

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

In vitro Evaluation of the Mesenchymal Stem Cell Adhesion to 3D-Printed Dental Matrices

Álvaro Andrés Rodríguez Sáenz
Universidad El Bosque, Colombia
alvaro.rodriiguez@outlook.com

DOI: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo36-77.eact>
Redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231254499004>

María Alejandra Lozano Macías
Universidad El Bosque, Colombia
malejaka_19@hotmail.com

Fecha de recepción: 25 Octubre 2016
Fecha de publicación: 30 Noviembre 2017

Astrid Eugenia Benedetti Canabal
Universidad El Bosque, Colombia
chachy_benedetti12@hotmail.com

Juan Carlos Munévar Niño
Universidad El Bosque, Colombia
munevarjuan@gmail.com

Jorge Alberto Sarmiento O'Meara
Universidad El Bosque, Colombia
sarmientojorge@unbosque.edu.co

Roberto Alfonso Gómez Bahamón
Universidad El Bosque, Colombia
gomezroberto@unbosque.edu.co

Resumen:

Antecedentes: En ingeniería de tejidos es fundamental estudiar el sinergismo entre las células troncales mesenquimales y el biomaterial para tener un mayor control sobre los biomiméticos. De esto depende el éxito de tratamientos de lesiones de tamaño crítico. **Objetivo:** Evaluar la adhesión celular in vitro de células troncales de la pulpa dental humana (CTPD) en matrices impresas con ácido poliláctico (APL). **Métodos:** Se utilizaron muestras de CTPD criopreservadas y expandidas, cultivadas sobre 24 matrices dentales impresas en 3D con APL, y que se analizaron los días 1, 7 y 15. Se evaluó la fenotipificación de la CTPD por citometría de flujo y la adhesión celular a la matriz por medio de microscopio electrónico de barrido (SEM). Los datos se agruparon en porcentajes, tanto para el marcador analizado como para la cantidad de células adheridas. **Resultados:** Las CTPD expresaron positivamente anticuerpos CD73 y CD90 en casi un 100 % y CD105 en un 56,7 %. Asimismo, expresaron negativamente anticuerpos CD34 y CD45 en más del 98 %. Se observó en SEM que a los 15 días el 99,88 % de las CTPD presentó forma fusiforme o estrellada, lo que significa que estas células se adhirieron a la matriz de APL. **Conclusión:** El APL no es citotóxico para las CTPD por su composición y características biocompatibles, lo que hizo posible que las células se adhirieran y proliferaran sobre la matriz dental impresa en 3D. Este fue un método in vitro efectivo para emplear en futuros estudios de regeneración de tejidos en odontología.

Palabras clave: ácido poliláctico, biomateriales, células madre, impresión 3D, pulpa dental, regeneración tisular.

Áreas temáticas: diseño industrial; ingeniería tisular; odontología

Abstract:

Background: In tissue engineering it is quite important to study the synergy between mesenchymal stem cells and biomaterials to better control the biomimetic elements. Success in the treatment of critical-size lesions depends strongly on this fact. **Objective:** To evaluate the in vitro human Dental Pulpal Stem Cell (DPSC) adhesion in printed matrices developed with polylactic acid (PLA). **Methods:** Cryopreserved and enlarged DPSC samples were used in the culture of 24 dental 3D-printed matrices developed with PLA that were analyzed on days 1, 7 and 15. The DPSC typification was analyzed with flow cytometry and the cell adhesion to the matrix was analyzed under the scanning electron microscope (SEM). Data were gathered as

percentages for both the analyzed marker and the amounts of adhered cells. Results: DPSCs expressed positively the CD73 and CD90 antibodies in almost 100% and the CD105 in 56.7%. Likewise, DPSCs expressed negatively the CD34 and CD45 in more than 98%. After 15 days it was observed in the SEM that 99.88% of the DPSCs had either a star-like or fusiform shape, which means that they adhered successfully to the PLA matrix. **Conclusion:** The PLA is not cytotoxic on the DPSCs thanks to its composition and biocompatible features, which allowed the cell adhesion and proliferation in the 3D-printed dental matrix. This *in vitro* method was effective and should be used in future studies on tissue regeneration in dentistry.

Keywords: polylactic acid, biomaterials, stem cell, 3D printing, dental pulp, tissue regeneration.

Thematic fields: dentistry; industrial design; tissue engineering

INTRODUCCIÓN

Las células troncales humanas tienen propiedades pluripotenciales, multipotenciales, progenitoras y precursoras. Estas células tienen un potencial proliferativo elevado con capacidad de generar tejidos en el proceso embrionario o regenerarlos después de traumatismos (1,2). Los estudios de las células troncales iniciaron entre los años sesenta y setenta con estudios en ratones, hámsteres y cobayos por Friedenstein y colaboradores (3). Estos investigadores describieron células de la médula ósea que hacían parte de un estroma medular y que originaba un microambiente hematopoyético. Las llamaron *unidades formadoras de colonias de fibroblastos* (UFC-F).

Luego, en 1983, Owen y colaboradores (4) describieron la capacidad de estas células de generar hueso, cartílago y tejido conjuntivo con una poca cantidad de células de la médula ósea inoculadas en una cámara de difusión en modelos *in vivo*. En 1974, Friedenstein y su equipo (3) comprobaron que estas células tienen propiedades de autorrenovación y elevado potencial de proliferación. Teniendo estos conceptos más claros, a finales de la década de los ochenta, los grupos de investigación de estos dos autores concluyeron que había una célula troncal presente en la médula ósea con capacidad de originar distintos tipos celulares, entre los que se incluía hueso. A esta célula la denominaron *célula troncal estromal*. Años más tarde, en 1992, Caplan y colaboradores, citados en Nakata y colaboradores (5) y D'Aquino y colaboradores (6) propusieron realizar un estudio en humanos en el que cultivaron y trasplantaron células mesenquimales de humanos adultos para observar la formación de hueso.

