EVALUACIÓN IN SILICO E IN VITRO DEL POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE CONSTRUCTOS BASADOS EN CÉLULAS TRONCALES DE PULPA DENTAL HUMANA PARA SU APLICACIÓN CLÍNICA EN DEFECTOS ÓSEOS CRÍTICOS DEL COMPLEJO MAXILOFACIAL

Álvaro Andrés Rodríguez Sáenz

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL- FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC.- AGOSTO 2021

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Cirugía Oral y Maxilofacial
Título:	Evaluación *in silico* e *in vitro* del potencial osteogénico de constructos basados en células troncales de pulpa dental humana para su aplicación clínica en defectos óseos críticos del complejo maxilofacial
Grupos de Investigación:	Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO Unidad de Epidemiologia Clínica Oral-UNIECLO
Línea de investigación:	Regeneración tisular y células stem craneofaciales
Tipo de investigación:	Posgrado /Línea investigación
Residentes:	Alvaro Andrés Rodríguez Sáenz
Director:	Dr. Juan Carlos Munevar Niño
Codirector:	Dr. Jorge Humberto Fernández Olarte
Asesor Metodológico	Dr. Luis Fernando Gamboa

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

OTTO BAUTISTA GAMBOA	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
JORGE HUMBERTO FERNÁNDEZ OLARTE	Director del programa de Cirugía Oral y Maxilofacial

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pág.
Introducción	**1**
2. Marco teórico	**4**
3. Planteamiento del problema	**9**
4. Justificación	**11**
5. Situación Actual	**12**
6. Objetivos	**13**
7. Metodología	**14**
7.1. Tipo de estudio	**14**
7.2. Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)	**14**
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información	**14**
7.4. Hipótesis de estudio	**17**
7.5 Plan de tabulación y análisis.	**17**
8. Consideraciones éticas.	**18**
9. Resultados	**20**
10. Discusión	**35**
11. Conclusiones	**38**
12. Referencias bibliográficas	**39**
13. Anexos	**45**

LISTADO DE TABLAS

		Págs.
Tabla 1	Aplicación de células troncales en estudios clínicos aleatorizados	**5**
Tabla 2	Criterios obtención de la muestra	**15**
Tabla 3	Características, concentrados plaquetarios	**16**
Tabla 4	Parámetros de la sherramientas base de datos string	**26**
Tabla 5	Proteínas sobreexpresadas y sub expresadas en las células troncales dentales teniendo en cuenta las proteínas que participan en procesos biológicos de osificación.	**26**
Tabla 6	Proteínas relacionadas con procesos biológicos de osificación del secretoma del PRP y del PPP.	**27**
Table 7	Resultados adquiridos de la base de datos STRING de las proteínas involucradas en procesos biológicos de osificación de las DMSC`s.	**27**
Table 8	Resultados adquiridos del programa String Database de las proteínas osteogénicas sobre expresadas y sub expresadas en dos diferentes condiciones.	**28**
Tabla 9	Resultados adquiridos del programa String Database de las proteínas del PRP y PPP al ser asociadas con el secretoma de las DMSC´s.	**30**
Tabla 10	Cantidad de detección de una proteína en las fracciones del plasma identificadas por espectrometría de masas.	**33**

LISTADO DE FIGURAS

Págs.

Figura 1	Fuentes de células troncales en el complejo oral y craneomaxilofacial	**6**
Figura 2	Protocolo de obtención y aislamiento de las DPSC's bajo cabina de flujo laminar	**20**
Figura 3	Comportamiento in vitro cultivo primario de DPSC`s	**21**
Figura 4	Expansión de la DPSC`s en frascos T75 bajo cabina de flujo bilaminar	**21**
Figura 5	Vista microscopio cono invertido de la siembra de las DPSC`s en frascos de poliestireno de 75cm^2 en diferentes tiempos.	**22**
Figura 6	Inmunofenotipificación, marcadores positivos CD105, CD90 Y CD73 Y negativos CD 14, 20, 34 Y 45 para células troncales mesenquimales según la ISCT.	**22**
Figura 7	Constructos de osteoblastos diferenciados a partir de DPSC`s en placas de 96 pozos.	**23**
Figura 8	Constructos de osteoblastos vistos sobre microscopia cono invertido. A. Constructo completo a poco aumento. B.Interior del constructo, se observa la disposición de los osteoblastos. C. Adhesión celular a fragmento de fibrina	**23**
Figura 9	Macrofotografía de los constructos evaluando sus dimensiones a las 48 horas. A. Alto. B. Ancho, C. Profundidad. En promedio presentan 60 mm^3.	**24**
Figura 10	Inmunofluorescencia de cultivo monocapa de osteoblastos con sus núcleos teñidos de DAPI y su citoplasma de Calceína, se evidencia viabilidad celular.	**24**
Figura 11	Inmunofluorescencia de constructos 3D vistos bajo microscopio confocal. **A.** Viabilidad de los osteoblastos en el constructo de adhesivo de fibrina. **B.** Disposición de las células dadas por la tinción del núcleo celular con DAPI.	**25**
Figura 12	Renderización de constructo por medio de Z-stacking visualizando la disposición celular por medio de tinción de núcleos con DAPI.	**25**
Figura 13	Red de interacciones de las proteínas sobre expresadas (**A y B**) y sub expresados a la baja (**C y D**) en las células troncales sometidas a las dos condiciones.	**31**
Figura 14	Red de interacciones de las proteínas del secretoma de las DMSC´s relacionado con el secretoma del PRP (A) y PPP (B).	**32**
Figura 15	Red de interacciones selectiva de las proteínas del secretoma de las DMSC´s relacionado con el secretoma del PRP. Grupo 1, secretoma DMSC´s; Grupo 2, secretoma PRP; Grupo 3, Proteínas selectivas del PRP comparadas con el PPP.	**34**

RESUMEN

EVALUACIÓN IN SILICO E IN VITRO DEL POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE CONSTRUCTOS BASADOS EN CÉLULAS TRONCALES

Antecedentes: Las terapias basadas en células troncales son de gran interés en la comunidad médica y científica debido al potencial de regeneración de tejidos que se ha reportado en la literatura. Adicional a esto, el secretoma no solo de este tipo de células sino de componentes sanguíneos como el plasma rico en plaquetas desempeñan un papel importante en la medicina regenerativa. Objetivo: Este estudio describe una técnica para la evaluación *in silico* e *in vitro* de constructos de células troncales mesenquimales de pulpa dental humana (DPSC`s) para su aplicación en defectos óseos críticos del complejo maxilofacial. Metodología: DPSC`s fueron expandidas *in vitro y* caracterizadas de acuerdo con la normativa de la Asociación Internacional para Terapia Celular. Se realizó el cultivo tridimensional de osteoblastos diferenciados a partir de las DPSC´s en adhesivo de fibrina por 7 días y fue suplementado con 10% de secretoma aislado de las DPSC's. Posteriormente se realizó evaluación de viabilidad tanto en monocapa como en el constructo con calceína para determinar células vivas (verde) y homodímero de etidio, células muertas (rojo). De igual manera, se evaluó la disposición celular con DAPI y se finalizó analizando el potencial osteogénico del constructo de manera *in silico* en la base de datos STRING mediante revisión de bases de datos crudas en la literatura. Resultados: Constructos de osteoblastos embebidos en adhesivo de fibrina rica en plaquetas con una viabilidad del 100% por inmunofluorescencia. Hubo una sobre expresión, así como, aumento significativo de procesos biológicos e interacciones osteogénicas relacionados con el TGFβ1 u el IGF2 Conclusión: El TGFβ1 y el IGF2 prometen un papel fundamental en los procesos biológicos de osificación debido a su sobreexpresión demostrada de manera *in sílico* y así mismo, fundamentan el potencial osteogénico del constructo realizado.

Palabras clave: Células troncales mesenquimatosas, Osteoblastos, In Silico

ABSTRACT

IN SILICO AND *IN VITRO* EVALUATION OF THE OSTEOGENIC OF SCAFFOLDS BASED ON STEM CELLS

Background: Therapies based on stem cells are of great interest in the medical and scientific communities due to their tissue regeneration potential which has been reported in literature. The secretome of these cells as well as plasma rich in platelets play an important role in regenerative medicine. Objective: the present study describes a technique for *in silico* and *in vitro* evaluation of scaffolds of human dental pulp mesenchymal stem cells (DPSCs) for its application in complex maxillo-facial osseous defects. Methodology: DPSCs were expanded *in vitro* and characterised as per the normative of the International Society for Cell and Gene Therapy. A three-dimensional culture of differentiated osteoblasts from DPSCs was developed in a fibrin adhesive for seven days and supplemented with 10% of isolated secretome from said cells. A viability evaluation was performed afterwards in monolayer and calcein scaffolding in order to determine live cells (green), ethidium homodimer and dead cells (red). Cellular disposition was assessed with DAPI and finalised with an *in silico* analysis of the scaffold´s osteogenic potential with the STRING database and a review of crude data in literature. Results: Osteoblast scaffolds embedded in fibrin adhesive rich in platelets with 100% viability by immunofluorescence. There was over-expression, as well as a significant amount of biological processes and osteogenic interactions related to TGFβ1 or IGF2. Conclusion: TGFβ1 or IGF2 figure as a promising factor in biological ossification processes due to their over-expression seen *in silico* and support the osteogenic potential of the scaffold.

Key words: mesenchymal stem cells, osteoblasts, *in silico.*

Introducción

Las células troncales mesenquimales (CMMs) son células adultas inmaduras con características de autorenovación, clonalidad y diferenciación aisladas inicialmente de médula ósea de ratón. Fueron denominadas como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU–F, por sus siglas en inglés) capaces de diferenciarse en osteocitos, condrocitos y adipocitos. En la actualidad, se ha reportado diferentes fuentes de células troncales mesenquimales aisladas de tejidos adultos, los cuales incluyen: Tejido adiposo, cordón umbilical, placenta, dermis, líquido amniótico, médula ósea, sangre periférica, hueso compacto y trabecular entre otros (Nancarrow-Lei et al., 2017) . Así mismo, se ha detallado el aislamiento de células troncales de origen dental las cuales son de muy fácil obtención por parte del cirujano incluyendo: Médula ósea de hueso orofacial, pulpa dental, dientes primarios exfoliados, ligamento periodontal, folículo dental, gérmenes dentales, papila apical, epitelio oral, encía, periostio, glándulas salivares, grasa adiposa de bichat, grasa palatina, implantes dentales e incluso del disco articular de la articulación temporomandibular (Egusa et al., 2017; Lavi et al., 2017). De acuerdo a la Sociedad Internacional para Terapia Celular (SITC), deben ser tenidos en cuenta criterios mínimos para identificar una CMMs, y estos son los siguientes:1) Adherentes al plástico en condiciones estándar de cultivo, 2) Expresión positiva > 95 % de antígenos de superficie, para CD105, CD73 y CD90 y negativa < 2 % para CD45, CD34, CD14 y HLA DR, así como, 3) Potencial de diferenciación multipotencial, en condroblastos, adipocitos y osteoblastos (Dominici et al., 2006).

Los defectos óseos de tamaño crítico (CSDs), son defectos que no cicatrizan espontáneamente durante la vida sin alguna intervención. En modelos animales en monos, se ha reportado que estos defectos pueden llegar a ser de 15 mm siendo los más relacionados con los seres humanos (Szpalski, et al., 2010). Actualmente millones de pacientes, requieren terapéuticas con injertos o sustitutos óseos para tratar defectos o enfermedades que alteran la calidad de vida de estas personas. Esto puede ocurrir debido a trauma o a la resección de tejido neoplásico o infectado, lo cual sigue siendo aún un reto para tratar, devolver función y calidad de vida (Kleinhans et al., 2015). Así mismo se han descrito defectos óseos de tamaño no crítico, en los cuales existe la capacidad de regeneración espontánea, siempre y cuando exista: 1) soporte del tejido blando

adyacente, 2) mantenimiento del espacio para la formación del coágulo sanguíneo, lo cual va a favorecer la migración de células troncales, así como la angiogénesis y 3) exclusión de células no osteogénicas como células las epiteliales. Esto se puede presentar en defectos de 4 o 5 paredes, en donde se sometieron 27 pacientes a enucleación de quistes que excedían los 40 mm y a los 24 meses se observó una regeneración completa y espontánea sin la ayuda de un material de relleno (Chiapasco et al., 2000). Para la regeneración de tejidos es importante la aplicación de la triada de la ingeniería tisular, la cual consta de (i) Andamios o soportes tridimensionales porosos, (ii) Células (diferenciadas o indiferenciadas) y (iii) Señales, las cuales pueden ser físicas, por medio de bioreactores o químicas, por medio de factores de crecimiento (Correia et al., 2014). Es importante tener en cuenta que los andamios deben contar con criterios ideales como lo son: a) Excelentes propiedades mecánicas, b) baja toxicidad, c) Simulación de la matriz extracelular, d) proveer soporte celular y e) contar con una tasa de degradación que sea aproximadamente igual a la tasa de crecimiento del nuevo tejido (Sokolsky-Papkov et al., 2007). Así mismo, que promueva la migración, distribución espacial, adhesión y proliferación celular, hasta que sea reemplazado por una nueva matriz en el sitio intervenido (Simon et al., 2015).

