de DPSCs

En relación al comportamiento de adhesión de las DPSCs en los andamios de PU con y sin nanopartículas de vidrio bioactivo, mediante imágenes SEM se observó que en los tres tipos de andamios las células adoptaron una forma alargada, extendiendo prolongaciones desde su soma al material del andamio, tipo filopodios y lamelopodios. Dalby MJ y cols., (2004) describieron que la adhesión celular a un material comienza con la formación de microespículas o filopodios, los cuales interactúan con diferencias de superficie de hasta 10 nm. Son prolongaciones delgadas y largas, en contraste con los lamelopodios, que son anchas (100-400 nm), más cortas y con forma laminar. Ambas son prolongaciones del citoesqueleto que tienen un importante rol en la migración celular (Paniagua R, 2007; Mattila PK y cols., 2008; King SJ y cols., 2016), y su presencia en los andamios confirma la citocompatibilidad de los mismos.

Se observaron lamelopodios a partir de las DPSCs en los tres andamios estudiados, mientras que en los andamios con nanopartículas se destacó la presencia de lamelopodios y filopodios, además de una adhesión más íntima a aumentos mayores, especialmente en los andamios BNC con 5% de vidrio bioactivo.

La adhesión observada de las DPSCs en los andamios ocurrió luego de sólo 3 horas de cultivo. Se observó que en los andamios con nanopartículas la adhesión fue más íntima en comparación con el control de PU sin nanopartículas, especialmente en el andamio BNC con 5% de vidrio bioactivo, sugiriendo que la adición de vidrio bioactivo nanoparticulado acelera y mejora la interacción de las DPSCs con la superficie del andamio nanocompuesto. Este comportamiento puede explicarse debido a dos componentes: un componente químico, la formación inicial de la película de apatita hidroxycarbonatada (HCA), que de acuerdo a Jones JR (2013) comienza entre 2-5 horas de incubación. Esta película tiene una composición similar a la del tejido óseo, y presenta una composición química que promueve la adhesión celular. Consecuentemente, en la presencia de la película de HCA producida por las nanopartículas de vidrio bioactivo las células muestran mejor comportamiento de adhesión. El segundo componente es físico, y corresponde a la creciente porosidad del

andamio conforme se liberan los productos de disolución de las nanopartículas, lo cual aumenta la nanoporosidad del andamio, su área superficial y las posibilidades de interacción celular y con el medio.

7.3 Diferenciación osteogénica de DPSCs

Existen múltiples ensayos disponibles para determinar la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales humanas, los cuales pueden dividirse en dos grupos generales; ensayos cualitativos y cuantitativos (Krause U y cols., 2011). La mayoría de los ensayos cualitativos tienen baja sensibilidad, y están basados en la unión de reactivos colorímetros a componentes insolubles de la matriz extracelular y/o algunos basados en la tinción de reactivos en presencia de enzimas osteogénicas, como la fosfatasa alcalina (ejemplo: ensayo de NBT/BCIP).

En este trabajo se utilizaron dos ensayos para detectar la actividad de fosfatasa alcalina (ALP), enzima fisiológicamente activa sólo en presencia de células vivas, y una de las primeras secretadas por las células osteoprogenitoras (Golub EE y cols., 2007), por lo cual los ensayos basados en la medición cuantitativa o cualitativa de su actividad son confiables para detectar diferenciación osteogénica.

Al analizar la actividad de ALP en forma cuantitativa, a los 7 días no se observó detección de la misma para ninguna de las muestras, mientras que a 10 días las células cultivadas en las DPSCs en PU nBG 2,5% mostraron una gran actividad de ALP, comparadas con los demás andamios ($p < 0,05$). A los 14 días, se observó una mayor actividad de ALP en las muestras de PU nBG 5% comparadas con las cultivadas en PU puro. En el ensayo cualitativo hubo una alta tinción de las DPSCs en andamios de PU con nanopartículas de vidrio bioactivo a los 7 días. Estos tres resultados juntos sugieren que las nanopartículas de vidrio bioactivo aceleran la diferenciación osteogénica de DPSCs a tiempos relativamente cortos de incubación (7 días). Asimismo, en el ensayo de NBT, a los 7 días se observó una mayor actividad de ALP de las DPSCs cultivadas en PU con ambas concentraciones de nanopartículas comparadas con aquellas en PU sin nanopartículas, lo cual sugiere que las

nanopartículas de vidrio bioactivo aceleran la diferenciación osteogénica de DPSCs. El efecto de las nanopartículas sobre la diferenciación osteogénica de células madre es debido a un mecanismo bien conocido del vidrio bioactivo, específicamente de sus productos iónicos de disolución: sílice, calcio y fosfato. Al formarse la capa rica en sílice se produce el precipitado de fosfato de calcio, que luego dirige la neoformación ósea a través de la absorción de proteínas (principalmente fibronectina) (Välimäki VV y cols., 2006). Luego, los aumentos en la concentración de calcio en el medio inducen proliferación de células osteoprogenitoras y activan su quimiotaxis, mientras que el sílice juega un importante rol en su metabolismo (Xynos I y cols., 2001). Además, Xynos I y cols., (2001) encontraron que los productos de disolución del vidrio bioactivo tienen un efecto directo en la expresión genética de los osteoblastos, regulando su actividad.