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

Las células madre de pulpa dental humana (CTPD) tienen el potencial de diferenciarse en varios tipos de células, incluyendo odontoblastos, osteoblastos, condrocitos y adipocitos. En particular, la pulpa dental obtenida de dientes con extracción indicada, previo consentimiento informado, es sin duda la fuente más accesible de CTPD posnatales. Diferentes biomateriales de origen natural, como las esferas de celulosa, o cerámicos sintéticos, como la hidroxiapatita, se han usado como matrices en la clínica para reconstruir la función y la forma en defectos de tamaño crítico, especialmente en las condiciones biológicas y mecánicas de la mandíbula en la cavidad oral (9).

Se han descubierto distintos tejidos donde se pueden encontrar fuentes de células troncales, gracias a diversos marcadores moleculares que han facilitado su detección. Estos marcadores son específicos para cada célula y codifican *in vivo* proteínas especializadas que funcionan como receptores, a la vez que cumplen funciones de señalización, adhesión y respuesta a señales extrínsecas. Cada célula tiene en su superficie celular una expresión específica de receptores que la hace diferente de las células de otros linajes. Los tres

linajes de células con mejor caracterización son las células troncales embrionarias, las neurales y las hematopoyéticas. Para identificar los marcadores de las células troncales, se utilizan nombres basados en moléculas que están unidas a su superficie. Para esto se han desarrollado técnicas para detectar los marcadores específicos con un componente fluorescente (6).

Las distintas estrategias en ingeniería tisular que utilizan como base células troncales y biomateriales podrían aplicarse para reconstruir estructuras maxilofaciales complejas. Los biomateriales servirían de moldes y, a la vez, como medios de apoyo de matrices extracelulares sintéticas para promover los procesos de regeneración (10,11,12). Los biomateriales impresos representan una herramienta prometedora que puede personalizarse al tamaño, configuración, morfología y arquitectura del defecto que se va a regenerar. Teniendo en cuenta que Rasperini y colaboradores (13), en 2015, reportaron el empleo de una matriz impresa en 3D en policaprolactona biorreabsorbible para promover la reparación en un defecto periodontal con resultados sin éxito a largo plazo, se considera necesario continuar con estudios para lograr aplicaciones clínicas personalizadas en odontología regenerativa. Se planteó como hipótesis de este estudio la posibilidad de que las matrices impresas en 3D en biomateriales convencionales promuevan la adhesión de las CTPD. Por esta razón, el objetivo del estudio fue evaluar la adhesión celular *in vitro* de CTPD en matrices impresas con ácido poliláctico (APL).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio piloto se clasificó como experimental *in vitro*. Se consideró como la población de estudio 250.000 CTPD expandidas en cuarto pase después de criopreservación. Estas CTPD se depositaron en 24 matrices dentales impresas en 3D de APL. Se realizó un muestreo probabilístico de tipo aleatorio simple, previa enumeración de cada una de las 24 matrices en 3D de APL en las que se sembraron 250.000 células CTPD por matriz. Los datos obtenidos de adhesión celular se consignaron en un instrumento de recolección de datos para ejecutar el análisis estadístico de los datos.

Los criterios de inclusión fueron: pulpa de dientes permanentes humanos, CTPD criopreservadas y expandidas hasta cuarto pase y APL como material de impresión. Se excluyeron dientes temporales humanos, cultivos celulares contaminados, crioviales con baja densidad celular (< 200.000 CTPD/ml) o en quinto pase. Este estudio recibió aprobación del Comité de ética de Investigación de la Universidad El Bosque de Bogotá con el código PCI 2014-55. A continuación se describe cómo se construyó la matriz y cómo se prepararon las células que se cultivaron en las matrices impresas en 3D.

Escaneado y digitalización de los dientes humanos

A partir de los modelos físicos del diente se utilizó tecnología de fabricación de digital para obtener modelos virtuales por medio de ingeniería inversa. Se empleó el programa para captura de imágenes Scan Studio 3D (Nextengine®), versión 1.3.2. Los modelos se modificaron de acuerdo con las características morfológicas. Posteriormente, se realizó la retopología de la imagen para obtener modelos digitales con menor número de mallas. Previa ubicación vertical y fijación del modelo físico del diente en el soporte del escáner o *autodrive*, se inició la calibración y la alineación del sistema. Se determinó el número de familias o grupos de imágenes que se debían obtener, para capturar la mayor información posible del diente, y se ubicaron puntos de referencia en el modelo. De este modo, se eliminaba el ruido en la imagen del modelo. Se seleccionaron parámetros de escáner como calidad, número de imágenes, tiempo y ángulo de escaneo. En el caso del diente, se obtuvo una familia de 16 imágenes de alta definición. Con esta información, se realizó la alineación, el corte unión y el pulido de la imagen que luego se exportó en formatos .stl y .obj, para corregir la malla poligonal desde el programa Meshmixer®, y se realizó la retopología digital. El archivo digital obtenido para la impresión en

3D presentaba de esta manera imágenes de menor peso digital, lo que facilitaba la exportación, la edición, la topología y la preparación superficial del modelo digital en los programas Rhinoceros® y Solidworks® para diseñar la estructura y textura superficial.

Definido el protocolo de impresión en 3D de las matrices dentales, los modelos digitales de los diferentes dientes se enviaron a impresión en 3D, para lo cual se utilizó un material biodegradable como el APL. En el control y preparación del archivo de la impresión en 3D se utilizó el programa CURA® y una impresora en 3D WASP®, modelo Delta 2040, con una resolución de 0,05 mm (50 micrones). Se contemplaron parámetros como formato del archivo digital, cortes, altura de la capa, apoyos, orientación de la pieza, velocidad de impresión, contracción del material, temperatura del material y de la plataforma, espesor de pared, densidad de relleno y flujo para obtener una impresión de alta resolución. Esto es posible, porque esta impresora cuenta con una boquilla de extrusión de 0,3 mm. El archivo final se exportó a formato GCODE y se envió a impresión con tecnología FDM en un material termoplástico.