Se ha reportado ampliamente en la literatura el gran potencial que tienen tanto los concentrados plaquetarios autólogos como andamios, las DPSC`s y sus productos llamados secretoma para la regeneración de tejidos posterior a defectos óseos de tamaño crítico como moléculas bioactivas (Maraldi et al., 2013; Mario Gimona, et al., 2017). La Fibrina rica en plaquetas pura (P-PRF) como andamio, disminuye las secuelas postoperatorias comunes (Dolor, inflamación, Trismus) y además acelera significativamente la cicatrización de los tejidos blandos, la regeneración de hueso y el aumento de la densidad ósea en alvéolos post exodoncia en el sitio de la herida quirúrgica compararlo con un sito control (Uğur & Mehmet, 2017). Adicionalmente, al ser comparado con un scaffold de colágeno, la P-FRP demostró ser superior tanto para la proliferación de células de periostio, las cuales son de suma importancia para el crecimiento, desarrollo y regeneración ósea y cartilaginosa, así como también en la disminución del dolor y una rápida cicatrización de la herida quirúrgica (Gassling et al., 2010). Esto se debe a la fisiología de la fibrina rica en plaquetas, la cual tiene varias ventajas a diferencia del PRP, como lo con su configuración tridimensional permite una mejor viabilidad, morfología,

proliferación, diferenciación, respuesta a estímulos, comunicación célula – célula, estimulación de la angiogénesis, evasión del sistema inmune, así como una mayor diferenciación osteogénica de las células troncales mesenquimales en condiciones dinámicas en 3D la cual adicionalmente permite una protección de la proteolisis de los factores de crecimiento entre otras funciones con relevancia in vivo (Gasparotto et al., 2014). Se ha evidenciado que el adhesivo de fibrina permite la liberación de factores de crecimiento hasta 14 días después de su activación a diferencia del PRF que tienen una liberación hasta 10 días después (Kim et al., 2010; Kobayashi et al., 2016). Es importante proveer estos concentrados de un número considerable de plaquetas puesto que los efectos biológicos ideales se han observado cuando se obtiene una concentración de plaquetas de aproximadamente $1x10^6$ / uL. Cuando se obtiene una concentración menor, se obtiene un efecto poco óptimo y las concentraciones mayores reflejan un efecto inhibitorio (Weibrich et al., 2004). Hsu Et al. demostró que existe actividad antiproliferativa de células orales cuando son tratadas con altas concentraciones de PRP lo cual puede ser debido a la abundante secreción de trombospondina 1 de este concentrado (Hsu, & Tseng, 2009).

La aplicación de células con gran potencial osteogénico, es importante en la regeneración ósea. Las DPSC`s, juegan un papel muy importante en el campo de la medicina regenerativa e ingeniería tisular, puesto que, estas células indiferenciadas tienen la increíble capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en varios linajes celulares adultos con funciones especializadas (Potdar & Jethmalani, 2015). Así mismo, estas células cuentan con la capacidad de inmunomodulación, homing y además, no tienen riesgo de generar teratoma en contraste con las células troncales embrionarias o las células troncales pluripotenciales inducidas. Su fácil aislamiento, la expansión a bioescala y la diferenciación multipotencial de las DPSC`s las hacen candidatas ideales para la terapia basada en células y en procesos de regeneración, cicatrización y reparación de tejidos y órganos, así como para evitar procesos pro inflamatorios agudos que provocan el rechazo de transplantes. Esto se debe a la capacidad inmunomoduladora de las células troncales, por la mínima expresión de HLA I y ausencia de HLA II, lo que trae consigo la inhibición de linfocitos T CD4, CD8 y NK, así como la generación de linfocitos T reguladores (Yan et al., 2014) .

Marco Teórico

Defectos en el macizo craneofacial: El macizo craneomaxilofacial, es un complejo formado por diferentes tipos de estructuras y órganos que mantienen una homeostasis funcional para el cumplimiento de funciones relevantes como masticación, fonación, olfacción, respiración e incluso protección de estructuras vitales como el encéfalo. Este complejo puede ser afectado por diferentes condiciones como traumatismos, heridas por arma de fuego, alteraciones congénitas, neoplasias o por cirugías ablativas las cuales pueden llegar a generar defectos críticos resultando en alteraciones funcionales y estéticas severas (Zhang et al., 2020).

El traumatismo craneoencefálico severo se asocia con fracturas de la región maxilofacial en el 50% de los casos debido principalmente a accidente automovilístico. En el tratamiento de elección se opta por realizar reducción abierta y fijación interna con material de osteosíntesis de las estructuras diastasadas, sin embargo, no se logra un restablecimiento completo de la arquitectura y función de los tejidos lesionados. Los defectos del área naso orbito frontal se presentan siempre con desfiguramiento facial severo para los individuos que lo presentan. Este tipo de defectos se puede presentar por ablaciones tumorales, secuelas traumáticas o por cirugías craneomaxilares generando secuelas sociales y deterioro notable en la calidad de vida de las personas que lo presentan. Para el tratamiento de este tipo de defectos se han reportado la toma de injertos libres, contorneo de mallas de titanio, la planeación quirúrgica asistida por computadora para la generación de implantes a la medida de diferentes materiales como el poliéter éter cetona (PEEK), polietileno de baja densidad, polimetilmetacrilato y de igual manera, se ha implementado en gran medida la regeneración con injertos óseos autólogos (Chen et al., 2018).

En las últimas décadas, los injertos autólogos son determinados como el gold standard para la regeneración y reconstrucción de este tipo de defectos, sin embargo, existen algunas limitantes como la morbilidad del sitio donante, el aumento del tiempo operatorio y la cantidad limitada de tejido que hacen que estas técnicas no sean de primera opción en algunos casos y que surjan terapéuticas alternativas (Kishimoto & Tran, 2018).

Células troncales mesenquimales de origen oral y craneomaxilofacial y su papel en la regeneración tisular: Las terapias basadas en células troncales son una estrategia de la

ingeniería de tejidos para el restablecimiento completo de tejidos y órganos lesionados. Es de importancia la aplicación no solo de un componente celular ideal para el tejido de interés, sino también de un andamio y factores de crecimiento para generar un potencial regenerativo real, aplicando la triada de la ingeniería tisular (Kurobe et al., 2014). Las células troncales mesenquimales son células privilegiadas por tener multi y pluripotencialidad, capacidad anti inmunogénica, capacidad proliferativa y posibilidad de criopreservación lo que facilita su accesibilidad independientemente del tiempo (Mortada & Mortada, 2018). En la actualidad se han reportado diferentes estudios clínicos con células troncales mesenquimales que demuestran la seguridad de su aplicación y el éxito de regeneración de los tejidos. Es relevante de igual manera, destacar la cantidad y calidad de células troncales que se debe tener en cuenta para el tipo de tejido a tratar las cuales oscilan entre 1 - 10 x 106 células por mL de defecto (Castillo-Cardiel et al., 2017; Dhote, Charde et al., 2015; Khojasteh et al., 2017; Weng et al., 2017) (Tabla 1).

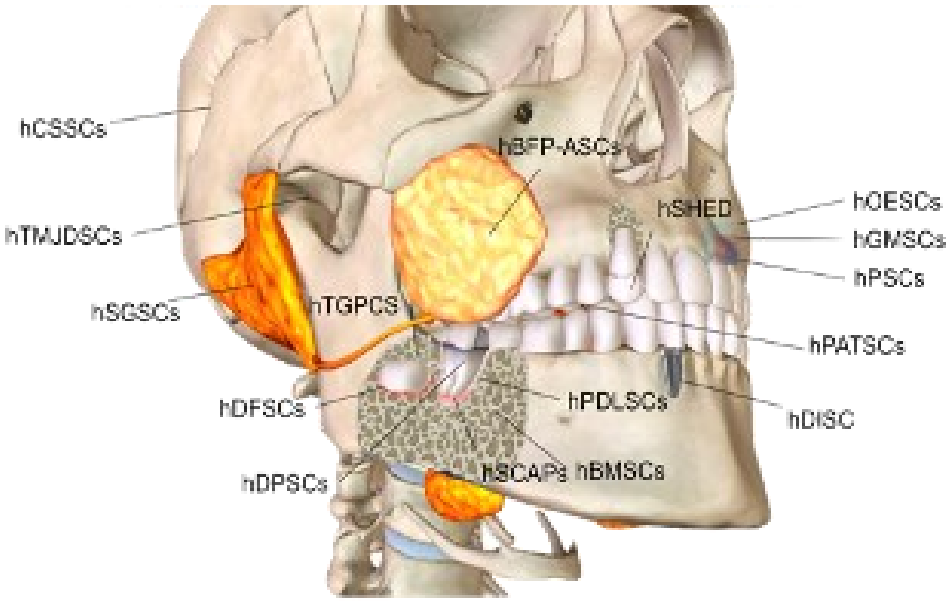
Tabla 1. ***Aplicación de células troncales en estudios clínicos aleatorizados***

Autor	País	Año	Tipo estudio	Tamaño muestra	Intervención	Cantidad celular	% regeneraciòn	Eventos adversos
				10	Reducción fractura mandibular		Grupo Caso 18.95 % escala grises p<0,05	
Cardiel et al.	México	2016	Ensayo clínico controlado	10	Rafi mandibular + ADMSCs	10x106	Grupo Caso 36.4 % escala grises p<0,05	NO
				10	Implantes dentales		585.85 HU p<0,05	
Weng et al.	Taiwan	2017	Ensayo clínico controlado	1	Implante dental + BM MSCs (STEMBIOS)	1x106	668.00 HU p<0,05	NO
			Ensayo clínico controlado	14	Curetaje defecto		52% p<0,05	
Dhote et al.	India	2015		14	UCSC (β-TCP) + (rhPDGF-BB)	10 x 106	88% p<0,05	NO
			Ensayo clínico controlado	3	Cresta Iliaca + Membrana colágeno		70 %	
Khojasteh et al.	Irán	2017		4	Cresta Iliaca + BFSCs	1 x 106	82.5 %	NO

RAFI = Reducciòn abierta fijación interna, ADMSCs = Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells, BMMSCs = Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, β-TCP = Beta Tricalcium Phosphate, rh-PDGF-BB = Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor ucsc = Umbilical Cord Stromal Cells, BFSCs = Buccal Fat Pad Derived Mesenchymal Stem Cells

Diferentes autores han reportado las diferentes células troncales craneomaxilofaciales (Figura 1) destacando que las células con el mayor potencial osteogénico son las células troncales de pulpa dental humana (DPSC`s) ( Ponnuraj et al.,, 2017; Yasui et al., 2017). Se ha comparado el potencial osteogénico de diferentes fuentes de células troncales con andamios de plasma rico en plaquetas teniendo en cuenta la superficie de contacto hueso implante resultando en 66.7% ± 3.6% para el grupo de DPSC`s/PRP, 62.5% ± 3.1% (dBMSC/PRP), 39.4% ± 2.4% para (PC/PRP), y 30.3% ± 2.6% para el grupo control (Ito & Ueda, 2011).

Figura 1. ***Fuentes de células troncales del macizo craneofacial***



Fuentes de células troncales en el complejo oral y craneomaxilofacial:Fuentes de células troncales en el complejo oral y Maxilofacial: hBMSCs: Human Bone marrow-derived MSCs, DPSC`s: Human dental pulp stem cells; hSHED: Human Stem cells from human exfoliated deciduous teeth; hPDLSCs: Human Periodontal ligament stem cells; hDFSCs: Human Dental follicle stem cells; hTGPCs: Human Tooth germ progenitor cells; hSCAP: Human Stem cells from the apical papilla, hOESCs: Human Oral epithelial progenitor/stem cells; hGMSCs: Human Gingiva-derived MSCs, hPSCs: Human Periosteum-derived stem cells, hSGSCs: Human Salivary gland-derived stem cells, DISC: Human Dental implant stem cells, BFP-ASCs: Human Bichat's fat pad Adipose-derived stem/stromal cells, hTMJDSCs : Human Temporomandibular joint disk -derived stem

cells, hPATSCs: Human palatal fet tissue-derived stem cells and hCSSCs: Human Craniofacial sutures derived MSCs. (3,4,7)

Implementación de las células troncales mesenquimales en andamios de concentrados plaquetarios: Se ha demostrado que la implementación de andamios tridimensionales comparados con el cultivo bidimensional de las células troncales potencian en gran medida su potencial proliferativo y de diferenciación ya que estos andamios facilitan las interacciones célula célula, permiten un reservorio de factores de crecimiento y del secretoma celular, mantienen un ambiente idóneo para la eliminación de desechos celulares y semejan condiciones fisiológicas (Persson et al., 2018). Es importante destacar que las DPSC`s son células indiferenciadas que requieren de estímulos físicos o químicos para inducir su diferenciación ya que sin ellos se mantendrán en un estado indiferenciado (Claus & Tobita, 2010). Para la inducción de la diferenciación celular a fenotipo osteogénico que potencien la expresión de genes como la fosfatasa alcalina, osteocalcina, RUNX2 se utilizan agentes bioactivos como el ácido ascórbico, b glicerofosfato y la dexametasona (Langenbach & Handschel, 2013) . Terezia et al. reportan únicamente una disminución de la expresión del marcador CD90, así como, una sobreregulación de marcadores de pluripotencia como el OCT4 y NANOG y de igual manera, una sobreregulación de genes osteogénicos ALP (Fosfatasa alcalina), OCN (Osteocalcina), BSP (Sialo Fosfo Proteína ósea) Y RUNX2 en células las cuales se indujo una diferenciación osteogénica con el medio de diferenciación; hubo mayor expresión de estos genes cuando el medio contenía suero humano (Okajcekova et al., 2020).

Vías de señalización implicadas en la regeneración ósea: El componente óseo se forma a partir de dos fases relevantes incluyendo la osificación endocondral en donde participa la formación de un andamio cartilaginoso previo para su posterior osificación y la osificación intramembranosa donde existe formación de hueso sin la intermediación de cartílago. La integridad de la arquitectura y función del hueso se mantienen por un balance entre el osteoblasto y el osteoclasto siendo esta primera célula la encargada de la formación de ósea (Zhang et al., 2018). Existen vías de señalización, así como, factores de crecimiento que se ha demostrado participan en la regulación positiva de la osificación incluyendo en gran medida al TGFβ2 (Factor de crecimiento transformante beta) , y a las BMP´s (Proteínas óseas morfogenéticas) las cuales participan en vías de señalización

canónicas dependientes de SMAD´s y no canónicas independientes de SMAD´s como la vías de señalización MAPK (Proteínas quinasas asociadas a mitógenos) (Morrison et al., 2012).

Dentro de las vías no canónicas dependientes de SMAD´s, el TGFβ2 con ayuda del co receptor beta glucano se une a receptores de proteína quinasa serina treonina tipo II los cuales presentan 3 dominios incluyendo el dominio extracelular rico en serinas, dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de residuos de serina y treonina). Posterior a la unión del TGFβ2 el dominio citoplasmático del receptor tipo II trans fosforila la porción GS (rica de glicinas y serinas) del receptor tipo I también llamado ALK5 formando un heterotetramérico y tras su activación por medio de la proteína SARA, este fosforila R-SMAD`s (Smad 2 y 3) y permite la formación de un complejo heteroolimérico por su unión a Co-SMAD´s (SMAD 4) y este es traslocado hacia el núcleo. Este complejo reconoce una secuencia de ADN (5' AGAC- 3'), también llamada SBE (elemento de unión a Smad), se reclutan coactivadores y regulan la expresión de factores transcripcionales importantes para la diferenciación osteoblástica de las células troncales como Runx2 (Chen et al., 2012).