Estas observaciones son relevantes porque implican que la adición de nanopartículas al PU estimula una más rápida diferenciación osteogénica de las DPSCs, lo cual podría acelerar el proceso de regeneración *in vivo* e implicar diferencias importantes en los tiempos de tratamiento.

Billström y cols., (2013) reportaron que las MSCs son sensibles a la topografía y al módulo elástico del andamio, el cual actúa como una matriz extracelular temporal, y de la misma forma que en esta, influye a las células en la línea en que se diferenciarán. Esto explicaría la observación de actividad de ALP en los andamios de PU puro, especialmente en la medición detectada a los 10 y 14 días de ambos ensayos de diferenciación.

En relación a las DPSCs cultivadas en un mismo andamio a diferentes tiempos, en todas las muestras se observó un aumento significativo de la actividad de ALP en función del tiempo, especialmente en PU nBG 5% de 10 a 14 días. Estos resultados demuestran que los andamios con nanopartículas favorecen la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales de la pulpa dental.

En respuesta a las limitaciones propias del cultivo *in vitro*, como son el ambiente aislado y estático, en los últimos años se han establecido los

Bioreactores, definidos en 2004 por Bilodeau y Mantovani como “dispositivos que asemejan y reproducen las condiciones fisiológicas para mantener y favorecer el cultivo celular para ingeniería tisular” (Minteer DM y cols., 2014), es decir, crean condiciones dinámicas de cultivo, y retiran e incorporan medio de cultivo continuamente con el objeto de asimilar el ambiente *in vivo*, lo cual optimizaría la respuesta celular en los mismos materiales, a través de la difusión mejorada de nutrientes, la reducción de la barrera física y la adición de movimiento fisiológico al cultivo. En futuros estudios estos dispositivos podrían reemplazar el cultivo celular tradicional, con el objeto de obtener resultados cercanos a los observables en tejido fisiológico; así como permitir la preparación constructos bioactivos (andamio nanocompósito + células).

La adición de nanopartículas de vidrio bioactivo en los andamios de PU impacta directamente en la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales, acelerando el proceso, lo cual en el futuro podría resultar en la reducción de los tiempos de tratamientos de regeneración de defectos óseos, como es requerido por ejemplo en implantología (elevaciones de seno maxilar) y secuelas de tumores, entre muchas otras necesidades terapéuticas en regeneración ósea. Se propone que los andamios bionanocompósitos de PU y vidrio bioactivo son una alternativa promisoriosa para su evaluación *in vivo* y su futura aplicación en Ingeniería Tisular Ósea, que eventualmente esté disponible clínicamente como alternativa a los actuales tratamientos de defectos óseos; autoinjertos y plasma rico en plaquetas, entre otros.

8. Conclusiones

- ◆ Los andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo son citocompatibles, y la adición de nanopartículas a andamios de PU a nanoescala no alteran la viabilidad celular de células madre de pulpa dental, y, en algunos casos, la mejora.
- ◆ Las células madre de pulpa dental cultivadas en andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo presentan mejor adhesión a la superficie del andamio que aquellas sembradas en andamios sin nanopartículas.
- ◆ Las células madre de pulpa dental cultivadas en andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo presentan capacidad de diferenciación osteogénica, acelerándose el proceso de diferenciación evaluado por actividad de fosfatasa alcalina.
- ◆ Los andamios nanocompuestos de poliuretano cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo, cultivados con células madre de pulpa dental, aparecen como una alternativa promisoriosa para su estudio como constructo bioactivo en ingeniería tisular ósea.

9. Referencias bibliográficas.

Agüero A (2016). Preparación y evaluación *in vitro* de materiales para regeneración ósea basados en poliuretano biodegradable y nanopartículas biocerámicas. *Tesis de Pregrado para optar al título de cirujano dentista*.

Alikhani M, Lopez JA, Alabdullah H, Vongthongleur T, Sangsuwon C, Alikhani M, Alansari S, Oliveira SM, Nervina JM, Teixeira CC (2015). High-Frequency Acceleration: Therapeutic Tool to Preserve Bone following Tooth Extractions. *J Dent Rest* 1–8.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu (2012). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, 40(5), 363–408.

Atwood D.A. (1971) Reduction of residual ridges: A major oral disease entity. *J Prosthet Dent* 26, 266-279.

Arroyo F (2013). Síntesis de nanocerámicas bioactivas para regeneración ósea y el efecto de la nanoestructura en sus propiedades *in vitro*. *Tesis de Pregrado para optar al título de cirujano dentista*.

Balanda C (2013). Aislamiento de células madre a partir de tejidos dentales y su capacidad de diferenciación osteogénica. *Tesis de Pregrado para optar al título de cirujano dentista*.

Bansal R, Jain A (2015). Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med* 6(1), 29–34.

Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J (2008). Bioceramics: past, present and for the future. *J of the Europ Cer Soc*, vol. 28-7, 1319–1327.

Billström GH, Blom AW, Larsson S, Beswick AD (2013). Application of scaffolds for bone regeneration strategies: Current trends and future directions. *Inj* 44:1, S28–S33.

Boccaccini AR, Keim S, Ma R, Li Y, Zhitomirsky I (2010). Electrophoretic deposition of biomaterials. *J R Soc Interface* 7, S581–S613.

Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ, Janowski GM (2012). Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dent Mater* 28(7), 703-721.

Bonfield TL, Caplan AI (2010). Adult mesenchymal stem cells: an innovative therapeutic for lung diseases. *Discov Med*. 9 (47), 337-345.

Brydone AS, Meek D, Maclaine S (2010). Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 224(12), 1329-1343.

Campion C, Chander C, Buckland T, Hing K (2011). Increasing strut porosity in silicate-substituted calcium-phosphate bone graft substitutes enhances osteogenesis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 97(2), 245–254.

Celhay I (2014). Preparación y propiedades bioactivas de bionanocompósitos para regeneración ósea basados en biopolímeros y nanopartículas cerámicas. *Tesis de Pregrado para optar al título de cirujano dentista.*

Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J (2010). Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg* 125(6), 1685-1692.

Covarrubias C, Cádiz M, Agüero A, (2015a). “Nanocomposites scaffolds based on bioactive glass nanoparticles: effect of the nature of the polymer matrix” *XXIV International Materials Research Congress (IMRC), Cancún, México.*

Covarrubias C, Arroyo F, Balanda, Neira M, Von Marttens A, Caviedes P (2015b). The effect of the nanoscale structure of nanobioceramics on their in vitro bioactivity and cell differentiation properties. *J Nanomat Volume , Article ID 526230.*

Dalby MJ, Riehle MO, Johnstone H, Affrossman S, Curtis ASG (2004). Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia. *Cell Biol. Int.* 28, 229–236.

Encuesta Nacional de Salud (2003). Ministerio de Salud. *Instituto Nacional de Estadística*.

Fischbach GD, Fischbach RL (2004). Stem cells: Science, policy, and ethics. *J Clin Invest* 114, 1364–70.

Gamonal J, López NJ, Aranda W (1998). Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. *Int Dent J* 48 (2), 96–103.

Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD y cols., (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* 26, 638–45.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005). Bone substitutes, an update. *Injury* 36(3), 20-27.

Gogolewski S (1997). Biomedical polyurethanes. *Desk Reference of Functional Polymers* ed R Arshady (Washington, DC: Am. Chem. Soc.)

Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR (2010). Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Eng Part B Rev* 16(2), 199-207.

Golub EE, Boesze-Battaglia K (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization.

Greenspan DC (1999). Bioactive glass: mechanisms of bone bonding. *Tandläkartidningen årg 91 nr 8*.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13625–13630.

Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M (2015). Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 1;94, 3-12.

Hench L (2006). The story of bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 17, 967–978.

- Hench L, Jones JR (2015) The Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges. *Front Bioeng Biotechnol* 3, 194.
- Hong Z, Liu A, Chen L, Chen X, Jing X (2009). Preparation of bioactive glass ceramic nanoparticles by combination of sol-gel and coprecipitation method. *J Non-Cryst Solids* 355(6), 368-372.
- Holliday R (2014). The Commitment of Human Cells to Senescence. *Interdiscip Top Gerontol* 39, 1-7.
- Hollister SJ, Murphy WL (2011). Scaffold translation: barriers between concept and clinic. *Tissue Eng Part B Rev* 17(6), 459–474.
- Hung KC, Tseng CS, Shan-hui Hsu SH (2014). Synthesis and 3D Printing of Biodegradable Polyurethane Elastomer by a Water-Based Process for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Adv Healthcare Mater* 3, 1578–1587.
- Hutchens SA, Champion C, Assad M, Chagnon M, Hing K (2016). Efficacy of silicate-substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity as a standalone bone graft substitute and autograft extender in an ovine distal femoral critical defect model. *J Mater Sci Mater Med* 27, 20.
- Janik H, Marzec M (2015). A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 48, 586-591.
- Jones JR (2013). Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 9(1), 4457–4486.
- Kabir R, Gupta M, Aggarwal A, Sharma D, Sarin A, Zaheer Kola M (2014). Imperative Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapies: A Systematic Review. *Niger J Surg* 20(1), 1–8.
- Kalfas IH (2001). Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 10, 4-E1.
- Krause U, Seckinger A, Gregor CA (2011). Assays of Osteogenic Differentiation by Cultured Human Mesenchymal Stem Cells. *Meth Mol Biol* 698, 215-230.

Kim H, Kim Y, Park S, Rey C, Lee H, Glimcher M, Ko J (2000). Thin film of lowcrystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature. *Biomater* 21(11), 1129–1134.

King SJ, Asokan SB, Haynes EM, Zimmerman SP, Rotty JD, Alb JG y cols. (2016). Lamellipodia are critical for haptotactic sensing and response. *J Cell Sci*.

Kumar R, Sharma A, Pattnaik AK, Varadwaj PK (2010). Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *J Nat Sc Biol Med* 1, 43-52.

Kuo YC, Hung SC, Hsu SH (2014). The effect of elastic biodegradable polyurethane electrospun nanofibers on the differentiation of mesenchymal stem cells. *Coll and Surf B: Biointerf* 122, 414–422.

Lamba MK, Woodhouse KA, Cooper SL (1998). Polyurethanes in Biomedical Applications. *Washington DC: CRC Press*.

Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science*, 260 (5110), 920–926.

Ledesma E, Mendoza VM, Santiago E (2016). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int*, vol 2016.