Obtención de las CTPD por descongelación

Las CTPD criopreservadas en tercer pase se sometieron a descongelación lenta, $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto mediante Mr. Frosty, y se cultivaron en cajas T25 de poliestireno en 3 ml de medio de cultivo DMEM® alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino y antibióticos. Luego de 1 h de adhesión de 2 ml de suspensión celular en la incubadora, se agregaron 2000 μl de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de GIBCO® bajo en glucosa suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y anfotericina 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hyclone® y se dejó en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en atmósfera húmeda y 5 % de CO_2 , hasta obtener un 70 % de confluencia celular. Se revisó y cambió el medio de cultivo cada 2 días para observar proliferación y confluencia celular y descartar contaminación. Las observaciones al microscopio de contraste de fase se realizaron en aumentos de 20X y 40X. Cuando las células alcanzaron confluencia ($> 70\%$), se disociaban enzimáticamente para después ser inmunofenotipificadas y sembradas en las matrices impresas en 3D de APL.

Evaluación del fenotipo troncal mesenquimal después de criopreservación por citometría de flujo

Simultáneamente al inicio de la expansión de las CTPD, se confirmaron su fenotipo y viabilidad por citometría de flujo (citómetro BD Accuri C6®). Cuando el cultivo alcanzó el 90 % de confluencia en el tercer pase, las CTPD se lavaron con solución salina de fosfato amortiguada (PBS), se agregó tripsina al 0,25 %, se centrifugó a 1500 g por 4 min y se contaron las células en microscopio de luz invertida con azul tripán 1/1. Para el experimento se tomaron 4 tubos de microcentrífuga. El primero contenía $2,5 \times 10^5$ células sin marcar. El segundo correspondió al control de isotipos que contenía CD105 marcado con ficoeritrina conjugado con IgG1 y CD45 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con IgG2. El tercero contenía $2,5 \times 10^5$ células con los anticuerpos CD105 marcado con ficoeritrina conjugado con IgG1; CD34 marcado con FITC conjugado con IgG2a, CD45 marcado con proteína clorofila peridina conjugado con IgG2a y CD90 marcado con alofocianina conjugado con IgG1. El cuarto contenía $2,5 \times 10^5$ células con anticuerpos CD73 marcado con ficoeritrina conjugado con IgG1. Todos se incubaron por 2 h antes de ser leídos en el citómetro de flujo Becton & Dickinson®.

Estandarización del protocolo de cultivo de las CTPD en matrices impresas en 3D sintetizadas con APL

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

Análisis de la morfología de las CTPD cultivadas en matrices impresas en 3D sintetizadas con APL

La evaluación morfológica y de adhesión de las células se realizó mediante SEM. Para esto, la matriz se fijó con glutaraldehído al 2,5 %, PBS 0,1 M y pH = 7,4 y se dejó por 1 h a temperatura ambiente. Acto seguido, se lavó 3 veces con PBS por 10 min y se deshidrató en series crecientes de etanol (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 % y 100 %) durante 10 min en cada concentración. Después del último cambio de etanol, se llevó a secado a punto crítico que se realizó por 1 h. Luego se recubrió con oro y se observó al SEM para corroborar la adhesión de las células en el constructo dental impreso en 3D.

Evaluación de la adhesión de las CTPD a las matrices impresas en 3D

Para el análisis de la adhesión celular se empleó el protocolo modificado de Vohra y colaboradores del 2008 (14), según el cual se siembran las CTPD en los tipos de matrices en concentraciones de $2,5 \times 10^5$, en una placa de 24 pozos, y se someten a adhesión en los diferentes tiempos establecidos en el protocolo mediante lavado PBS. Las células que permanecieron adheridas a la matriz, se microfotografiaron con el SEM. Para efectuar el recuento del número de células viables sembradas sobre los sustratos, se lavaron los andamios con PBS 1X estéril para eliminar las células no adherentes y las células muertas. Después, se incubaron en solución enzimática 0,5 ml de tripsina al 2 % a 37 °C durante 5 min. El proceso de tratamiento con tripsina se detuvo mediante la adición de 0,5 ml de DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 %. Posterior a la tinción con azul tripán, se contaron las células en cámara de Neubauer bajo microscopio de luz invertida (Nikon Eclipse, TS100, Japón).

Las matrices impresas en 3D que se recubrieron con suero fetal bovino durante toda la noche a 4 °C en una placa de 24 pozos sin CTPD se consideraron controles negativos. Después de la tripsinización, las CTPD se resuspendieron en DMEM libre de suero para depositarlas en las matrices impresas en 3D de APL y dejarlas en adhesión durante 1 h a 37 °C en los pozos de la caja de poliestireno. Pasado el intervalo de adhesión celular, las matrices dentales en 3D se lavaron una vez con PBS para eliminar las células no adheridas. El grado de adhesión celular se evaluó mediante SEM.

Las matrices tridimensionales de APL analizadas mediante SEM muestran que la morfología externa de la matriz obtenida era altamente porosa con un tamaño de 400 µm. Esto sugiere que la matriz tridimensional (o *scaffold*) contiene poros de submicroescala, microescala y macroescala. La morfología celular que adoptan las células depende de las características topográficas de la superficie del sustrato. En este sentido, la adhesión, la proliferación y los procesos de diferenciación celular están influenciados por la forma, rugosidad y porosidad

del sustrato. A este respecto, se observó que las matrices de APL y las CTPD cultivadas durante 7 días, se adhieren a la superficie a través de proyecciones citoplasmáticas delgadas locales correspondientes a filopodios, lo que comprueba la interconectividad celular y con la matriz.