Teniendo en cuenta las vías no canónicas en que participa el TGFβ2, se encuentra la vía MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos). Son activadas por una cascada de proteínas quinasas que regulan, proliferación celular, diferenciación y apoptosis. En mamíferos las MAPK se agrupan en 3 grandes familias incluyendo ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares), JNK (Jun quinasas N-terminal, p38/SAPK (proteínas quinasas activadas por estrés) y son activados por estímulos extracelulares. Los principales MAPKK para la familia p38 son MKK3 y MKK6. Posterior a la unión del TGFβ2 al receptor tipo II a nivel extracelular se activa TAK1 (quinasa 1 activado por TGFβ2) y esta a su vez activa a MKK3 y MKK6, fosforilan p38 para la convergencia final en el gen Runx2 que participa en el control de la diferenciación de células troncales mesenquimales (Lee & Bae, 2002).

Planteamiento del problema

Actualmente existen terapéuticas involucradas en la regeneración tisular las cuales llevan a cabo la aplicación de sustancias bioactivas que mejoran la regeneración del tejido y disminuyen el tiempo de cicatrización de la herida quirúrgica; dentro de estos procedimientos se encuentra la aplicación de concentrados plaquetarios autólogos, ya sea en la regeneración del alveolo post exodoncia, la colocación de implantes dentales, regeneración ósea posterior a traumas faciales, cirugías ablativas o alteraciones congénitas que generan defectos de tamaño crítico. Para mejorar el proceso de regeneración ósea se han descrito diferentes técnicas con la implementación de xenoinjertos, aloinjertos con la combinación de sustancias bioactivas como la proteínas óseas morfogenéticas o los concentrados plaquetarios. En la actualidad a pesar de que estas terapias reportan muy buenas tasas de éxito, no se ha logrado la regeneración ósea de un 100 % en defectos relevantes del macizo craneofacial trayendo consigo secuelas estéticas y funcionales importantes. De igual manera, cabe destacar las falencias y la urgencia de ejecutar estudios novedosos con potencial de aplicación clínica en seres humanos con nuevas herramientas como lo son los análisis bioinformáticos con el fin de diseñar mejores estudios *in vitro* con células troncales.

Justificación

Debido a que en la actualidad existen falencias en la regeneración de defectos críticos del macizo craneofacial, es importante tener certeza de cuál es la mejor técnica con aplicabilidad a este tipo de defectos e implementar técnicas novedosas que puedan mejorar la regeneración ósea en un 100%. Para lograr este cometido, debe tenerse en cuenta la aplicación de la triada de la ingeniería tisular con 1) Células de gran calidad de grado clínico con el mayor potencial osteogénico en el cuerpo como lo son las DPSC's las cuales son de muy fácil obtención y aislamiento para el equipo de cirugía maxilofacial, 2) Un andamio que sea biocompatible, biodegradable, costo efectivo y de fácil manufactura como lo es el adhesivo de fibrina rica en plaquetas; su ventaja es su idoneidad para el andamiaje de las células troncales por su conformación tridimensional y la liberación de factores de crecimiento lo cual potencian el efecto osteogénico celular. Como tercer factor se refleja la relevancia de señales bioquímicas o factores solubles como los son factores de crecimiento o el secretoma de las células troncales que aumentan el potencial de formar hueso de manera significativa lo que lo hace un enfoque atractivo para el campo de la cirugía oral y maxilofacial y su aplicación en defectos óseos críticos. Por esta razón, es fundamental utilizar herramientas bioinformáticas como el análisis *in silico* de estudios previos con células troncales para diseñar y ejecutar estudios más novedosos con potencial de aplicación clínica en odontología regenerativa.

Situación Actual

Se ha reportado ampliamente el gran potencial que tienen tanto los concentrados plaquetarios autólogos, las células troncales de pulpa dental humana y sus productos llamados secretoma para la regeneración de tejidos posterior a defectos óseos de tamaño crítico en el área de la cirugía oral y maxilofacial.

a. Fibrina en plaquetas pura (P-PRF), Se ha evidenciado que la (P-PRF) disminuye las secuelas postoperatorias comunes (Dolor, inflamación, trismus) y además acelera significativamente la cicatrización de los tejidos blandos, la regeneración de hueso y el aumento de la densidad ósea en alvéolos post exodoncia en el sitio de la herida quirúrgica comparado con un sito control (Sybil et al., 2020). Por lo tanto, al ser comparado con un andamio de aloinjerto óseo, la fibrina rica en plaquetas (PRF) demostró ser superior tanto para la proliferación de células de periostio, las cuales son de suma importancia para el crecimiento, desarrollo y regeneración ósea y cartilaginosa, así como también en la disminución del dolor y una rápida cicatrización de la herida quirúrgica (Azangookhiavi & Dadpour, 2020). Esto se debe a la fisiología de la fibrina rica en plaquetas, la cual tiene varias ventajas a diferencia del plasma rico en plaquetas (PRP) como las siguiente: (Caruana & Soares, 2019; Doiphode et al., 2016; Nasirzade et al., 2020)

1. Su configuración tridimensional promueve un mejor comportamiento celular permitiendo una mejor viabilidad, morfología, proliferación, diferenciación, respuesta a estímulos, comunicación célula–célula, estimulación de la angiogénesis, evasión del sistema inmune, así como, una mayor diferenciación osteogénica de las CMM en condiciones dinámicas en 3D entre otras funciones con relevancia *in vivo*. Liberación de factores de crecimiento de sus gránulos alfa post activación, los cuales incrementan el potencial osteogénico, mitogénico, angiogénico, quimiotáctico, de CMM, osteoblastos y fibroblastos promoviendo principalmente una aceleración de la cicatrización ósea y en tejido blando de la herida quirúrgica. 2. Su red tridimensional de fibrina permite una protección de la proteolisis de los factores de crecimiento. 3. El PRF tiene funciones inmunitarias como la quimiotaxis de leucocitos durante su activación y liberación de citoquinas

como IL-1, IL-4, IL-6 y TNF-a, también contiene citoquinas antiinflamatorias tales como la IL-4. 4. FRP autóloga, es un material biocompatible, biodegradable, no carcinogénico, bioactivo y costo efectivo.

Las DPSC`s, juegan un papel muy importante en el campo de la medicina regenerativa e ingeniería tisular, puesto que, estas células indiferenciadas tienen la increíble capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en varios linajes celulares adultos con funciones especializadas. Del mismo modo, cuentan con la capacidad de inmunomodulación y homing, no tienen riesgo de generar teratoma en contraste con las células troncales embrionarias o las células troncales pluripotenciales inducidas. Su fácil aislamiento, la gran cantidad de expansión y la diferenciación multipotencial de las DPSC`s las hacen candidatas ideales para la terapia basada en células y en procesos de regeneración, cicatrización y reparación de tejidos y órganos, así como, para evitar procesos pro inflamatorios agudos que provocan el rechazo de transplantes.

Esto se debe a las características de las DPSC's, las cuales tiene varias ventajas como:

A. Capacidad inmunomoduladora, por la mínima expresión de HLA I y ausencia de HLA II, lo que trae consigo la inhibición de linfocitos T CD4, CD8 y NK, así como, la generación de linfocitos T reguladores. Además, la secreción de prostaglandina E2, la cual impulsa la diferenciación de macrofagos de fenotipo M1 (inflamatorios) a M2 (antiinflamatorios). Las células T reguladoras con CMM, tienen mayor capacidad inmunosupresora que las células t reguladoras sin CMM (Gao et al., 2016)
B. DPSC`s, en estudios preclínicos demostraron tener mayor potencial osteogénico que otros tipos de células troncales, entre los que se encuentran, células troncales de médula ósea, células troncales de tejido adiposo y células troncales de periostio.

Del mismo modo, varios estudios clínicos con seguimiento a 3 años, evidencian la seguridad de la implementación de las DPSC`s autólogas en humanos para reparos óseos oromaxilofaciales y también para regenerar defectos óseos y periodontales en distal del segundo molar post exodoncia de terceros molares mandibulares. Adicionalmente, recomiendan la utilización de las células troncales de pulpa dental humana de manera confiable. (Ferrarotti et al., 2018)

OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir y estandarizar una técnica de obtención, aislamiento, caracterización y andamiaje de osteoblastos diferenciados a partir células troncales mesenquimales de pulpa dental humana (DPSC's) para su aplicación terapéutica en defectos óseos de tamaño crítico en cirugía oral y maxilofacial.

Objetivos específicos

Determinar de manera *in silico* cuál es el método que induce un mayor potencial osteogénico.

Fortalecer la cooperación entre diferentes líneas de investigación de la Universidad El Bosque.

Metodología

Tipo de estudio: Experimental

Población y muestra: Universo muestral: Dientes recolectados por indicación de exodoncia. Se obtendrán 4 dientes por paciente y en total se obtendrán de 1 donante mayor de edad (>18 años) teniendo en cuenta:

Población y muestra

Criterios inclusión

- Pacientes ASA I.
- Pacientes mayores de edad (>18 años).
- Pacientes con indicación de extracción ortodóntica o profiláctica de terceros molares.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado.

Criterios exclusión:

- Caries dental asociada a las muestras. (Las muestras contaminadas se asocian a hallazgos clínicos (Presencia de opacidades y destrucción dental secundaria a procesos cariosos) y radiográficas (radio lucidez asociada a estructura dental consistentes en lesiones cariosas).
- Contaminación de la muestra. Se identificará cuando se evidencie hongos o bacterias bajo microscopía de cono invertido al momento de realizar el cultivo en frascos t25.
- Dientes que requieran de odontosección

Métodos y técnicas par la recolección de información

a. *Cultivo primario:* Aprobación del comité de ética institucional de la Universidad El Bosque (Código Nur 04-2018) teniendo en cuenta principios éticos de la declaración de Helsinki. Se obtuvo de 4 terceros molares por indicación ortodóncica de paciente femenina de 21 años de edad ASA I con protocolo de

extracción dental convencional bajo condiciones de asepsia y antisepsia teniendo en cuenta criterios de inclusión y exclusión (Tabla 2).

Tabla 2. ***Criterios obtención de la muestra***

Inclusión	Exclusión
Pacientes ASA I.	Pacientes ASA II, III, IV
Pacientes mayores de edad (>18 años).	Caries dental asociada a las muestras.
Extracción indicada de terceros molares	Contaminación de la muestra.
Firma consentimiento informado.	Dientes que requieran de odontosección.

Criterios de inclusión y exclusión para la selección de pacientes.

b. *Citometría de flujo:* Se realizó el análisis de expresión de marcadores específicos de células troncales mesenquimales teniendo en cuenta criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). Para determinar el fenotipo de las DPSC´s, se evaluó por citometría de flujo el panel de marcadores de células troncales CD105 +, CD90 +, CD73 +, CD34-/45- utilizando anticuerpos acoplados a marcaje fluorescente. La medición de los marcadores se realizó en cultivo monocapa utilizando como controles las células sembradas y puestas en adhesión por 24 horas. En tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron (en un volumen final de 250 uL mas 5 ul de cada anticuerpo) de la siguiente manera; 50.000 células sin marcar, 50.000 células con Anti CD105 – PE (Amarillo), Anti CD90 – APC (Rojo), Anti CD34 – FITC (Verde), Anti CD45 – PERCP (Rojo), 50.000 células con Anti CD73 – PE (Amarillo), Anti CD146 - FITC (Verde), 50.000 células con 7AAD-PERCP (Viabilidad). Se procedió a incubar por 30 minutos en oscuridad y a leer por citometría.

c. *Obtención del secretoma:* Se realizó la obtención del secretoma de las DPSC`s, se realizó lavado con PBS 4 veces en frascos T75, se realizó cultivo con DMEM no condicionado sin suero fetal bovino (SFB) ni antibiótico (AB), se cultivó por 48 horas, se extrajo el medio, se transfirió a hielo, se centrifugó a 3000 RPM 5 minutos para remover células y debris, se realizó filtrado con filtro 0.2mm y se almacenó a -80ºC para su posterior utilización.

d. *Diferenciación osteogénica de las DPSC`s:* Se realizó una pre diferenciación osteoblástica de las DPSC`s en cultivo en monocapa realizando lavado del medio de cultivo con PBS y se realizó colocación de 10 mL de medio osteogénico (StemPro™ Osteogénesis Differentiation Kit) en los frascos T75. Se realizó cambió cada tercer día hasta completar 7 días.

e. *Obtención y preparación del adhesivo de fibrina rica en plaquetas con plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento:* PRP es definido como una alta concentración de plaquetas autólogas en un pequeño volumen de plasma autólogo. Específicamente en PRP hay una concentración de plaquetas de al menos $1x10^6$ de plaquetas/microlitro (+- 250.000) en 5 mL de volumen de plasma. Por encima del conteo de los valores normales los cuales están en un rango de 150.000 a 350.000 plaquetas/microlitro. Se obtuvieron concentrados plaquetarios donados por la FUHECO con una concentración de $1x10^6$ plaquetas por uL. (Tabla 3)

Tabla 3. ***Características concentrados plaquetarios***

Hemoderivado	**Concentrado # 1**	**Concentrado # 2**
Referencia	CQ341LA	CQ341LA
Lore	71PG08AB00	71PG08AB00
Código barras	L10042100108821	L10042100107921
cantidad	$1X10^6$ plts/uL	$1X10^6$ plts/uL
Método Obtención	Sangre total	Sangre total

Características de los concentrados plaquetarios donados por la FUHECO.

f. *Incorporación de osteoblastos en el adhesivo de fibrina rica en plaquetas y factores de crecimiento:* Para que las DPSC's puedan cumplir sus funciones esenciales como adhesión, migración, proliferación, auto renovación, es necesaria dotarlas de un medio ambiente ideal que asemeja condiciones fisiológicas en su matriz extracelular, por esta razón, tenemos en cuenta la triada de la ingeniería tisular (células DPSC´s, andamios (matriz de fibrina) y factores de crecimiento (intraplaquetarios), y de esta manera proveer un potencial en procesos de regeneración ósea, tisular, cicatrización de la herida, oseointegración etc. Se realizaron constructos de 300 uL los cuales incluyeron: secretoma al 10% (30 uL),

plasma 85% (255 uL) con la suspensión celular con 50.000 osteoblastos y se activaron con gluconato de calcio 5%.

g. *Viabilidad de las células incorporadas en la matriz de fibrina rica en plaquetas:* Los osteoblastos incorporadas en la matriz de fibrina rica en plaquetas fueron examinadas por ensayo de células vivas/muertas. Se incubaron con Calceína – AM (verde) (2 mM, Dojindo, Kumamoto, JAPAN) para células vivas y Homodímero de etidio-1 (rojo) (4 mM, Invitrogen, Paisley, UK) para células muertas por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS. Se procedió a observar con microscopía de fluorescencia y microscopía confocal. Las fotos se capturaron en una serie de cortes horizontales y luego se combinaron mediante análisis "Z stacked" por composición de imágenes del constructo para ver su disposición.

h. *Predicción In Silico del potencial osteogénico de los constructos por medio de asociaciones proteicas en base de datos STRING:* Construcción de la red proteica de asociaciones mediante STRING, análisis de datos *in silico* teniendo en cuenta los datos reportados en la literatura y posibles interacciones entre los factores de crecimiento y secretoma de las DPSC`s. Se realizó una búsqueda de literatura para verificar la expresión de proteínas osteogénicas sobre expresadas y sub expresadas del secretoma de células troncales dentales (DMSC´s) al ser sometidas a suplementación osteogénica y se compararon los procesos biológicos una vez adicionadas las proteínas reportadas del PRP en el programa STRING Database STRING: functional protein association networks (string-db.org) con el fin de identificar las interacciones entre estas proteínas.