Lewandrowski KU, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ, Hasirci V (2000) Tissue responses to molecularly reinforced polylactide-co-glycolide implants. *J Biomater Sci Polym* 11(4), 401-414.

Loher S, Reboul V, Brunner TJ, Simonet M, Dora C, Neuenschwander P, Stark WJ (2006). Improved degradation and bioactivity of amorphous aerosol derived tricalcium phosphate nanoparticles in poly(lactide-co-glycolide). *Nanotechnology* 17, 2054–2061.

Majumdar D, Kanafi M, Bhonde R, Gupta P, Datta I (2016). Differential Neuronal Plasticity of Dental Pulp Stem Cells from Exfoliated Deciduous and Permanent Teeth Towards Dopaminergic Neurons. *J Cell Physiol* 9999, 1–16.

Mattila PK, Lappalainen P (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (6): 446-54.

Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P (2009). Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox Sang* 97(2),110-118.

Méndez I (2012). Epidemiología descriptiva y análisis de supervivencia de los tumores óseos en hospitales públicos de la comunidad de Madrid. *Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.*

Misra SK, Ansari T, Mohn D, Valappil SP, Brunner TJ, Stark WJ (2010). Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites. *J R Soc Interf* 7, 453–465.

Minteer DM, Gerlach JC, Marra KG (2014). Bioreactors Addressing Diabetes Mellitus. *Journ of Diab Sci and Technol*, 8(6),1227-1232.

Mason C, Dunnill P (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 3 (1),1-5.

Tsai MC, Hung KC, Hung SH, Hsu SH (2015). Evaluation of biodegradable elastic scaffolds made of anionicpolyurethane for cartilage tissue engineering. *Coll and Surf B, Biointerf* 125, 34–44.

Newman MR, Benoit D (2016). Local and targeted drug delivery for bone regeneration. *Cur Op in Biotechnolog* 40, 125–132.

Oonishi H, Hench L, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H (1999). Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J of Biomed Mat Research* 44(1), 31–43.

Paniagua R (2007). Citoesqueleto, organización de los microfilamentos. *Biología Celular, 3ed, Cap 6, Pags 239-255.*

Peng L, Ye L, Zhou XD (2009). Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci* 1(1),6-12.

Peral B, Redondo LM, Verrier A, Serrat A, Torres MA, Vaquero C (2008). Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 30, 313–323.

Perez M, Lorenti A (2006). Celulas troncales (stem cell) y regeneracion cardiaca. *Medicina* 66 (6), 574-582.

Place ES, George JH, Williams CK, Stevens MM, Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering, *Chem Soc Rev* 38, 1139–1151.

Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp L (2003). Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18, 93-103.

Sedgley C, Botero T (2012). Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am* 56(3) 549-61.

Schmid U, Thielemann F, Weise K, Ochs BG (2007). A novel therapeutic approach to bone replacement: vitalisation of industrial processed allogenic bone graft with autologous bone marrow. *Z Orthop Unfall* 145, 221–229.

Schmitz JP, Hollinger JO (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* (205), 299-308.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Brahim J y cols., (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 10-16, 364(9429), 149-155.

Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S (2005). Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res* 84(10), 907-912.

Suchánek J, Visek B, Soukup T, El-Din S, Ivancaková R, Mokry J, Aboul-Ezz E, Omran A (2012). Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 53(2), 93-99.

Swetha M., Sahithi K., Moorthi A., Srinivasan N., Ramasamy K., Selvamurugan N, (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Inter J of Biolog Macromol* 47(1), 1–4.

Thompson I, Hench L (1998). Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites. *Proc Inst Mech Eng H* 212(2), 127-136.

Thor A, Franke-Stenport V, Johansson CB, Rasmusson L (2007). Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 36(12), 1164-1171.

Ueda M (2011). Tissue engineered bone; Application for implant surgery. *Inflam and Regen* 31(2), 202–218.

Valenzuela F, Covarrubias C, Martínez C, Smith P, Díaz-Dosque M, Yazdani-Pedram M (2012). Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *J Biomed Mater Res Part 100B*, 1672–1682.

Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF (2004). The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomater* 25 (15) 2941–2948.

Välimäki VV, Aro HT (2006). Molecular Basis For Action Of Bioactive Glasses As Bone Graft Substitute. *Scandinav Journ of Surg* 95, 95–102.

Wang L, Li Y, Zuo Y, Zhang L, Zou Q, Cheng L, Jiang H (2009). Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration. *Biomed. Mater* 4(2), Article ID 025003.

Watanabe Y, Harada N, Sato K, Abe S, Yamanaka K, Matsushita T (2016). Stem cell therapy: is there a future for reconstruction of large bone defects? *Inj, Int J Care Injur* 47 S1, S47–S51.

Watson JT, Nicalaou DA (2015). Orthobiologics in the Augmentation of Osteoporotic Fractures. *Curr Osteoporos Rep* 13, 22–29.

Wheeler D, Stokes K, Hoellrich R, Chamberland D, McLoughlin S, (1998). Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *J of Biomed Mat Res* 41(4), 527–533.

Wheeler D, Stokes K, Park H, Hollinger J (1997). Evaluation of particulate Bioglass in a rabbit radius ostectomy model. *J of Biomed Mat Research* 35(2), 249–254.