RESULTADOS

Evaluación morfológica in vitro después de criopreservación de las CTPD

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

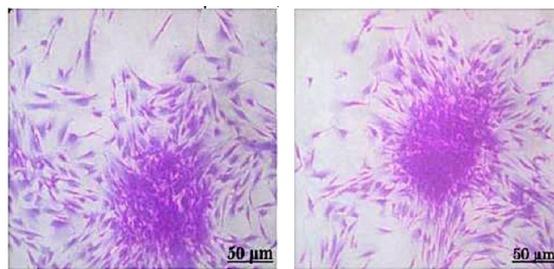


FIGURA 1

Microfotografías de las UFC-F a la semana de expansión celular después de criopreservación

Análisis del fenotipo de las CTPD expandidas después de criopreservación

El análisis de citometría de flujo se realizó con el programa del citómetro BD Accuri C6® después de adquirirse 5000 eventos del tipo celular evaluado (CTPD). El porcentaje de células positivas se calculó restando el porcentaje de células sin marcar del de células fluorescentes. Se encontró que los 3 tipos celulares expresan los antígenos CD105+, CD73+ y CD90+, los cuales deben expresar una célula troncal mesenquimal según lo estipulado por la Sociedad Internacional de Terapia Celular en el 2006.

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

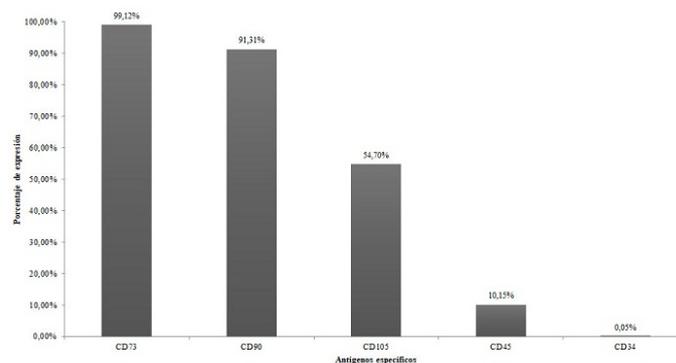


FIGURA 2

Porcentaje de expresión in vitro de los marcadores de CTPD en el estudio

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

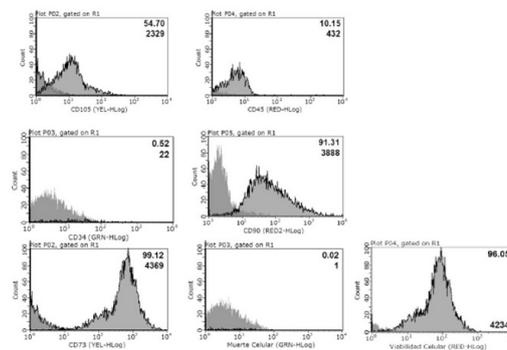


FIGURA 3

Verificación del fenotipo troncal mesenquimal de las CTPD por citometría de flujo

Evaluación in vitro de la adhesión de las CTPD en matrices dentales en 3D de APL

Se realizaron pruebas preliminares para implementar el protocolo de cultivo de CTPD en matrices dentales en 3D de APL. En efecto, en primer lugar, se imprimieron unas matrices en APL cuadrículadas con poros interconectados (figura 4). Esto mostró que el APL no solo es no citotóxico, sino que su superficie es lisa y homogénea y su matriz presenta poros interconectados de 400 μm de diámetro que permite el depósito de factores solubles, la colonización de células y posiblemente de vasos sanguíneos. Las CTPD no solo se adherieron a las matrices en 3D de APL durante 24 y 48 h; también penetraron los poros interconectados de estas. Ello permitió al equipo de investigación continuar con la impresión de matrices dentales en 3D en APL.

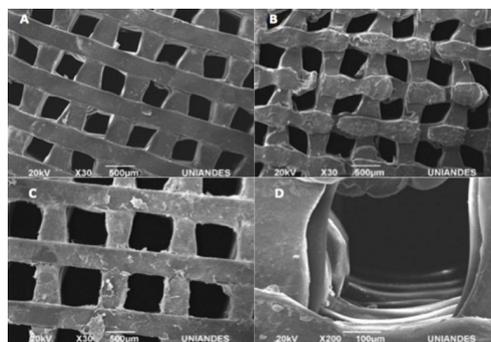


FIGURA 4

Cultivos preliminares de CTPD en matrices 3D cuadrículadas impresas en APL con poros interconectados

Una vez se evidenció adhesión de las CTPD a los prototipos de APL y establecido el protocolo de cultivo sobre las matrices tridimensionales impresas en APL, se procedió a determinar el número de CTPD que se iban a depositar sobre las matrices dentales impresas en 3D en APL. De este modo, se depositaron en una caja multipozos de poliestireno 50.000, 75.000, 100.000 y 150.000 CTPD por pozo, y por triplicado, dejándolas en adhesión durante 1 h en 500 μl de DMEM bajo en glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10 % y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bajo agitación constante en incubadora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y en atmósfera húmeda.

Durante estos experimentos, al realizar la observación de la caja de 24 pozos en los distintos tiempos, no se evidenció contaminación bacteriana de los cultivos sobre las matrices dentales impresas en 3D en APL. Se observaron al microscopio de luz invertida algunas células adheridas al fondo del cada pozo; sin embargo, con esta técnica solo fue posible observar algunas células adheridas a las distintas superficies de las matrices

tridimensionales impresas en APL. Por esta razón, se procedió a analizar la adhesión y morfología de las células al microscopio electrónico en la Unidad de Microscopía de la Universidad de los Andes de Bogotá.