Hipótesis de estudio: El constructo osteoblastos embebidos en una matriz de adhesivo de fibrina rica en plaquetas suplementado con el secretoma de las DPSC´s, presenta el mayor potencial osteogénico de manera *in silico.*

Plan de tabulación y análisis: Estadística descriptiva: Los datos recolectados en esta investigación serán presentados en tablas, figuras, gráficos y serán expresados en frecuencias absolutas y relativas.

Consideraciones Éticas

De acuerdo con las *NORMAS CIENTÍFICAS, TÉCNICAS Y ADMINISTRATIVAS PARA LA INVESTIGACIÓN EN SALUD RESOLUCIÓN Nº008430* de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. La investigación que se realice en seres humanos será desarrollada conforme a los criterios CAPITULO 1 ARTICULO 6 y 7 y se clasifica como Investigación con riesgo mínimo de acuerdo con el artículo 11. Este proyecto cuenta con el aval del comité institucional de ética de la Universidad El Bosque con protocolo Nur 064-2018. (Anexo 1). Por esta razón, se cuenta con el consentimiento informado por escrito del sujeto de investigación o su representante legal con las excepciones dispuestas en la resolución en los artículos 14 y 15 (Anexo 2). De igual manera se cuenta con el aval de la Fundación Hematológica Colombia (FUHECO) para la donación de hemoderivados (Anexo 3).

"Investigación con riesgo mínimo: Son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o sicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, electrocardiogramas, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas sicológicas a grupos o individuos en los que no se manipulara la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico y registrados en este Ministerio o su autoridad delegada, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos que se definen en el artículo 55 de esta resolución.

Teniendo en cuenta el primer principio, RESPETO, el cual rige que los participantes ingresen voluntariamente al estudio en donde previamente se les brindará información

relevante al tema para que ellos decidan si quieren participar o no en la investigación sin ningún tipo de presión. Al mismo tiempo se les suministrará el consentimiento informado donde se hablará con detalle los parámetros a tener en cuenta en el proyecto. De acuerdo al principio de BENEFICENCIA, teniendo en cuenta el principio de hacer el bien o evitar el daño, se actuará con el fin de buscar el mayor beneficio para el paciente y la sociedad reduciendo los riesgos a mínimos o nulos que puedan causar daños físicos o psicológicos. Finalmente el principio de JUSTICIA, será importante para tener en cuenta que hay personas que requieren mayor atención que otras y de este modo asegurar que los daños y beneficios de la investigación sean equitativos y no generen riesgos innecesarios en la población de estudio.

Se tendrán en cuenta los parámetros de la declaración de Helsinki la cual fue promulgada por la Asociación Médica mundial (AMM) para garantizar el respeto por la autonomía del individuo. Aunque el propósito principal de la investigación médica es generar conocimientos nuevos, este no puede prevalecer sobre los derechos e intereses de investigación.

Resultados

a. *Obtención de la muestra:* La obtención de la muestra se realizó de dientes de pacientes sanos mayores de 18 años, que estuvieran indicados para exodoncia incluyendo terceros molares. Para esto, se realizó odontectomia de terceros molares que no requirieron odontosección con protocolo de asepsia y antisepsia. se lavaron con digluconato de clorhexidina al 0.12% por 5 segundos y se llevaron muestras en medio de transporte que contenía (DMEM basal Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) más solución antibiótica antimicótica (**Gibco™ Antibiotic-Antimycotic).** Se realizó odontosección parcial con fresa 702, 2 mm debajo de la unión amelocementaria y se finalizó con presión digital. Se realizó exéresis de la pulpa con pinzas adson sin garra y se procedió a colocar en solución enzimática (Gibco Collagenase, Type I, powder) a una concentración de 200 U/mL toda la noche. Al día siguiente se realiza centrifugación a 2000 rpm 5 min y se descarta el sobrenadante. El pellet celular se lavó 3 veces con PBS (Merck Phosphate-buffered saline (PBS)) y se procedió a cultivar en frascos de cultivo T25. Se realizó cambio de medio cada tercer día hasta tener un 90% de confluencia. (Figura 2).

Protocolo obtención células troncales mesenquimales de pulpa dental humana

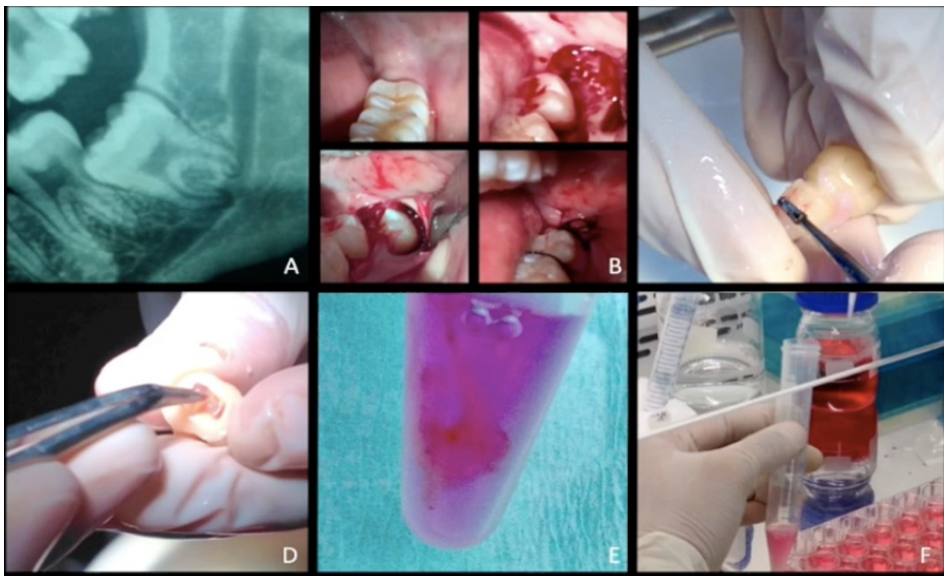


Figura 2*. Protocolo de obtención y aislamiento de las DPSC`s bajo cabina de flujo laminar. A. Molar impactado radiográficamente sin lesiones asociadas. B. Transoperatorio de odontectomía del tercer molar. C. odontosección 2 mm debajo UAC. D. Exéresis de pulpa dental humana. E. Pulpa dental en digestión enzimática. F. Procedimiento bajo condiciones de asepsia y antisepsia en cabina de flujo. Fotos realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO*

b. *Expansión de las DPSC`s en cultivo monocapa:* Se realizó cultivo en monocapa de las hDSPCs. Se realizaron múltiples subcultivos con protocolo de tripsinización (Solución Tripsina EDTA (CASA comercial) hasta pasaje 4, teniendo en cuenta confluencias del 90% observada bajo microscopio cono invertido en frascos T75. Se realizó cambio de medio cada 3 días con solución DMEM 90% + SFB 9% + AB 1% (Figura 3), bajo condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar (Figura 4)

Cultivo primario visto desde microscopio cono invertido

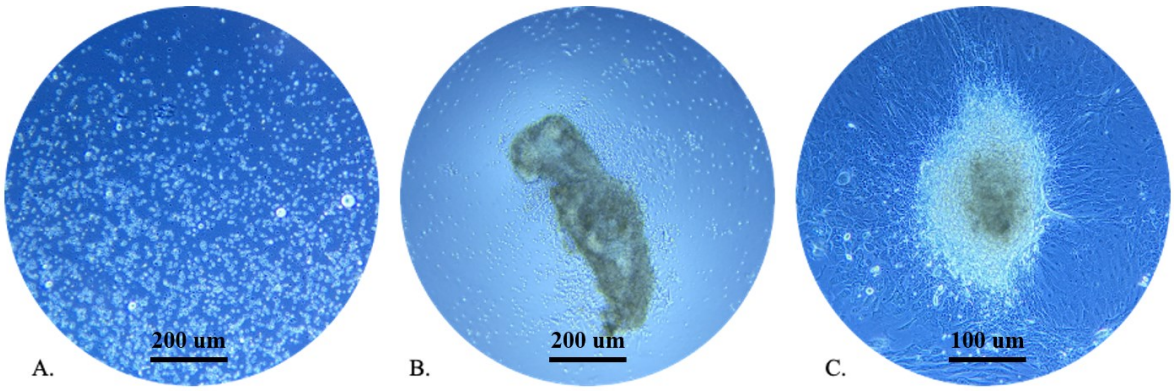


Figura 3. Comportamiento cultivo primario de DPSC`s desde la hora 0 hasta la hora 48 10x. A. células en suspensión, sembradas inmediatamente posterior a la digestión enzimática. B. Explantes de pulpa dental. C. Unidad formadora de colonia (UFC) de DPSC`s 48 horas. Microfotografía realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO

Condiciones de asepsia y antisepsia bajo cabina de flujo laminar

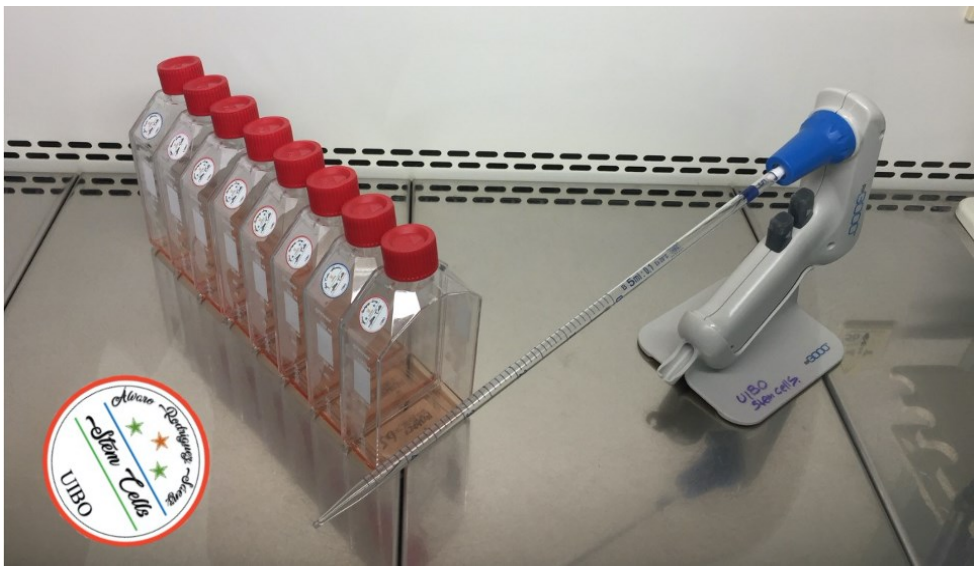


Figura 4. Expansión de la DPSC`s en frascos T75 bajo cabina de flujo bilaminar. Foto realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO.

Morfología cultivo celular a diferentes tiempos

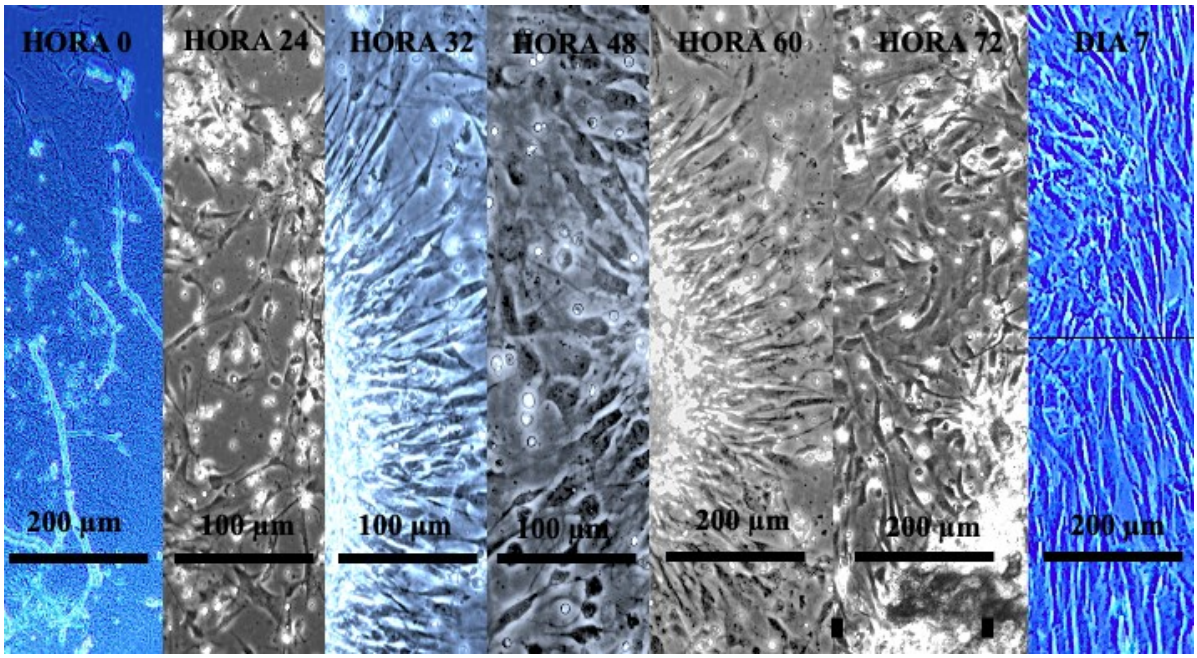


Figura 5. Vista microscopio cono invertido de la siembra de las DPSC`s en frascos de poliestireno de 75cm² en diferentes tiempos. Microfotografía realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO

c. *Verificación inicial del fenotipo de las células troncales mesenquimales DPSC's en cultivo 2D:* Se observó una expresión del 100% de CD105, 99,4 % de CD90, 100 % de CD73, y < de un 7 % de expresión de CD14, 20, 34 y 45 (Figura 6).