Xynos I, Edgar A, Buttery L, Hench L, Polak JM (2001). Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J of Biomed Mat Research* 55(2), 151–157.

Zandén C, Hellström N, Padelb T, Wittgensteinb J, Liu J, Kuhn HG (2014). Stem cell responses to plasma surface modified electrospun polyurethane scaffolds. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10, 949–958.

Anexos

I. Acta Aprobación Comité Bioética.



12/09/2012

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2012/07

1. Acta de aprobación de protocolo de estudio N° 2012/13
2. Miembros permanentes del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Juan Cortés
Presidente del CEC

Dra. María Angélica Torres
Secretaría CEC

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Dr. Alejandro Escobar
Miembro permanente del CEC

Dra. Karín Lagos
Miembro permanente del CEC

3. Fecha de Aprobación: 03/09/2012
4. Título completo del proyecto: "Synthesis and evaluation of bioactive nanocomposites based on ceramic nanoparticles and polymers for bone tissue engineering in dentistry" FONDECYT REGULAR N°1130342 versión 25 de Junio 2012.
5. Investigador responsable: Dr. Cristian Covarubias G., académico del Departamento de Ciencias Básicas y Comunitarias. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
6. Institución: Facultad de Odontología, Universidad de Chile y Fondecyt
7. Documentación Revisada:
 - Protocolo versión en Inglés del Proyecto : "Synthesis and evaluation of bioactive nanocomposites based on ceramic nanoparticles and polymers for bone tissue engineering in dentistry" FONDECYT REGULAR N°1130342 versión 25 de Junio 2012.
 - Resumen ejecutivo en español versión 28/08/2012
 - Documentos de Consentimiento Informado para Pacientes adultos, para padres de adolescentes y Asentimiento Informado versión 3/09/2012
 - Currículo del Investigador responsable y de Colaboradores

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

8. **Carácter del estudio y de la muestra:** Estudio experimental en animales y uso de células madres obtenidas a partir de muestras dentarias humanas.

9. **Fundamentación de la aprobación ética**

Este proyecto busca sintetizar nuevos materiales nanocompuestos con propiedades bioactivas para ayudar a la regeneración ósea. Se le incorporará además al nanomaterial, células madres provenientes del ligamento periodontal de dientes extraídos por indicaciones odontológicas y donados por los pacientes involucrados, en forma libre y voluntaria.

Los investigadores se han comprometido sólo a realizar uso de las células declaradas en el proyecto y a mantener la estricta confidencialidad sobre los datos de los implicados. Hay un procedimiento descrito para manejo y respaldo de los datos. Los donantes serán informados y se realizará un proceso de consentimiento informado, demostrando así que los investigadores están comprometidos con el respeto de la autonomía de los donantes, informando incluso a los jóvenes mayores de 14 y menores de 18 años en su decisión y donación voluntaria.

El ensayo y la efectividad de los diferentes materiales propuestos se realizará en modelo animal rata, donde el investigador principal ha presentado su protocolo al respectivo Comité Ético del Cuidado Animal en Facultad de Medicina de la U. de Chile, aprobación que participará a este Comité.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, aprueba el estudio "Synthesis and evaluation of bioactive nanocomposites based on ceramic nanoparticles and polymers for bone tissue engineering in dentistry" FONDECYT REGULAR N°1130342 versión 25 de Junio 2012.



María Angélica Torres V
DDS, MSc, PhD
Presidente (S) del CEC

C/C.
Investigador Responsable
Secretaría C.E.C.



II. Consentimiento informado para procesamiento de terceros molares



Ed: 03/09/2012

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

(Participantes adultos)

Nombre de Estudio: "SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NANOCOMPOSITOS BIOACTIVOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS CERÁMICAS Y POLÍMEROS PARA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA EN ODONTOLOGÍA"

Investigador Principal: Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo.
Depto. Ciencias Básicas y Comunitarias.
Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Fono: 9781719, E-mail: ccovarru@u.uchile.cl

Nombre del Patrocinante: Facultad de Odontología, Universidad de Chile y FONDECYT

Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Presidente CEC: Sr. Prof. Juan Cortés Araya
Vicedecano Facultad de Odontología de la Universidad de Chile
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Email vicedeca@odontologia.uchile.cl

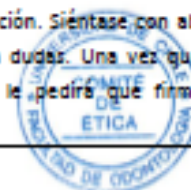
Nombre del Participante: _____

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del Documento completo de Consentimiento Informado

Solicitamos a Usted su colaboración con este estudio. Antes de decidir si colabora o no, debe conocer y comprender los aspectos que se exponen a continuación. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto sobre el cual tenga dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea colaborar, entonces se le pedirá que firme este formulario.



Fecha firma / /

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO

El hueso es un tejido de sostén muy importante en el organismo, y en ocasiones se pierde con mucha dificultad para su recuperación, por ejemplo por enfermedades en las articulaciones, por malformaciones, por grandes accidentes y en la boca por enfermedad periodontal, por infecciones o traumatismos. Actualmente existen algunas formas de reconstruir el hueso perdido, pero con algunas limitaciones. Se usan por ejemplo injertos propios o de otros donantes, o hueso seco preparado para injerto o materiales sintéticos compatibles con el organismo humano. La ingeniería de los tejidos, particularmente del hueso, está centrada en desarrollar nuevos biomateriales que permitan regenerar el hueso perdido de manera más similar al que existía originalmente y en un menor tiempo. Esto resulta de gran utilidad cuando se requiere recuperar el hueso antes de poner un implante dental ó rehabilitar personas con enfermedad periodontal.