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

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

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

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

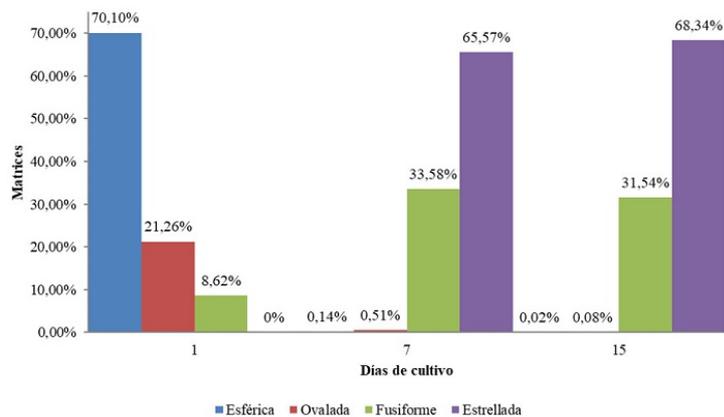


FIGURA 5
Morfología celular *in vitro* sobre las matrices dentales tridimensionales impresas en diferentes tiempos (1, 7 y 15 días)

Las CTPD tienen un diámetro aproximado de 50 μm , poseen largas prolongaciones citoplasmáticas interconectadas entre sí, ampliamente adheridas y distribuidas en la superficie del sustrato. Adicionalmente, se evidenciaron depósitos de matriz extracelular sobre la superficie del APL (figura 6).

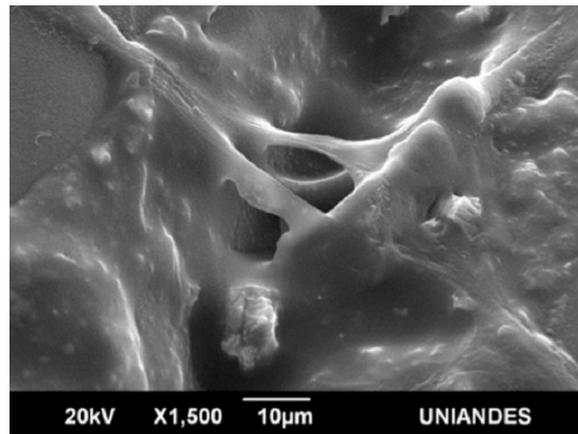


FIGURA 6

Síntesis de matriz extracelular orgánica depositada sobre el sustrato de APL por las CTPD expandidas a cuarto pase después de criopreservación (1500X)

La evaluación con SEM reveló la continuidad de la interconectividad entre las superficies profundas y superficiales de las matrices del 80-90 % y la penetración de las prolongaciones celulares de las CTPD. A partir de la segunda y tercera semanas, se observó un gran número de células que formaban un monocapa celular confluyente, que cubría la superficie de la caja de cultivo T-25.

Análisis de la adhesión de las CTPD a las matrices impresas en 3D

Las 24 matrices de APL que se sintetizaron en el laboratorio se cargaron con CTPD y exhibieron adhesión a la superficie del APL, así como morfologías variadas. Además, se observó que la presencia de estas células en las capas profundas de la matriz confirmó su penetración en el interior de las matrices. El análisis por SEM reveló la continuidad de la interconectividad entre las superficies profundas y superficiales de las matrices entre 80 % y 90 % y facilitó la penetración de las prolongaciones celulares de las CTPD (figura 7).

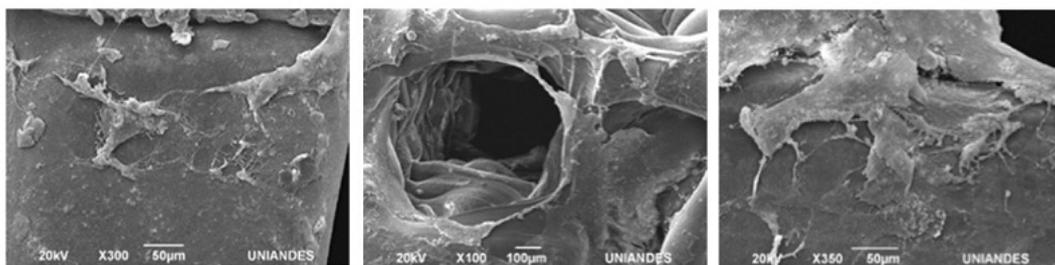


FIGURA 7

Evaluación de la adhesión de las CTPD al sustrato de APL por SEM a 300X, 100X y 350X

La observación con SEM reveló buena adhesión y distribución de las CTPD en la matriz de APL. Además, se observó depósito de matriz extracelular en la matriz de APL. Incluso, se presentó proliferación y estiramiento celular bajo el microscopio, lo que indica que las CTPD tienen buena adhesión al material sintético de impresión. Se observó un incremento con el transcurso de los días de la presencia de células fusiformes y estrelladas, así como un aumento en el porcentaje de células adheridas a las matrices dentales impresas en 3D (tabla 1).

TABLA 1
 Porcentaje de adhesión *in vitro* de las CTPD sobre las matrices dentales impresas en 3D a diferentes tiempos

Día	Núm. de CTPD cultivadas por matriz en 3D	Porcentaje de adhesión de CTPD	Promedio de CTPD adheridas
1	50.000	65,50	0,087
	75.000	69,25	0,048
	100.000	76,50	0,050
	150.000	84,25	0,036
7	50.000	72,25	0,714
	75.000	75,50	0,464
	100.000	82,25	0,341
	150.000	89,90	1,200
15	50.000	79,70	2,536
	75.000	82,30	0,001
	100.000	92,60	1,276
	150.000	96,70	0,832

DISCUSIÓN

Los defectos óseos provocados por trauma, anomalías congénitas, infecciones o resecciones de tumores no se reparan espontáneamente, lo que representa un importante desafío para la ingeniería tisular. La regeneración de tejidos a través del uso de biomateriales y mediadores biológicos provee nuevas herramientas para la medicina regenerativa con la implementación de lo que se conoce como la tríada de la ingeniería tisular: biomateriales, células y factores de crecimiento. El deseo de crear alternativas biológicas para la implantación permanente de materiales sintéticos ha inspirado el campo de la ingeniería de tejidos, la cual involucra diseño, construcción, modificación, reparación y regeneración de los tejidos vivos (12).