Citometría de flujo

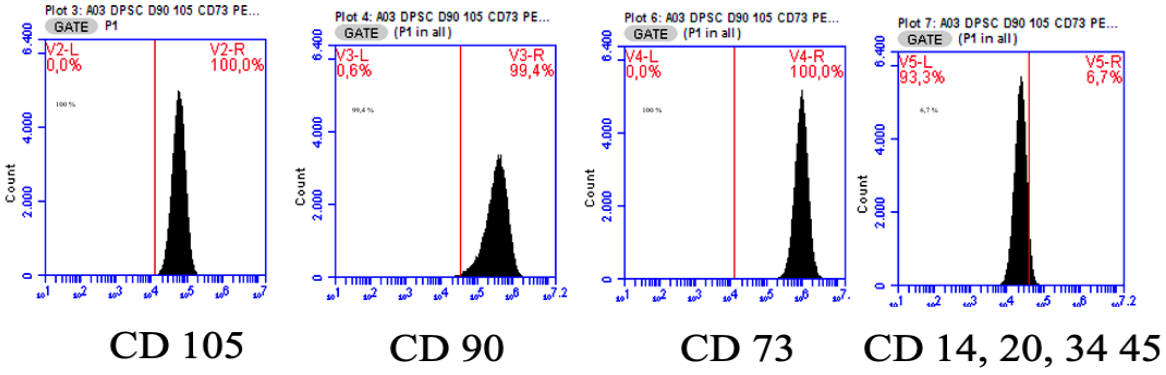


Figura 6. Inmunofenotipificación, marcadores positivos CD105, CD90 Y CD73 Y negativos CD 14, 20, 34 Y 45 para células troncales mesenquimales según la ISCT.

d. *Incorporación de osteoblastos en el adhesivo de fibrina:* Se realizó tripsinización de osteoblastos adheridos a los frascos de cultivo T 75 al séptimo día y se realizó conteo de 50.000 células para ser sembradas en constructos de PRF. En placas de 96 pozos se suspendieron $5x10^4$ osteoblastos en 240 uL de PRP con $1x10^6$

plaquetas x uL, se adicionó 30 uL de secretoma de DPSC`s (10%) y se activaron con 30 uL de gluconato de calcio para tener un volumen final de 300 uL (Figura 7), se evaluaron sus características bajo microscopio cono invertido (Figura 8) y se obtuvieron constructos de de aproximadamente 60 mm^3 (Figura 9).

Constructos fabricados

Figura 7. Constructos de osteoblastos diferenciados a partir de DPSC`s en placas de 96 pozos. Foto realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO

Constructos bajo microscopía cono invertido

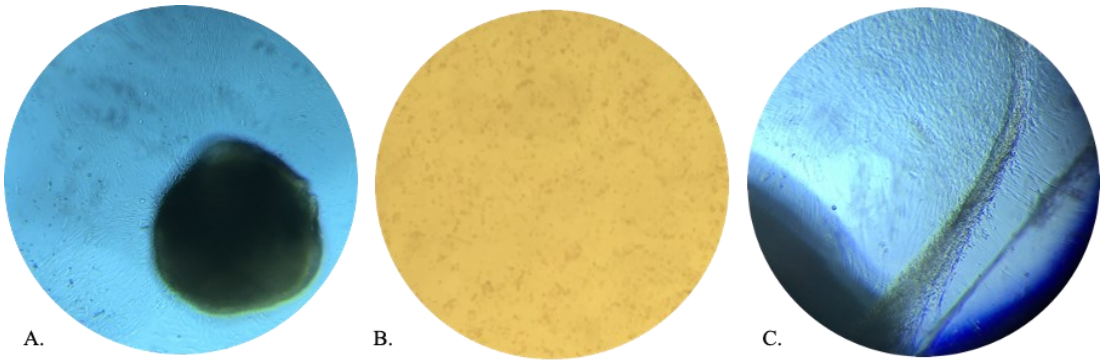


Figura 8. Constructos de osteoblastos vistos sobre microscopia cono invertido. A. Constructo completo a poco aumento. B.Interior del constructo, se observa la disposición de los osteoblastos. C. Adhesión celular a fragmento de fibrina adherida al piso del frasco de cultivo. Microfotografía realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO

Dimensiones de los constructos

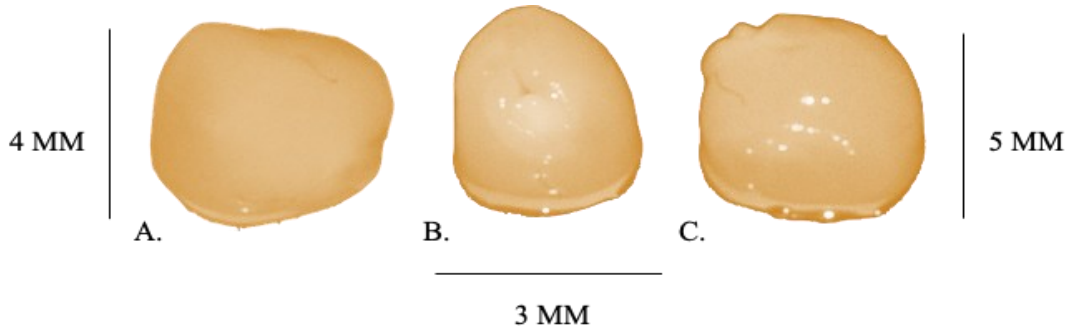


Figura 9. Macrofotografía de los constructos evaluando sus dimensiones a las 48 horas. A. Alto. B. Ancho, C. Profundidad. En promedio presentan 60 mm³. Foto realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO

e. *Viabilidad de las células incorporadas en la matriz de fibrina rica en plaquetas:* Bajo microscopía confocal se puede observar la viabilidad del 100% de los osteoblastos en cultivo en monocapa los cuales presentan aspecto piriforme, mononucleares de núcleo prominente y central (Figura 10). De igual manera, los constructos de osteoblastos al séptimo día no tuvieron afinidad por el homodímero de etidio-1 (rojo) y se observó una alta intensidad de señal verde (Viabilidad) lo que significa que el método de fabricación de los constructos basados en osteoblastos es un método viable. (Figura 11). Se realizó una renderización por Z-Stacking de los constructos para ver la disposición celular observándose una disposición homogénea y un espaciamiento entre 10 y 100 uM entre los osteoblastos. (Figura 12).

Inmunofluorescencia monocapa

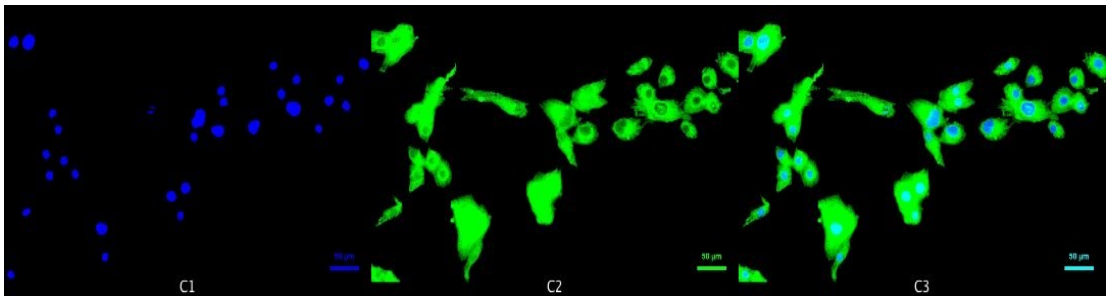


Figura 10. Inmunofluorescencia de cultivo monocapa de osteoblastos con sus núcleos teñidos de DAPI y su citoplasma de Calceína, se evidencia viabilidad celular. Microfotografía realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO

Inmunofluorescencia constructo tridimensional

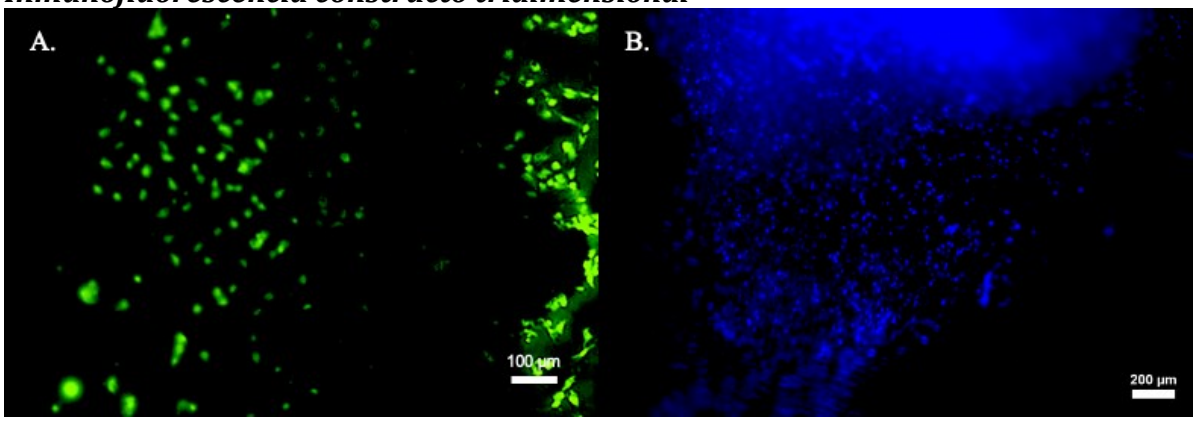


Figura 11. Inmunofluorescencia de constructos 3D vistos bajo microscopio confocal. A. Viabilidad de los osteoblastos en el constructo de adhesivo de fibrina. B. Disposición de las células dadas por la tinción del núcleo celular con DAPI. Microfotografía realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO

Renderización constructo

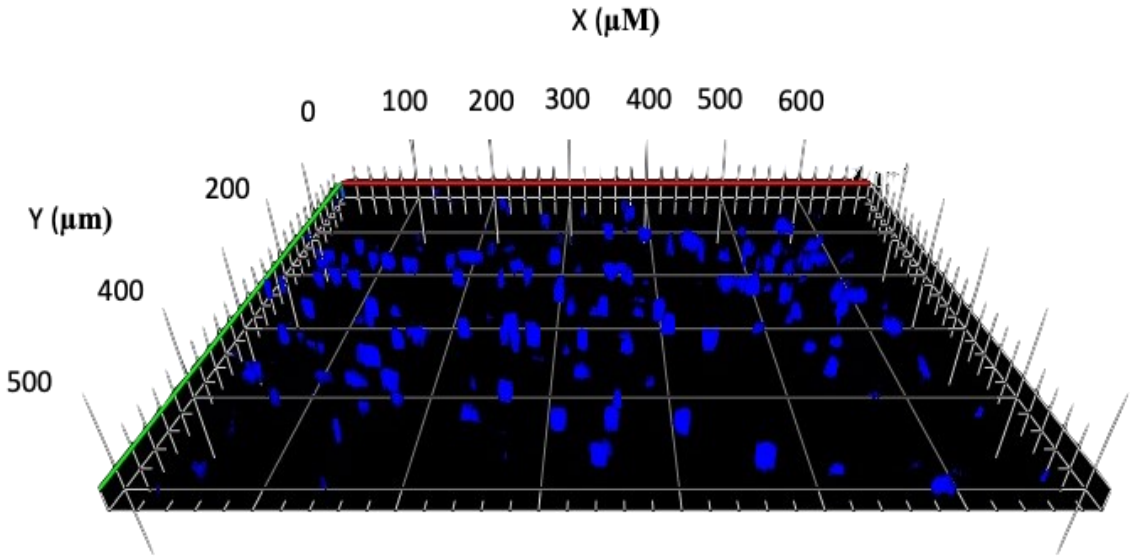


Figura 12. Renderización de constructo por medio de Z-stacking visualizando la disposición celular por medio de tinción de núcleos con DAPI. Microfotografía realizada por Álvaro Rodríguez-grupo UIBO

e. Evaluación in sílico del potencial osteogénico de los constructos: Se realizó un análisis del secretoma de las DMSC´s en combinación con el secretoma del PRP por medio del programa bioinformático STRING.