El objetivo del presente estudio es desarrollar nuevos biomateriales para regenerar hueso. Para esto se usarán unas "nanoparticulas" que estimulan la formación de hueso, las que se combinarán con "células madres" generadoras potenciales de hueso; la efectividad de estos biomateriales se evaluará en un modelo animal. Las "células madres" serán sacadas de los restos del ligamento que afirma el diente a su lecho en el hueso, (ligamento periodontal) usando dientes recién extraídos.

Lo hemos contactado porque usted requiere la extracción de algunos dientes que cumplen con los requisitos requeridos para este estudio (la extracción del tercer molar por indicaciones quirúrgicas o protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales); y quisieramos solicitar a Usted, la donación de sus dientes extraídos.

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin recién expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con el donante (con usted). Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes ni con las células madres obtenidas de ellos. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad vigentes.

La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, pero el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

No existe ningún tipo beneficio inmediato por su participación en el estudio, ya que las piezas dentales a utilizar son normalmente desechadas. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito clínico.

Aclaraciones

La colaboración con el estudio es completamente voluntaria, y usted puede dejar de participar libremente.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.

No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.

No recibirá pago por su donación.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, le solicitamos firmar el Formulario de Consentimiento Informado anexo al documento.

Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, contactando al Dr. Cristian Covarrubias (Dpto. Ciencias Básicas y Comunitarias, Facultad de Odontología, U. de Chile. Fono: 9781719, E-mail: ccovarru@u.uchile.cl), o si lo desea al Dr. Juan Cortés presidente del Comité de Ética y aclarar sus dudas.



Fecha firma / /

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a colaborar con la investigación de creación y evaluación de nuevos materiales para la regeneración ósea. Entiendo que colaboraré donando mis dientes extraídos los que serán utilizados para la extracción de células madres y destruidos una vez tratados y observados. Sé que no existen beneficios para mi persona y que no se me recompensará por participar. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado y su dirección de correo electrónico.

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente colaborar en esta investigación donando mis dientes extraídos.

Nombre del Participante _____

Firma _____

Santiago, ____/____/____

Sección a llenar por el Investigador o su representante:

He explicado al Sr(a)..... la naturaleza de la investigación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI	Fecha
--	-------

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo (PhD) .

Nombre y Firma del Investigador Principal	Fecha
---	-------

Fecha firma / /



III. Protocolo de aislamiento de Células Madre de Pulpa Dental

El momento de la aislación debe ser lo más cercano posible a la extracción del diente, esto es muy importante. Debe ser el mismo día. Antes de iniciar el procedimiento, debemos pesar las enzimas: usamos 1.5 mg de Colagenasa I y 2mg de Dispasa II **por cada diente a tratar**.

- 1) Los dientes se mantienen y transportan en medio de cultivo alfa-mem 90% suplementado con SFB 10% + 100 ug/mL de penicilina/estreptomicina 1% + 0.25 ug/mL de anfotericina B 1%. La solución está a 4°C. Debe usarse un frasco por cada paciente.
- 2) Disponer de tres tubos eppendorf de 2 mL. El primer tubo vacío recibirá el tejido pulpar fragmentado (ver paso 6). El segundo tubo vacío recibe 500 uL de solución de 90% alfa-mem + 10% SFB con una concentración de 3mg/mL de Colagenasa I, y el tercer tubo vacío recibe 500 uL de solución de 90% alfa-mem + 10% SFB, con una concentración de 4mg/mL de Dispasa II.
- 3) Limpiar diente con gasa con alcohol 70°.
- 4) Eliminar el ligamento periodontal con hoja de bisturí n° 15.
- 5) Seccionar molar horizontalmente a nivel de límite amelodentinario con motor eléctrico y discos carburundum desechables (evitar que disco toque el tejido pulpar). Irrigar constantemente con suero fisiológico estéril.

- 6) Extraer pulpa dental con pinza estéril y llevar a tubo eppendorf estéril vacío.
- 7) Cortar tejido en fragmentos pequeños (con tijera u hoja de bisturí estéril).
- 8) La solución del segundo y tercer tubo, ya dispuestos con las enzimas, se llevan al primer tubo. Resuspender suavemente.
*Recordar que las enzimas están en una concentración de 3 mg/ml (Colagenasa I) y 4 mg/ml (Dispasa II). Por lo tanto, usamos **500 ul de solución de cada enzima por cada diente a tratar**. Total en cada tubo con tejido pulpar: 1000 ul.
- 9) El tubo eppendorf con las enzimas y tejido pulpar se posiciona en la bandeja del Roller (o incubadora) y se mantiene en agitación por una hora a 37°C. Como alternativa a esto haremos agitación manual cada 20 minutos.
- 10) Preparar 2 mL de 90% D-mem + 10% en un tubo falcon de 15 ml (por cada tubo eppendorf en proceso de digestión).
- 11) En cada tubo falcon de 15 mL preparado, diluir la solución de cada eppendorf en digestión, resuspendiendo suavemente.
- 12) Centrifugar a 1200 rpm por 5 minutos. Resuspender.