Los constructos sintetizados en ingeniería tisular promueven la regeneración de tejidos y órganos irreversiblemente afectados como consecuencia de enfermedades congénitas, cáncer o trauma. Para implantar estos constructos o matrices tridimensionales es fundamental emplear células troncales o diferenciadas, así como factores solubles de acuerdo con el tipo de defecto y su ubicación en el cuerpo del paciente (13). Uno de los desafíos más importantes en terapia celular con matrices en 3D es analizar el comportamiento *in vitro*, específicamente la adhesión a los biomateriales. De hecho, la adhesión celular es un proceso mediado por interacciones entre las moléculas de la superficie celular mediante el cual las células interactúan entre sí y se adhieren a una superficie o sustrato natural (colágeno, fibronectina, hidroxiapatita, etc.) o sintético (APL, copolímero ácido poliláctico-glicólico [APLG], acrilonitrilo butadieno estireno [ABE], etc.). La adhesión celular es esencial para mantener la estructura multicelular en los tejidos naturales o en sustitutos tisulares, así como para regular los mecanismos de transducción de señales durante la integración del biomimético. Por lo tanto, es prioritario garantizar que las células troncales mesenquimales se están cargando en el sitio del daño en el paciente que así lo requiera (14,15).

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

En los últimos años, injertos autógenos y alogénicos se han utilizado como sustitutos en el tratamiento de tejidos dañados. La ingeniería de tejidos es un enfoque prometedor para modular *in vivo* la regeneración de tejidos dañados. Debido al gran impacto que tienen en la calidad de vida de los pacientes, surge la necesidad de generar estrategias terapéuticas eficaces, con el menor número de contraindicaciones y facilidades que sean aplicables en la práctica clínica médica y odontológica. En este enfoque, las células deben ser capaces de adherirse y proliferar en un andamio adecuado, a fin de regenerar tejidos dañados. Diversos sustitutos viables pueden implantarse en el tejido periférico al sitio de la zona lesionada. Para este propósito, se han utilizado polímeros sintéticos y biodegradables o naturales biocompatibles para desarrollar andamios especialmente diseñados para imitar o mimetizar la estructura biológica y función de la matriz extracelular nativa (16,17).

En un estudio publicado en el 2015, Razavi y colaboradores (18) trabajaron en un método de preparación de andamios, donde se utilizó electrohilado (*electrospinning*) para dispersar nanofibras de quitosano a través de un andamio de APLG. Ellos encontraron que el andamiaje de nanofibras con un alto porcentaje de nanopartículas de quitosano promovió la adhesión y la proliferación celular. La adhesión celular al andamio de APLG/quitosano se incrementó al aumentar el contenido de quitosano. En el presente estudio se observó que las CTPD en matrices de APL se adhirieron a los constructos desde el día 1 y durante los 3 tiempos de evaluación. No obstante, estas células experimentaron un cambio morfológico evidente, como se observa en las microfotografías. Se observó que en el primer día hubo un predominio del 70 % de células con morfología esférica, el día 7 había presencia de un 65 % de células estrelladas y el día 15 estas células adoptaban una forma fusiforme en un 31 %. En efecto, se observaron al día 15 células CTPD con un núcleo central y amplios citoplasmas con morfología estrellada, numerosas prolongaciones citoplasmáticas elongadas.

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

Muchos investigadores han empleado la técnica de electrohilado para sintetizar andamios biocompatibles y biodegradables. Se han fabricado matrices nanoestructuradas de APLG y APLG/quitina (nanofibras de APLG y nanopartículas de quitina) para examinar sus efectos sobre la adhesión celular y la propagación normal de fibroblastos. Ellos encontraron que la matriz compuesta por APLG superó la matriz de APLG/quitina en relación con la adhesión celular y la propagación de los queratinocitos humanos normales. La fabricación de nanofibras de quitosano puro está limitada por las altas fuerzas de repulsión entre los grupos iónicos dentro de la cadena principal del polímero que pudiera derivarse de la aplicación de un alto campo eléctrico durante el electrohilado (18).

El vertiginoso desarrollo tecnológico y el avance de las impresoras en 3D de última generación con alta resolución y múltiples materiales de impresión están aumentando la velocidad con que las ideas novedosas generan prototipos para ser evaluados en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y remplazo de órganos enteros. Rosenzweig y colaboradores (19) estudiaron el comportamiento de células del núcleo pulposo vertebral y condrocitos en andamios de APL y ABE impresos en 3D. Analizaron la adhesión y el crecimiento celular a los 7, 14 y 21 días por microscopía de contraste de fase. La adhesión de las células fue inmediatamente visible y el crecimiento de ambos tipos de células mostró aumento progresivo a los 7 y 14 días, incluso se observó que después de 21 días las células en medio de cultivo mantuvieron sus propiedades. Estos datos sientan un precedente importante para el diseño y la generación de constructos impresos en 3D que posean propiedades mecánicas y estructurales estrechamente asimilables a los tejidos nativos. Estos andamios proporcionan un entorno adecuado para el crecimiento celular y la regeneración de la matriz de cartílago en el caso de futuras aplicaciones de reparación de disco. La impresión en 3D con estos materiales, combinados con el cultivo de células, es una puerta de entrada para generar estrategias en ingeniería de tejidos. En el presente estudio se observó que las CTPD presentaron adherencia *in vitro*, una morfología fibroblastoide con la capacidad de generar UFC.

En la inmunofenotipificación se expresaron los antígenos CD73+ en un 99,12 %, CD105+ en un 54,70 % y CD90+ en un 91,31 % y presentaron una baja expresión CD45 en un 10,15 % y CD34 en un 0,50 %. Estos hallazgos, en conjunto, muestran que las células obtenidas del tejido pulpar son células madre mesenquimales, pues cumplen los criterios mínimos establecidos. Sin embargo, vale la pena destacar las variaciones en los porcentajes de expresión de los marcadores de las células troncales mesenquimales después de criopreservación que se observaron en este estudio. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos en otros estudios, pues es posible que sean subpoblaciones heterogéneas de células troncales mesenquimales obtenidas después criopreservación (8,11). Las CTPD se emplearon en este estudio por su fácil obtención y, como lo reportan otros estudios, porque tienen un alto potencial de diferenciación *in vitro*. Estas células son prometedoras en regeneración tisular (8,20,21).