Parámetros del análisis String: Se tuvo en cuenta dentro de las herramientas básicas de parametrización las siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. ***Parámetros de las herramientas base de datos String***

Tipo de red	Completa	Las aristas indican asociaciones proteicas físicas y funcionales
Significado de las aristas	Evidencia	Lineas de color indican la evidencia de la interaccion
Fuentes de interacción activa	Bases de datos, Experimentos y artículos	Tipos de fuentes de evidencia
Puntuación mínima de interacción	0.700	Alta confianza

Identificación secretoma Células troncales mesenquimales: Se identificaron 2046 proteínas en el medio condicionado de las DMSC´s de las cuales 139 tuvieron relevancia en la diferenciación osteogénica finalmente se analizaron las 40 proteínas sobre expresadas y 29 proteínas sub expresadas. De estas 40 proteínas sobre expresadas se identificaron los procesos biológicos GO involucrados en la regulación positiva de la osificación, *(Cualquier proceso que activa o aumenta la frecuencia, tasa o extensión de la osificación, formación de hueso o la conversión de tejido fibroso o cartilaginoso en hueso)* Regulación de la diferenciación osteoblástica, *(Cualquier proceso que modula la frecuencia, tasa o extensión de la diferenciación osteoblástica)*, osificación, *(La formación de hueso o sustancia ósea, o la conversión de tejido fibroso o cartilaginoso a óseo)* y regulación de la osificación, *(Cualquier proceso que modula la frecuencia, tasa o extensión de la osificación, formación de hueso o la conversión de un tejido óseo o cartilaginoso en hueso)*. En la identificación de estos procesos se detectaron 15 procesos biológicos osteogénicos en las DMSC´s y 3 en las BM MSCs. (Tabla 5). De igual manera, se identificaron 9 y 7 proteínas relacionadas con procesos de osificación del PRP Y PPP respectivamente. (Tabla 6)

Tabla 5. ***Proteínas sobreexpresados y sub expresados en las células troncales dentales teniendo en cuenta las proteínas que participan en procesos biológicos de osificación***

	SECRETOMA DMSC´s		SECRETOMAS BM MSCS	
Proteínas sobre expresadas	40	FHL1, CANT1, SMOC1, IGFBP2, C1RL, TGOLN2, CTSB, DKK3, GLRX5, CLIC1, MT2A, PTX3, TGFβ2, CDH13, CLSTN1, APOD, GIG25, PCDHGC3, IGF2R, FSTL3, STC1, CSTB, CRISPLD2, ALCAM,	27	IGFBP2, FBN2, MOXD1, MT2A, VCP, PTX3, CDH13, SORT1, IGF2R, HSP90AA1, DCD, ALCAM, DKK3, FSTL3, SMOC1, TGOLN2, CLSTN1, ADAM9, APOD, IGF2, ADH1B,

		TNFRSF1A, FBN2, PCDH18, ITGBL1, SORT1, MCM3, ADAM9, MOXD1, ADH1B, TAGLN, PLTP, IGF2, MINPP1, COL15A1, TIMP2, MASP1		CANT1, TAGLN, TIMP2, ITGBL1, CSTB, CLIC1
Proteínas sub expresadas	29	CXCL12, SEC23A, CHI3L1, MMP1, TGfβI, CPXM1, ATP5B, SFRP4, ENSG00000258947, FOXG1, ANP32B, ADIRF, VCP, MDK, CALR, KCTD12, HMCN1, POSTN, MARCKSL1, PDIA4, HIST1H2BK, DCD, VCAN, HSP90AA1, HSP90AB1, ADAM19, IGFBP3, CYTL1, THBS2	9	GLRX5, TNFRSF1A, FHL1, CTSB, PCDH18, TGFβ2, MCM3, C1RL, GIG25

Tabla 6. ***Proteínas relacionadas con procesos biológicos de osificación del secretoma del PRP y PPP.***

	SECRETOMA PRP		**SECRETOMA PPP**	
Proteínas	9	ECM1, CLEC3B, COL1A1, MMP2, IGFBP5, AHSG, SPARC, TGFβ1, GPLD1	7	IGFBP3, GPLD1, MMP2, ECM1, IGFBP5, CLEC3B, AHSG

Dentro de las proteínas sobre expresadas de las DMSC's se pueden destacar proteínas osteogénicas relevantes en la expresión post inducción de las DMSC´s como lo son la proteína modular 1 de unión a calcio relacionada con SPARC, factor de crecimiento transformante beta 2, receptor del factor de crecimiento 2 similar a la insulina, proteína 3 relacionada con la folistatina, Stanniocalcin 1, Fibrilina 2, Sortilin, Factor de crecimiento similar a insulina II, Inositol polifosfato fosfatasa 1 múltiple (Tabla 7).

Tabla 7. ***Resultados adquiridos de la base de datos STRING de las proteínas involucradas en procesos biológicos de osificación de las DMSC´s***

PROTEÍNAS	**NOMBRE**	**FUNCIÓN**
SMOC 1	Proteína modular 1 de unión a calcio relacionada con SPARC	Induce la diferenciación osteoblástica
TGFβ2	Factor de crecimiento transformante beta 2	Osificación intramembranosa
IGF2R	receptor del factor de crecimiento 2 similar a la insulina	Osteogénesis
FSTL3	proteína 3 relacionada con la folistatina	Formación ósea, inhibición osteoclástica
STC1	Stanniocalcin 1	Desarrollo osteoblástico y osteogénesis
FBN2	Fibrilina 2	Favorece Uniones de calcio

SORT1	Sortilin	Promueve la mineralización de la matriz extracelular durante la diferenciación osteogénica
IGF2	Factor de crecimiento similar a insulina II	Potencia la diferenciación osteogénica
MINPP1	Inositol polifosfato fosfatasa 1 múltiple	Osificación endocondral
CLIC 1	Proteína 1 del canal intracelular de cloruro	Mineralización

Identificación secretoma Células troncales mesenquimales y concentrados plaquetarios: Se identificaron 270 proteínas del secretoma de plasma rico en plaquetas (PRP) con 898 procesos biológicos generales. Teniendo en cuenta la relevancia en los procesos de osificación y procesos biológicos relacionados a la osteogénesis se seleccionaron 9 proteínas de las cuales 2 participaban en dos procesos en conjunto (COL1A1, MMPA2), tanto en osificación en general como en osificación intramembranosa. De igual manera, se realizó un análisis con el plasma pobre en plaquetas (PPP) con detección de 148 proteínas y 556 procesos biológicos de los cuales únicamente 7 se relacionaban con osificación (AHSG, ECM1, IGFBP3, GPDL1, CLEC3B, MMP2, IGFBP5). Se puede evidenciar la estadística de las proteínas sobre expresadas y sub expresadas del secretoma de las DMSC´s comparado con el secretoma de las BM MSC´s en un estado post diferenciación osteogénica (Kim, J. et al., 2013). De igual manera, se identificó el secretoma del plasma rico en plaquetas (journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/reth, 2020) y se evidencian los procesos biológicos relacionados con, proliferación, diferenciación y procesos de osificación relevantes en su potencial osteogénico obtenidos a partir de la totalidad de procesos biológicos generados. Se puede observar que al incluir el secretoma del PRP con el secretoma de las DMSC´s aumentan de 15 a 30 y con el PPP de 15 a 21 los procesos biológicos relacionados con procesos de osificación (Tabla 8).

Tabla 8. ***Resultados adquiridos del programa String Database de las proteínas osteogénicas sobre expresadas y sub expresadas así como proteínas detectadas en el plasma rico en plaquetas***

	PROTEÍNAS SECRETOMA DMSC´s + MEDIO DIFERENCIACIÓN		**PROTEÍNAS SECRETOMAS BM MSCS + MEDIO DIFERENCIACIÓN**		**PRP**	**PRP + DMSC´s**	**PPP**	**PPP +DMS´s**
	Sobre expresadas	**Sub expresados**	**Sobre expresadas**	**Sub expresados**	**Totales**	**Totales**	**Totales**	**Totales**
Número de nodos	40	29	27	9	270	49	148	46

Número de bordes	27	33	19	1	3053	40	2089	48
Grado promedio de nodo	1.35	2.28	1.41	0.222	22.6	1.63	28.4	2.09
Prom. Coeficiente de agrupamiento local	0.333	0.456	0.498	0.222	0.507	0.303	0.574	0.37
Número esperado de bordes	6	9	6	0	641	5	163	9
Valor de p del enriquecimiento en la red de interacciones proteína - proteína	6.56e-10	< 1.0e-16	5.92e-06	0.33	< 1.0e-16	< 1.0e-16	< 1.0e-16	< 1.0e-16
Procesos Biológicos - PB (Total)	51	69	23	3	898	289	556	174
PB - Regulación positiva de la calcificación	3	-	-	-	.	4	-	3
PB - Regulación de la diferenciación osteoblástica	3	-	3	-	.	4	-	3
PB - osificación	5	-	-	-	9	14	7	12
PB - Regulación de la osificación	4	-	-	-	..	8	-	3
Total	15	0	3	0	11	30	7	21

Se tuvieron en cuenta 4 procesos biológicos relacionados con osteogénesis para la comparación de grupos ya que estos fueron los procesos detectados en la sobre expresión proteica de las DMSC´s sometidas a diferenciación osteogénica, sin embargo, se reportaron más procesos biológicos osteogénicos al combinar proteínas de las DMSC´s con las de los concentrados plaquetarios incluyendo: formación de trabeculado óseo, osificación intramembranosa, osificación, regularización de la mineralización ósea, regulación positiva de la mineralización ósea, mineralización ósea, regulación de la osificación, diferenciación osteoblástica, morfogénesis ósea, desarrollo óseo, desarrollo del sistema esquelético, regulación de la diferenciación osteoblástica. Se puede evidenciar de igual manera, el predominio de procesos biológicos relacionados con osificación en el grupo del PRP al evaluar las interacciones resultando en 73 proteínas para este grupo y 59 en el grupo de PPP. Se destaca que el grupo del PRP presenta procesos biológicos relacionados con la regulación positiva de la mineralización, morfogénesis y desarrollo óseo a diferencia del grupo del PPP que no las presenta (Tabla 9).

Tabla 9. ***Resultados adquiridos del programa String Database de las proteínas del PRP y PPP al ser asociadas con el secretoma de las DMSC´s***

	PRP + DMSC´s	**PPP +DMS´s**
	Totales	**Totales**
Número de nodos	49	46
Número de bordes	40	48
Grado promedio de nodo	1.63	2.09
Prom. Coeficiente de agrupamiento local	0.303	0.37
Número esperado de bordes	5	9
Valor de p del enriquecimiento en la red de interacciones proteína - proteína	< 1.0e-16	< 1.0e-16
Procesos Biológicos - PB (Total)	289	174
PB - Regulación positiva de la calcificación	4	3
PB - Regulación de la diferenciación osteoblástica	4	3
PB - osificación	14	12
PB - Regulación de la osificación	8	3
Formación trabeculado óseo	3	2
Regularización de la mineralización ósea	4	3
Regulación positiva de la mineralización ósea	2	-
Mineralización ósea	2	2
Regulación de la osificación	8	7
Diferenciación osteoblástica	3	3
Morfogénesis ósea	3	-
Desarrollo óseo	4	-
Desarrollo del sistema esquelético	10	7
Regulación de la diferenciación osteoblástica	4	4
Total	73	59

Teniendo en cuenta las interacciones en las proteínas sobre expresadas y sub expresadas en los dos grupos, se observó que la mayoría de interacciones fueron reportadas a partir de extracción de minería de datos con un total de 15, a partir de experimentos 1, bases de datos 9, coexpresión 1 y no se reportaron interacciones a partir de vecindad, fusión génica o coocurrencias (Figura 13). Se puede observar que dentro de las proteínas sobreexpresadas, existen 9 proteínas con procesos biológicos relacionados a osificación a comparación de las proteínas sobreexpresadas en el grupo de las BM MSCs con solo 3.

Del grupo de las DMSC´s se expresan TGFβ2, IGF2R, FSTL3, STC1, FBN2, SORT1, MINPP1. Entre los dos grupos se relacionan las proteínas SMOC1 y FBN2 y se expresa únicamente CLIC 1 por las BM MSCs. Se puede observar en la (Figura 13A) no existe reportes de interacción de las proteínas FBN2, SMOC1, STC1 ni MINPP1. En la (Figura 13B) únicamente se reporta interacción en la proteína CLIC 1.

Teniendo en cuenta la (Figura 13C), en donde se aprecian las proteínas sub expresadas, no se evidencian proteínas con procesos biológicos de osificación relacionados. En la

(figura 13D) se observa una sub expresión de TGF B2 al ser sometidas las BM MSCs a diferenciación osteogénica.

Proteoma base bioinformática STRING

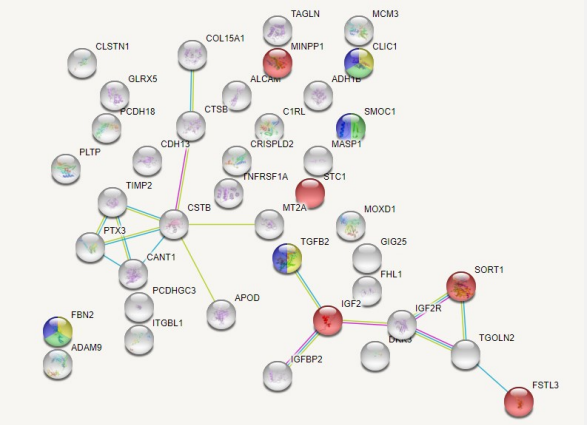
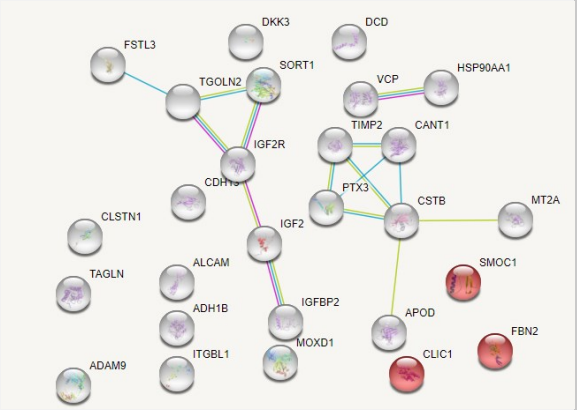
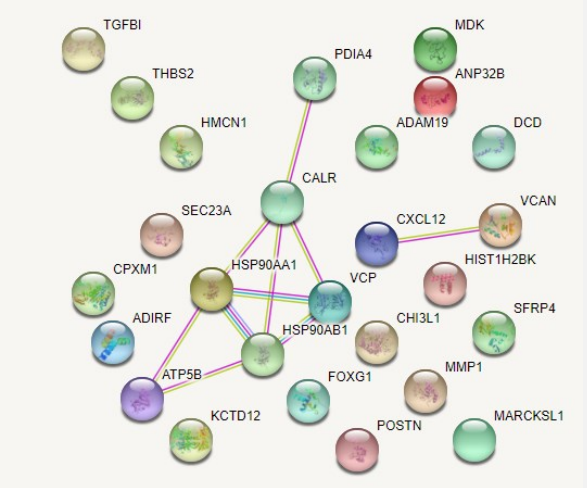
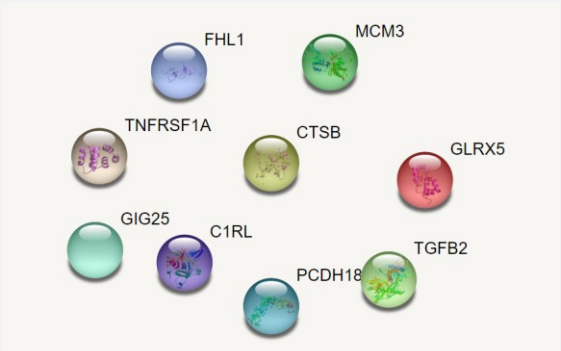
A.PROTEÍNAS SOBREEXPRESADAS GRUPO SECRETOMA DMSC´s + MEDIO DIFERENCIACIÓN	**B. PROTEÍNAS SOBREEXPRESADAS SECRETOMAS BM MSCS**
	