- 13) Centrifugar nuevamente, esta vez a 1200 rpm por 7 minutos.

- 14) Botar medio por volteo.

- 15) Sembrar en placas de 35 mm, 80% alfa-mem + 20% suero + 1% antibiótico (+ 100 ug/mL de penicilina/estreptomicina).

- 16) Incubar por tres días. Luego cambiar medio cada 2-3 días.

- 17) Cambiar placa según porcentaje de confluencia.

IV. Protocolo de cambio de placa

Existen placas con diámetros de 35 mm, 60 mm y 100 mm. Las células de estas placas se dejan crecer hasta alcanzar una confluencia (espacio ocupado por las células en la placa) de un 80-90%. Con una densidad mayor las células se empiezan a inhibir por contacto.

Cada cambio de placa significa la aplicación de una enzima, la tripsina, que desprende las células de la superficie plástica de la placa. Cada vez que se aplica tripsina, se dice que las células han sufrido “un pasaje más”. Como referencia, las células de línea celular resisten un promedio de 20-22 pasajes, después de los cuales sus resultados son de menor calidad (porque la edad relativa de estas células es alta).

Entonces, para cada cambio de placa se produce un pasaje más.

Antes de pasar las células y los medios a la campana, debe aplicarse UV por 10 minutos, con todos los elementos a utilizar (placa nueva, tubos falcon, etc). E sugiere leer bien el protocolo para llevar todos los elementos necesarios a la campana antes de iniciar el proceso. Además, los líquidos deben estar a 37 °C.

1-. Las células están en la incubadora, se retiran con manos con guantes (previo lavado con etanol 70%). Observar en microscopio, comprobar confluencia de 80-90% y llevar a campana.

2-. Se aspira el medio, la punta de aspiración no debe tocar la placa.

3-. Se lava con PBS por un minuto (volumen suficiente para que cubra el fondo de la placa). Aspirar y desechar.

4-. Aplicar tripsina 0.25%, volumen suficiente para cubrir fondo de placa. Poner en incubadora por 5 minutos.

5-. En esos 5 minutos, preparar 3 mL de solución en un tubo falcon de 15 mL. La solución debe contener 90% de medio alfa mem y 10% de SBF. (No es necesario agregar antibiótico).

6-. Pasados los 5 minutos de incubación (no más, no menos), se lleva la solución en la placa (que ahora contiene a las células suspendidas en la tripsina 0.25%), al tubo falcon con solución de medio y suero recién preparada. Ojo, mucho cuidado al manipular la solución, las células son sensibles a los movimientos bruscos; el vaciado de la solución en el tubo falcon debe ser SUAVE.

7-. Resuspender suavemente los 3.5 -5 mL de solución total aprox. en el tubo falcon. La intención de esto es que el SBF se distribuya homogéneamente e INACTIVE LA TRIPSINA.

8-. Centrifugar el tubo falcon a 1500 rpm por 5 minutos (temperatura ambiente). Observar la formación de pellet.

9-. Volteo rápido de solución en tarro de desecho de fluidos. Quedará un remanente de 500 ul aprox en el fondo del tubo falcon, junto con el pellet formado (que contiene todas las células).

Ahora es momento de sembrar. Recordemos que el volumen para cada placa con un diámetro de 35mm, 60mm y 100mm es de 2 ml, 4 ml y 10 ml respectivamente.

10-. Aplicamos entre 600 y 2000 ul de medio alfa mem (sólo medio), para resuspender y diluir el pellet en el tubo falcon de 15 ml. Queremos que las células se distribuyan homogéneamente.

El volumen aplicado de medio es de acuerdo al volumen total que debe haber en la placa. Por ejemplo:

En una placa de 35 mm debe haber 2 mL en total; 1800 ul de medio alfa mem, 200 ml de SBF y 1% de antibiótico. En este caso, resuspendemos el pellet en 800 ul en el tubo falcon, mientras que en la placa de 35mm aplicamos los 1000 ul de medio alfa mem restantes, más los 200 ul de suero y los 20 ul de antibiótico.

En una placa de 100mm debe haber un total de 10 ml, por lo que aplicamos 2 ml de medio alfa mem en el tubo falcon, y en la placa aplicaremos los 6 ml restantes de medio, más 2ml de suero y 100 ul de antibiótico.

11-. Sembrar las células desde el tubo falcon a la placa correspondiente, que ya tiene en su interior el resto de medio, más el SBF y antibiótico correspondiente. SEMBRAR EN EL CENTRO DE LA PLACA, suavemente.

12-. Incubar a 37 °C con saturación de 5% CO₂.

V. Protocolo de reactivo MTS/PMS

EL reactivo consta de dos pocillos: 1 mL de reactivo PMS + 20 mL de reactivo MTS. La proporción de mezcla es PMS : MTS = 1 : 20.

- 1) Preparar reactivos de acuerdo al número de pocillos de la placa de 48 pocillos a evaluar, de modo que para cada pocillo hayan 40 μ L de reactivo MTS/PMS.
- 2) A la suma de pocillos a evaluar, agregar un blanco (medio + reactivo).
- 3) Aspirar todo el medio de cada pocillo con células.
- 4) Aplicar 300 μ L de medio suplementado nuevo a cada pocillo con células.
- 5) Aplicar 40 μ L de reactivo MTS/PMS a cada pocillo. Resuspender 3 veces.
- 6) Incubar por 2 hrs a 37 °C y 5% de CO₂.
- 7) Aspirar 100 μ L de solución de cada pocillo, llevar a lector de placa Elisa y medir la absorbancia a 492 nm.