La morfología y la adhesión de las CTPD sembradas en las matrices de APL se evaluaron a través de SEM. Se observó que las células se adhirieron a los constructos en los 3 tiempos; no obstante, experimentaron un cambio morfológico evidente en las microfotografías. Se observó que la morfología de las células sobre las matrices fue esférica, oval, fusiforme y estrellada. Inicialmente, predominaron células con morfología esférica y oval, pero, a medida que transcurría el tiempo, se evidenció un incremento de células con morfología fusiforme y estrellada con prolongaciones citoplasmáticas que corresponden a filopodios y estructuras vesiculares sobre la superficie celular compatibles con vesículas de la matriz. Este fenómeno se visualizó a los 7 días de cultivo. El análisis al SEM reveló buena adhesión y distribución de las CTPD en la matriz de APL. Además, se observó secreción de matriz extracelular depositada en la matriz de APL. Incluso se presentó proliferación y estiramiento celular, lo que indica que las CTPD tienen buena adhesión al material sintético de impresión. Asimismo, se observó que la presencia de estas células en las capas profundas de la matriz confirmó su penetración en el interior de las matrices. La observación al SEM reveló la continuidad de interconectividad entre las superficies profundas y superficiales de las matrices entre 80 % y 90 % y facilitó la penetración de las prolongaciones celulares de las CTPD (14).

En el estudio de Ferlin y colaboradores (22) se estudió la interacción entre células y un biomaterial subyacente y mostró su importancia para promover adhesión, proliferación y función celular. Se ha comprobado previamente que el resultado de andamios impresos con precisión, con parámetros como tamaño de los poros, porosidad y espesor de precisión de hasta 91 %, promueven el intercambio de nutrientes, factores solubles y señales celulares. Aquí muestran la capacidad de lograr una red interconectada de poros de tamaño uniforme impresos con alta reproducibilidad. Adicionalmente, no se encuentran extractos de los productos de degradación que lleguen a inducir significativamente la muerte celular. En el presente estudio se realizaron pruebas preliminares para implementar el protocolo de cultivo de CTPD en matrices dentales

en 3D de APL. En efecto, en primer lugar, se imprimieron unas matrices en APL cuadrículadas con poros interconectados. Esto mostró que el APL no es citotóxico y su superficie es lisa, homogénea y con una matriz que presenta poros de 400 μm de diámetro interconectados, lo que favorece el depósito de factores solubles, la colonización de células y, posiblemente, de vasos sanguíneos. Las CTPD se adhirieron a las matrices en 3D de APL durante 24 y 48 h y penetraron sus poros interconectados. Esto permitió al equipo de investigación continuar con la impresión de matrices dentales en 3D en APL (22,23).

Teniendo en cuenta el referente teórico en ingeniería de tejidos, la elección del material considerando sus propiedades es fundamental. Estudios *in vitro* previos han destacado que la porosidad y el alto peso molecular del APLG ofrecen tanto características de compatibilidad biomecánica como celular, haciéndolo un sustituto osteogénico potencial para el uso en esta disciplina. Tayton y colaboradores (24) comprobaron en un estudio del 2012 el potencial de los polímeros sintéticos como sustitutos alogénicos en la ingeniería de tejidos ósea cuando se emplean constructos tridimensionales de APLG con células madre mesenquimales humanas. Sin embargo, se ha reportado que este polímero puede llegar a presentar una desventaja: su propensión a deformarse por un mecanismo denominado *arrastré*, porque tiende a tener un módulo de elasticidad bajo. Por esto se ha creído necesario reforzar los apoyos de APLG con una fase cerámica para emplearse como biocompuesto en la ingeniería de tejidos. Estos hallazgos crearon la necesidad de comparar el comportamiento de células sembradas en dos tipos de constructos (APLG y APLG/hidroxiapatita).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los andamios empleados se diseñaron adecuadamente, con morfología de superficie, lo que permitió la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular. Por otra parte, la aparición de estructuras similares a vesículas de matriz en las CTPD sembradas en matrices de APLG/hidroxiapatita con medio completo de cultivo puede sugerir que este biocompuesto es bioactivo y posee un efecto osteoinductor por la presencia de hidroxiapatita (10,24). Por lo tanto, hay muchos constructos, incluido el de este estudio, que presentan buena biocompatibilidad y podrían reemplazar los materiales utilizados actualmente en la ingeniería de tejidos. En resumen, el material mostró su capacidad de brindar las características necesarias para la adhesión celular; sin embargo, se necesitan investigaciones *in vivo* que puedan servir de base para la obtención de nuevos tejidos sintetizados *in vitro* mediante ingeniería de tejidos (15).

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

Con base en el análisis de la literatura existente y el propio juicio clínico y de investigación, es cada vez más claro que la odontología adoptará nuevos conceptos de la regeneración de tejidos en su práctica clínica. Es probable que estos enfoques incluyan el uso de terapias basadas en células troncales combinadas (o no) con enfoques biomiméticos. Aunque el uso de células trae muchas nuevas oportunidades terapéuticas, y quizás permita el tratamiento de afecciones dentales que no pueden tratarse con materiales y procedimientos actuales, se debe proceder con precaución. Es imperativo para la clínica utilizar procedimientos con células troncales que apoyen sólidamente la investigación básica y traslacional (25).

CONCLUSIONES

En este trabajo se comprobó la capacidad de diseñar y construir prototipos dentales impresos en 3D con APL a los cuales se les pueden adherir CTPD.

Este tipo de células troncales mesenquimales son excelentes para su empleo en terapia celular y regeneración tisular en especialidades como cirugía oral y maxilofacial, periodoncia y endodoncia.