C. PROTEÍNAS SUBEXPRESADAS GRUPO SECRETOMA DMSC´s + MEDIO DIFERENCIACIÓN	**D. PROTEÍNAS SUB EXPRESADAS SECRETOMAS BM MSCS**
	

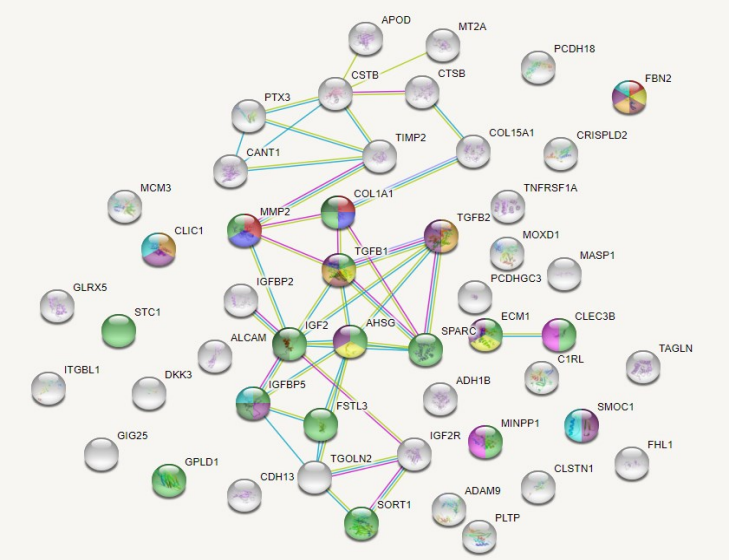
Figura 13. Red de interacciones de las proteínas sobre expresadas (A y B) y sub expresados a la baja (C y D) en las células troncales sometidas a las dos condiciones.

Con respecto a la interacciones determinadas por STRING Database, cuando se combinan las proteínas sobreexpresadas de las DMSC´s con las proteínas relacionadas con procesos biológicos de osificación del PRP: ECM1, CLEC 3B, COL1A1, MMP2, IGFBP5, AHSG, SPARC, TGFβ1, GPLD1 (Figura 14A) y del PPP: IGFBP3, GPLD1, MMP2, ECM1, IGFBP5, CLEC3B, AHSG (Figura 14B) se puede observar que existe una red enriquecida de proteínas e interacciones comparadas con las que se observan en la (Figura 13A).

En la (Figura 14A), se puede destacar el TGFβ1 siendo la proteína que más se relaciona con interacciones proteicas, así como, con procesos biológicos de osificación, y en la (figura 14B) se puede destacar

Interactoma asociaciones secretoma DMSC´s + PRP

A. INTERACTOMA PROTEÍNAS DMSC´s + SECRETOMA PRP



B. INTERACTOMA PROTEÍNAS DMSC´s + SECRETOMA PPP

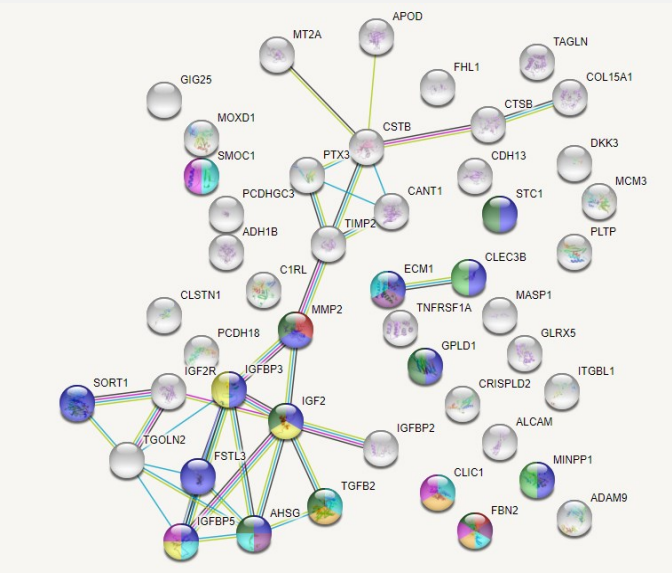


Figura 14. Red de interacciones de las proteínas del secretoma de las DMSC´s relacionado con el secretoma del PRP (A) y PPP (B)

Al evaluar las proteínas relacionadas con procesos biológicos de osificación del secretoma del PRP y PPP comparadas con niveles basales en plasma por medio de espectrometría de masas se puede observar que se destacan 3 proteínas que únicamente se detectan en el PRP, incluyendo: COL1A1, TGFβ1 y SPARC (Tabla 10)

Tabla 10. ***Cantidad de detección de una proteína en las fracciones de plasma identificadas por espectrometría de masas.***

NOMBRE	SIGLAS	PLASMA	PRP	PPP	ÚNICO PRP
72 kDa type IV collagenase	MMP2		8	4	
Tetranectin	CLEC3B	17	16	21	
Insulin-like growth factor-binding protein 3	IGFBP3			3	
Extracellular matrix protein 1	ECM1	12	18	18	
Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	GPLD1	7	10	18	
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1		20		X
Fibrinogen alpha chain	FGA	68	79	68	

Transforming growth factor beta-1	TGFβ1		3		X
Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP5	3		2	
SPARC	SPARC		2		X
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	165	187	161	
Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	IGFALS	31	28	27	

Al realizar un consolidado de las interacciones más relevantes al combinar proteínas de las DMSC´s con las proteínas del PRP se pueden observar 3 grupos importantes de proteínas (Figura 15), Grupo 1 (círculo azul) conformado por las proteínas con procesos biológico osteogénicos del secretoma de las DMSC´s incluyendo TGFβ2, IGF2, SORT1, FSTL3 las cuales presentan interacciones y STC1, MINPP1, FBN2, CLIC1, SMOC1 sin interacciones. Grupo 2, (circulo naranja) Proteínas del secretoma del PRP incluyendo AHSG, MMP2, ECM1, CLEC3B, GPLD1, IGFBP5 así como, TGFβ1, SPARC Y COL1A1. Estas tres últimas proteinas contituyen el tercer grupo (círculo negro) las cuales a comparación del PPP se expresan únicamente en el PRP. Se puede destacar que las proteínas involucradas en la mayoría de procesos biológicos osteogénicos es el TGFβ1 y la COL1A1 e interactúan en gran medida con las proteínas del secretoma de las DMSC´s

Interactoma selectivo secretina DMSC´s + PRP

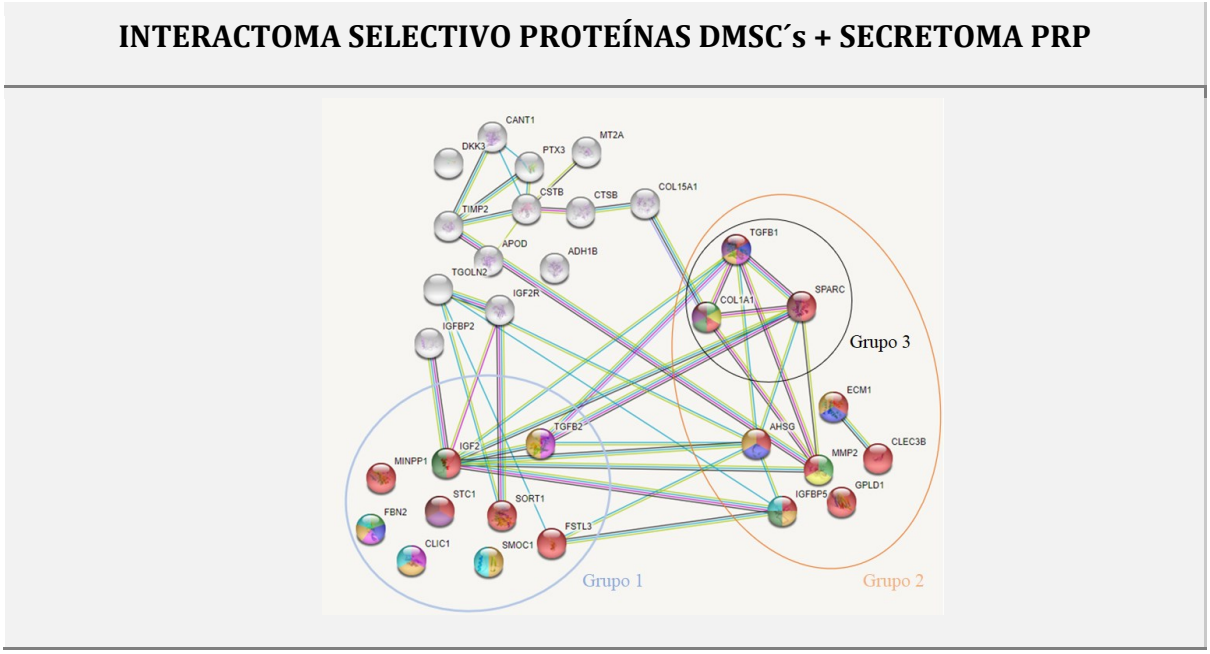


Figura 15. Red de interacciones selectiva de las proteínas del secretoma de las DMSC´s relacionado con el secretoma del PRP. Grupo 1, secretoma DMSC´s; Grupo 2, secretoma PRP; Grupo 3, Proteínas selectivas del PRP comparadas con el PPP.

Discusión

Las terapias alternativas para la reconstrucción y regeneración de defectos óseos críticos son una herramienta fundamental para el tratamiento de casos quirúrgicos complejos. Por esta razón, es relevante implementar nuevas metodologías y opciones las cuales cuenten con un adecuado fundamento científico con el fin de demostrar su potencial osteogénico. Diferentes autores han reportado las características morfológicas clásicas de las DPSC´s las cuales tienen morfología en forma de huso o similar a fibroblastos con la habilidad de formar colonias adheridas al plástico con un crecimiento en forma de remolino. Posterior a 6 días de diferenciación osteoblástica las células se tornan alargadas y tienen a alinearse en forma paralela y posterior a 15 días de diferenciación existe una disminución de genes de pluripotencia como OCT4, NANOG y aumento de genes osteogénicos ALP, BSP, OCN, RUNX2 (Okajcekova et al., 2020).

Se ha reportado la relevancia de la pre diferenciación osteogénica de las células progenitoras de manera *in vitro* para aumentar la inducción de regeneración del tejido *in vivo*. Al evaluar la pre diferenciación osteogénica por 7 días de manera *in vitro* de las DPSC´s y PDLSC´s (Periodontal ligament stem cells) se demostró que hubo significancia estadística en la formación de nuevo tejido, formación de tejido duro, así como, mayor expresión de osteocalcina, fosfatasa alcalina y fosfoproteínas dentinal comparado con trasplantes que no fueron pre diferenciados (Cha et al., 2015). Teniendo en cuenta el cultivo celular con concentrados plaquetarios, en la etapa de inducción osteogénica dia 7 – 14 se observó una relación dosis respuesta en la expresión de la ALP y la concentración del PRP 5, 10, 20 y 40% (suplementado en el medio osteogénico). En la etapa final de inducción osteogénica día 21, los grupos de PRP tuvieron una mayor expresión de ALP 2 – 7 veces más, OCN 2 – 6 veces más, OPN (2 – 7 veces más) comparado con el grupo con solo medio osteogénico (Xu et al., 2015).

Células cultivadas con medio suplementado con 40 y 50% de PRP murieron antes del 6to día indicando un posible efecto inhibitorio por altas concentraciones de PRP. Cuando se suplemento al 10% presentaron la mayor tasa de proliferación y un tiempo de doblaje poblacional disminuida, de igual manera, la suplementación de medio de cultivo con PRP 10% (Vol/Vol) teniendo una cantidad plaquetaria de $1x10^6$ x uL aumenta la proliferación

celular, (porcentajes mayores disminuyen el aporte de nutrientes dados por el medio basal) (Gentile & Garcovich, 2020). Se ha reportado que el PRP genera una sobreregulación de genes de pluripotencia en las CMM, sin embargo, genes de diferenciación como RUNX2 son sub regulados a excepción del marcador osteogénico BMP2 en donde se observó una sobreregulación (Amable & Borojevic, 2014).

La evaluación proteómica del secretoma de diferentes grupos celulares, así como, de productos sanguíneos nos ha permitido estudiar en gran detalle el comportamiento, interacciones y vías de señalización encargadas de la reparación de los tejidos teniendo en cuenta su sobre regulación y desregulación proteica. (Derrick & Lessing, 2014). Teniendo en cuenta el potencial de osificación *in vivo*, se ha reportado el papel fundamental que posee el la vía de señalización del TGFβ tanto en la osificación endocondral como en la intramembranosa. La deficiencia de TGFβ1 se relaciona con una disminución considerable en la mineralización y crecimiento óseo en estudios preclínicos (Geiser et al., 2005). En estudios en ratones se ha evidenciado la ausencia de zonas distales de las costillas cuando existe deficiencia de TGFβ2 y TGFβ3 (Dünker & Krieglstein, 2002). De igual manera, cuando se remueven los receptores TGFβR-I usando Dermo 1 - Cre y TGFβR-II en estudios preclínicos, se disminuye de manera significativa la densidad ósea y existe alteración en la migración de las células troncales de la cresta neural durante la osificación intramembranosa (Matsunobu et al., 2009).