VI. Protocolo medición cuantitativa de actividad ALP

Insumos necesarios:

- 1) Buffer de reacción: - Bicarbonato de sodio (100mM)

- MgCl₂ (1mM)

Preparar al momento de la reacción, a un pH = 9.6.

- 2) Reactivo p-nitro fenolfosfato (1mg/ml de buffer de reacción)
- 3) Buffer de lavado TBS 1X a pH 7.4 a temperatura ambiente.
- 4) Etanol-formaldehido (9 ml etanol+1ml formaldehido 37 %)
- 5) Solución de NAOH a concentración 3N.

Protocolo:

- 1.- Retirar medio y lavar 2 veces las células con TBS.
- 2.-Fijar las células por 30 segundos con etanol-formaldehido.
- 3.- Lavar 3 veces con TBS.
- 4.- Retirar buffer de lavado y agregar p-nitrofenol fosfato, 200 ul por cada pocillo a medir. Cultivar a 37 °C por 20 minutos. Agregar un blanco.
- 5.- Detener la reacción agregar 100 ul NAOH 3 N.
- 6.- Llevar 100 ul de cada pocillo a una placa Elisa y leer por absorbancia a 405 nm.

VII. Protocolo NBT/BCIP

El sustrato de la fosfatasa alcalina (ALP) es el BCIP. Una vez desfosforilado es oxidado por el NBT formando un precipitado azul de color índigo oscuro. El NBT reducido forma un precipitado de color a azul oscuro que intensifica el color de la reacción y la hace más sensible. Ambos compuestos son muy poco solubles en agua o lípidos.

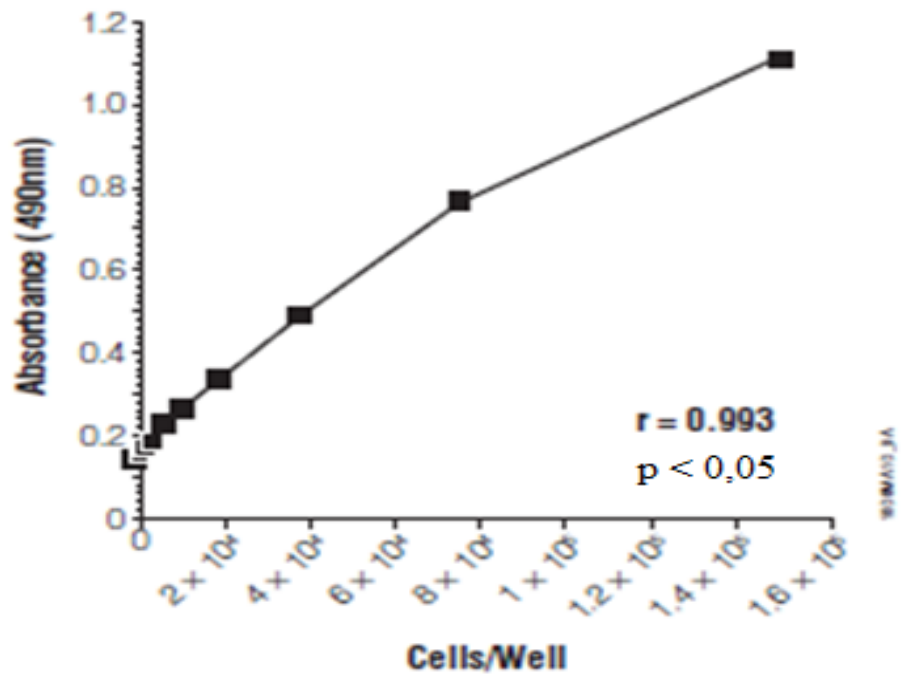
Insumos necesarios: - 1 Tableta de NBT/BCIP cada 10 mL de solución

- Agua bidestilada
- Etanol-formaldehído (9 ml etanol+1ml formaldehído 37%)
- Buffer de lavado (PBS pH 7,4 + Tween-20 0,05%).

Procedimiento:

- 1-. Añadir una tableta en 10 mL de agua bidestilada. La composición de la solución de tinción (a pH 9,5) después de la adición del agua doble destilada es: 0,4 mg/mL NBT; 0,19 mg/mL BCIP; 100mM Tris buffer, Ph9,5; 50 mM MgSO₄.
- 2-. Remover el medio de cultivo. Con cuidado lavar las células con buffer de lavado a temperatura ambiente.
- 3-. Fijar las células por 30 segundos con etanol-formaldehído. Lavar cuidadosamente con buffer de lavado.
- 4-. Retirar buffer de lavado. Añadir suficiente solución de BCIP/NBT para cubrir la monocapa. Incubar en oscuridad durante 5-10 minutos. Chequear tinción por intervalos de 2-3 min.
- 5-. Lavar las células con buffer de lavado 3 veces.
- 6-. Analizar células en microscopio.

VIII. Curva de calibración MTS/PMS



IX. Curva de calibración actividad de ALP