El biomaterial APL mostró no ser citotóxico para las CTPD, porque las células se adhirieron y proliferaron sobre la matriz dental impresa en 3D.

RECOMENDACIONES

Es necesario desarrollar nuevos estudios donde se identifique si existe diferenciación celular al momento de cultivarse las células en las matrices de APL.

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

Referencias

1. Munévar J, Becerra A, Hernández A. Biología de las células stem. NOVA. 2005 ene; 3(3): 95-108. <https://doi.org/10.22490/24629448.418>.
2. Flores E, Montesinos J, Mayani H. Células troncales mesenquimales. Historia, biología y aplicación clínica. Rev Inv Clin. 2006; 58(5): 498-511.
3. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol. 1974; 2(2): 83-92.
4. Owen JJ, Jenkinson EJ, Kingston R. The ontogeny of T lymphocytes. Ann Immunol. 1983 Jul-Aug; 134D(1): 115-22. [https://doi.org/10.1016/S0769-2625\(83\)80062-2](https://doi.org/10.1016/S0769-2625(83)80062-2)
5. Nakata K, Nakahara H, Kimura T, Kojima A, Iwasaki M, Caplan AI, Ono K. Collagen gene expression during chondrogenesis from chick periosteum-derived cells. FEBS Lett 1992 Mar 16; 299(3): 278-82. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80131-Y](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80131-Y)
6. D'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2009 Jul 15; 312B(5): 408-15. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21263>
7. Cortés AJ, Cortés T, Duque AE, Rodríguez AA, Munévar JC. Células troncales mesenquimales de la papila apical y su papel prometedor en la biología radicular. Rev Mex Estomatol. 2017 ene; 3(2): 61-74.
8. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Dec 5; 97(25): 13625-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
9. Qian J, Xu W, Yong X, Jin X, Zhang W. Fabrication and in vitro biocompatibility of biomorphic PLGA/nHA composite scaffolds for bone tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014 Mar; 36(1): 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.11.047>
10. Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Zielins ER, Paik KJ, Longaker MT, Wan DC. Biomaterials for craniofacial bone engineering. J Dent Res [internet]. 2014 Dec; 93(12): 1187-95. Disponible en <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034514547271>
11. Duailibi MT, Kulikowski LD, Duailibi SE, Lipay MVN, Melaragno MI, Ferreira LM. Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. J Mol Histol. 2012 Feb; 43(1): 89-94. <https://doi.org/10.1007/s10735-011-9373-z>
12. Morales D. Tissue engineering as a pillar of regenerative medicine in dentistry. Rev Cubana Estomatol. 2014; 51(3): 288-304.
13. Rasperini G, Pilipchuk SP, Flanagan CL, Park CH, Pagni G, Hollister SJ, Giannobile WV 3D-printed bioresorbable scaffold for periodontal repair. J Dent Res. 2015 Sep; 94(9): 153-7. <https://doi.org/10.1177/0022034515588303>

14. Vohra S, Hennessy KM, Sawyer AA, Zhuo Y, Bellis SL. Comparison of mesenchymal stem cell and osteosarcoma cell adhesion to hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Dec; 19(12): 3567-74. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3525-z>
15. Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng*. 2015; 9(1): 4. <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0001-4>
16. Mauth C, Huwig A, Graf-Hausner U, Roulet J-F. Restorative applications for dental pulp therapy. In Ashammakhi N, Reis R, Chiellini E, editors. *Topics in Tissue Engineering* (volume 3). E-book; 2007. Disponible en: https://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol3/
17. Rendón J, Jiménez LP, Urrego PA. Stem cells in dentistry. *CES Odontol*. 2011; 24 (1): 51. <https://doi.org/10.21615/cesodon>
18. Razavi S, Zarkesh-Esfahani H, Morshed M, Vaezifar S, Karbasi S, Golozar MA. Nanobiocomposite of poly (lactide-co-glycolide)/chitosan electrospun scaffold can promote proliferation and transdifferentiation of Schwann-like cells from human adipose-derived stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Aug; 103(8): 2628-34. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35398>
19. Rosenzweig DH, Carelli E, Steffen T, Jarzem P, Haglund L. 3D-printed ABS and PLA scaffolds for cartilage and nucleus pulposus tissue regeneration. *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 3; 16(7): 15118-35. <https://doi.org/10.3390/ijms16071511>
20. Forriol F, Esparza R. Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica. *Trauma (Majadahonda)*. 2008 abr-jun; 19(2): 88-101. <https://dx.doi.org/10.4321/S1137-66272014000100014>
21. Quesenberry PJ, Aliotta JM. The paradoxical dynamism of marrow stem cells: considerations of stem cells, niches, and microvesicles. *Stem Cell Rev*. 2008 Sep; 4(3): 137-47. <https://doi.org/10.1007/s12015-008-9036-y>
22. Ferlin KM, Prendergast ME, Miller ML, Kaplan DS, Fisher JP. Influence of 3D printed porous architecture on mesenchymal stem cell enrichment and differentiation. *Acta Biomater*. 2016 Mar; 32(1): 161-9.
23. Rosales-Ibáñez R, Alvarado-Estrada KN, Ojeda-Gutiérrez F. Ingeniería tisular en odontología. *Rev ADM*. 2012; 69(4): 164-7. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.007>
24. Tayton E, Fahmy S, Purcell M, Aarvold A, Smith JO, Kalra S, Briscoe A, Lanham S, Howdle S, Shakesheff A, Dunlop DG, Oreffo RO. An analysis of polymer type and chain length for use as a biological composite graft extender in impaction bone grafting: a mechanical and biocompatibility study. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Dec; 100(12): 3211-9. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34264>
25. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontol*. 2011 Jan; 99(1): 1-7. <https://doi.org/10.1007/s10266-010-0154-z>

Licencia Creative Commons CC BY 4.0

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