El IGF2 (Factor de crecimiento similar a insulina tipo 2) es un factor de crecimiento esencial para el desarrollo celular. dentro de su pleiotropismo se encuentran sus efectos anti apoptóticos, neurogénesis, efectos antiinflamatorios y antialérgicos, facilita la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y esta implicado en procesos de diferenciación osteogénica (Geng et al., 2014). La bio efectividad del IGF2 esta dada por la producción local de proteínas de unión a IGF (IGFBP´s), encontrándose 6 tipos: IGFB1 - IGFB6. El IGFB4 es el predominante expresado en células óseas y es un regulador negativo de la acción del IGF; al inhibir al IGF se inhibe eficazmente el crecimiento de células óseas estimuladas por este factor. Los inhibidores del IGFB4 juegan un rol importante en el aumento de la densidad y formación ósea *in vivo* (Ortiz et al., 2003). Es importante destacar el papel de la PAPP-A (Proteína plasmática asociada al embarazo tipo A), ya que

es una proteína que cliva a IGFB4. TGFβ1 aumenta hasta 12 veces la expresión de PAPP-A en osteoblastos.

EL IGF II tiene una relación estrecha con el TGFβ1, así como, un papel importante en la formación ósea, ya que al adicionarlo al cultivo celular previamente suplementado con TGFβ1 se observó un aumento significativo hasta del 80% de la proteólisis del IGFB4 por la PAPP-A comparado con el grupo no suplementado, esto genera la disminución de la inactivación del IGF-I y por lo tanto, mayor disponibilidad del mismo y aumento en procesos biológicos de osificación dados por el IGF-I (Miyakoshi et al., 2001) .

Se ha reportado el papel fundamental que tiene el TGFβ2 y las BMPs en el desarrollo y reparación osteogénica de los tejidos. Cultivos tridimensionales de MSC´s en combinación con TGFβ2 + BMP´s histológicamente presentan mayor grado de mineralización por tinción de Saf-O, así como, mayor deposición de matriz extracelular mayor y expresión de Runx2 y COL1A1 que cuando estos se suministran de manera exógena en el medio de cultivo o cuando se suplementaron de manera separada TGFβ2 o BMP`s (Chen et al., 2012; Herberg et al., 2018). De igual manera existe un papel fundamental tanto en la vía de señalización Smad así como en la p38 MAPK en la expresión de RUNX2 seguido de su inducción por el TGFβ1 y las BMP´s favoreciendo la diferenciación osteogénica de células precursoras (Lee & Bae, 2002b).

Conclusiones

1. La técnica de síntesis utilizada es una técnica viable y sencilla para la elaboración de constructos basados en células troncales
2. Las características del constructo permiten una fácil manipulación para su transporte al sitio de interés.
3. El TGFβ1 y TGFβ2 prometen un papel fundamental en los procesos biológicos de osificación debido a su sobreexpresión demostrada de manera *in sílico.*
4. La implementación de osteoblastos con secretoma de las DMSC´S con PRP demuestra un enfoque con amplio potencial osteogénico para su aplicación en defectos críticos.
5. La interacción del TGFβ1y IGF2 demostrada de manera *in silico* fundamenta el potencial osteogénico del constructo propuesto.

Referencias bibliográficas

1. Amable, P. R., Teixeira, M. V. T., Carias, R. B. V., Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. PloS One, 2014;9(8).
2. Azangookhiavi, H., Ghodsi, S., Jalil, F., & Dadpour, Y. Comparison of the efficacy of platelet-rich fibrin and bone allograft for alveolar ridge preservation after tooth extraction: A clinical trial. Frontiers in Dentistry,2020;17(1), 1-6.
3. Cha, Y., Jeon, M., Lee, H., Kim, S., Kim, S., Lee, J., & Song, J. S. Effects of In Vitro osteogenic induction on In Vivo Tissue Regeneration by dental pulp and periodontal ligament stem cells. Journal of Endodontics, 2015;41(9), 1462-1468.
4. Chen, G., Deng, C., & Li, Y. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. International Journal of Biological Sciences, 2012;8(2), 272-288.
5. Chen, S., Ko, A., Chen, H., Roan, T., & Tang, Y. Fronto-naso-orbital reconstructions. Annals of Plastic Surgery, 2018;81(6S Suppl 1), S10-S14.
6. Chiapasco, M., Rossi, A., Motta, J. J., & Crescentini, M. Spontaneous bone regeneration after enucleation of large mandibular cysts: A radiographic computed analysis of 27 consecutive cases. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2000;58(9), 942-948.
7. Clause, K. C., Liu, L. J., & Tobita, K. Directed stem cell differentiation: The role of physical forces. Cell Communication & Adhesion, 2010;17(2), 48-54.
8. Correia, S. I., Pereira, H., Silva-Correia, J., van Dijk, C. N., Espregueira-Mendes, J., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. Current concepts: Tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. Journal of the Royal Society Interface, 2014;11(92).
9. Derrick, K. L., & Lessing, M. C. . Genomic and proteomic evaluation of tissue quality of porcine wounds treated with negative pressure wound therapy in continuous, noncontinuous, and instillation modes. Eplasty, 2014;14(43)
10. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy, 2006;8(4).

11. Dünker, N., & Krieglstein, K. Tgfß2 –/– Tgfß3 –/– double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. Anatomy and Embryology, 2002;206(1), 73-83.
12. Ferrarotti, F., Romano, F., Gamba, M. N., Quirico, A., Giraudi, M., Audagna, M., & Aimetti, M. Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. Journal of Clinical Periodontology, 2018;45(7), 841-850.
13. Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H., Lian, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. Cell Death & Disease, 2016;7(1), e2062.
14. Gasparotto, V. P. O., Landim-Alvarenga, F. C., Oliveira, A. L. R., Simões, G. F., Lima-Neto, J. F., Barraviera, B., & Ferreira, R. S. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. Stem Cell Research & Therapy, 2014;5(3), 78.
15. Gassling, V., Douglas, T., Warnke, P. H., Açil, Y., Wiltfang, J., & Becker, S. T. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. Clinical Oral Implants Research, 2010;21(5), 543-549.
16. Geiser, A. G., Hummel, C. W., Draper, M. W., Henck, J. W., Cohen, I. R., Rudmann, D. G., Dodge, J. A. . A new selective estrogen receptor modulator with potent uterine antagonist activity, agonist activity in bone, and minimal ovarian stimulation. Endocrinology (Philadelphia), 2005;146(10), 4524-4535.
17. Geng, X., Yang, G., Li, M., Song, J., Liu, Z., Qiu, S., Yang, P. . Insulin-like growth factor-2 enhances functions of antigen (ag)-specific regulatory B cells. The Journal of Biological Chemistry, 2014;289(25), 17941-17950.
18. Gentile, P., & Garcovich, S. Systematic review-the potential implications of different platelet-rich plasma (PRP) concentrations in regenerative medicine for tissue repair. International Journal of Molecular Sciences, 2020;21(16), 5702.
19. Herberg, S., Varghai, D., Cheng, Y., Dikina, A. D., Dang, P. N., Rolle, M. W., & Alsberg, E. High-density human mesenchymal stem cell rings with spatiotemporally-controlled morphogen presentation as building blocks for engineering bone diaphyseal tissue. Nanotheranostics (Sydney, NSW), 2018;2(2), 128-143.
20. Hsu, C., Yuan, K., & Tseng, C. The negative effect of platelet-rich plasma on the growth of human cells is associated with secreted thrombospondin-1. Oral

Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics, 2009;107(2), 185-192.

21. Ito, K., Yamada, Y., Nakamura, S., & Ueda, M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 2011;26(5), 947-954.
22. Kim, J., Kim, J., Kim, Y., Kim, K., Ryu, S. H., Lee, T. G., & Suh, P. . Comparative secretome analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenesis. Journal of Cellular Physiology, 2012;228(1), 216-224.
23. Kim, Y., Kim, M., & Kim, S. Iatrogenic pneumomediastinum with extensive subcutaneous emphysema after endodontic treatment: Report of 2 cases. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics, 2010;109(2), 114.
24. Kishimoto, N., Honda, Y., Momota, Y., & Tran, S. D. . Dedifferentiated fat (DFAT) cells: A cell source for oral and maxillofacial tissue engineering. Oral Diseases, 2018;24(7), 1161-1167.
25. Kleinhans, C., Mohan, R. R., Vacun, G., Schwarz, T., Haller, B., Sun, Y., Hansmann, J. A perfusion bioreactor system efficiently generates cell-loaded bone substitute materials for addressing critical size bone defects. Biotechnology Journal, 2015;10(11), 1727-1738.
26. Kobayashi, E., Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B., & Miron, R. J. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. Clinical Oral Investigations, 2016;20(9), 2353-2360.
27. Kurobe, H., Maxfield, M. W., Naito, Y., Breuer, C., & Shinoka, T. 15 - stem cells in tissue-engineered blood vessels for cardiac repair. In R. Li, & R. D. Weisel (Eds.), Cardiac regeneration and repair 2018;12(2), 389-409
28. Langenbach, F., & Handschel, J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. Stem Cell Research & Therapy, 2013;4(5), 117.
29. Lee, K., Hong, S., & Bae, S. Both the smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. Oncogene, 2002;21(47), 7156-7163.
30. Maraldi, T., Riccio, M., Pisciotta, A., Zavatti, M., Carnevale, G., Beretti, F., De Pol, A.

Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. Stem Cell Research & Therapy, 2013;4(3), 53.

31. Mario Gimona, Karin Pachler, Sandra Laner-Plamberger, Katharina Schallmoser, & Eva Rohde. Manufacturing of human extracellular vesicle-based therapeutics for clinical use. International Journal of Molecular Sciences, 2017;18(6), 1190.
32. Matsunobu, T., Torigoe, K., Ishikawa, M., de Vega, S., Kulkarni, A. B., Iwamoto, Y., & Yamada, Y. Critical roles of the TGF-β type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. Developmental Biology, 2009;332(2), 325-338.
33. Miyakoshi, N., Qin, X., Kasukawa, Y., Richman, C., Srivastava, A. K., Baylink, D. J., & Mohan, S. Systemic administration of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) increases bone formation parameters in mice by increasing IGF bioavailability via an IGFBP-4 protease-dependent mechanism. Endocrinology, 2001;142(6), 2641-2648.
34. Morrison, D. K. MAP kinase pathways. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012;4(11), a011254.
35. Mortada, I., & Mortada, R. Dental pulp stem cells and osteogenesis: An update. Cytotechnology (Dordrecht), 2018;70(5), 1479-1486.
36. Nancarrow-Lei, R., Mafi, P., Mafi, R., & Khan, W. A systemic review of the sources of adult mesenchymal stem cells and their suitability in musculoskeletal applications. Current Stem Cell Research & Therapy, 2017 12(8):601-610.
37. Okajcekova, T., Strnadel, J., Pokusa, M., Zahumenska, R., Janickova, M., Halasova, E., & Skovierova, H. . A comparative in vitro analysis of the osteogenic potential of human dental pulp stem cells using various differentiation conditions. International Journal of Molecular Sciences, 2020;26;21(7):2280
38. Ortiz, C. O., Chen, B., Bale, L. K., Overgaard, M. T., Oxvig, C., & Conover, C. A. Transforming growth factor-β regulation of the insulin-like growth factor binding protein-4 protease system in cultured human osteoblasts. Journal of Bone and Mineral Research, 2003;18(6), 1066-1072.
39. Persson, M., Lehenkari, P. P., Berglin, L., Turunen, S., Finnilä, M. A. J., Risteli, J., Tuukkanen, J. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a 3D woven scaffold. Scientific Reports, 2018;8(1), 1-12.

40. Potdar, P. D., & Jethmalani, Y. D. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. World Journal of Stem Cells, 2015;7(5), 839.
41. Simon, C. G., Yaszemski, M. J., Ratcliffe, A., Tomlins, P., Luginbuehl, R., & Tesk, J. A. ASTM international workshop on standards and measurements for tissue engineering scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2015;103(5), 949-959.
42. Sokolsky-Papkov, M., Agashi, K., Olaye, A., Shakesheff, K., & Domb, A. J. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007;59(4-5), 187-206.
43. Sybil, D., Sawai, M., Faisal, M., Singh, S., & Jain, V. Platelet-rich fibrin for hard- and soft-tissue healing in mandibular third molar extraction socket. Annals of Maxillofacial Surgery, 2020;10(1), 102-107.
44. Szpalski, C., Barr, J., Wetterau, M., Saadeh, P. B., & Warren, S. M. Cranial bone defects: Current and future strategies. Neurosurgical Focus, 2010;29(6):E8
45. Uğur Gulşen, & Mehmet Fatih Şenturk. Effect of platelet rich fibrin on edema and pain following third molar surgery: A split mouth control study. BMC Oral Health, 2017 24;17(1):79
46. Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., & Hitzler, W. E. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. Bone, 2004;34(4), 665-671.
47. Xu, F., Li, H., Yin, Q., Liang, Z., Huang, M., Chi, G., Nan, H. Effect of activated autologous platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro. American Journal of Translational Research, 2015;7(2), 257-270.
48. Yan, Z., Zhuansun, Y., Chen, R., Li, J., & Ran, P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. Experimental Cell Research, 2014;324(1), 65-74.
49. Yasui, T., Mabuchi, Y., Morikawa, S., Onizawa, K., Akazawa, C., Nakagawa, T., Matsuzaki, Y. Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. Inflammation and Regeneration, 2017;37(1), 8.
50. Zhang, H., Shi, X., Wang, L., Li, X., Zheng, C., Gao, B., Yang, L. Intramembranous ossification and endochondral ossification are impaired differently between glucocorticoid-induced osteoporosis and estrogen deficiency-induced

osteoporosis. Scientific Reports, 2018;8(1), 3867-13.

51. Zhang, W. B., Peng, X., Yu, Y., Wang, Y., Liu, X. J., Liu, Y. P., Chinese Stomatological Association, n. Expert consensus for the treatment algorithm for navigationassisted reconstruction of maxillofacial deformities. The Chinese Journal of Dental Research: The Official Journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA), 2020;23(1), 33-42.