



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

**CARACTERIZACIÓN HISTOMORFOLÓGICA DE TEJIDO CARTILAGINOSO EN  
PROCESO REPARATIVO DE DEFECTO CRÍTICO CRANEAL MURINO CON  
IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE PULPARES HUMANAS**

**Sidfrid Paulo Antonio Delgado Cruz**

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

**TUTORA PRINCIPAL**

**Dra. Soledad Acuña M.**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. María Angélica Torres V.**

**TM. Cristian Peñafiel E.**

**Adscrito a Proyecto PAI N° 79160076  
Santiago - Chile  
2021**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

**CARACTERIZACIÓN HISTOMORFOLÓGICA DE TEJIDO CARTILAGINOSO EN  
PROCESO REPARATIVO DE DEFECTO CRÍTICO CRANEAL MURINO CON  
IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE PULPARES HUMANAS**

**Sidfrid Paulo Antonio Delgado Cruz**

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

**TUTORA PRINCIPAL**

**Dra. Soledad Acuña M.**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. María Angélica Torres V.**

**TM. Cristian Peñafiel E.**

**Adscrito a Proyecto PAI N° 79160076  
Santiago - Chile  
2021**

*Con mucho amor y cariño, a mi familia y amigos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Partir agradeciendo a toda mi familia, por su apoyo y amor incondicional.

A mi mamá, papá y mi abuela, por nunca dejarme solo, comprenderme durante todo mi proceso universitario y por apoyarme y contenerme durante los buenos y malos momentos.

A todos mis familiares y amigos que me ayudaron a cursar mis ramos: siendo mi madre Paulina Cruz mi paciente estrella en 4to año, mi abuela Margot de la Fuente en prótesis removible, La Srta. Elisa Salinas en prótesis totales y a mi tía Jacqueline Soto en clínica integral del adulto. Muchas gracias por su tiempo, paciencia y por ser una parte esencial de mi proceso formativo.

A mis amigos(as), por su compañía, apoyo y contención durante toda la carrera. Mención honrosa a aquellos con los cuales tuve la oportunidad de trabajar y crecer juntos en el ámbito clínico: Jaime de la Maza, Matilde del Olmo, Natalia Figueroa, Rodrigo Farias y Belén Delgado.

A mis tutores(as) de tesis, la Dra. María Angélica Torres, el Prof. Cristian Peñafiel y la Dra. Soledad Acuña, se les agradece de todo corazón por su ayuda en la realización de este trabajo y por siempre tener la mejor disposición para resolver mis dudas.

A todos mis compañeros(as) del laboratorio de histología, por siempre ayudarnos mutuamente y hacer esta última etapa más llevadera.

A las(os) docentes que marcaron mi paso por la universidad en especial aquellas que no solo me hicieron crecer como profesional, sino también como persona. Muchísimas gracias e infinitos cariños: Dra. Patricia Cisternas, Dra. Alejandra Fuenzalida, Dra. Gina Pennacchiotti y Dra. Claudia Diaz.

A los tutores de mis internados y en especial a todo el equipo del área dental del CESFAM Santa Amalia los cuales me brindaron muy buenos momentos y grandes enseñanzas.

Con todo mi cariño, Paulo.

# INDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>11</b>
3.1	TEJIDO CARTILAGINOSO	11
3.2	OSTEOGÉNESIS Y REPARACIÓN ÓSEA	12
3.3	MEDICINA REGENERATIVA E INGENIERIA TISULAR	24
3.4	CÉLULAS MADRE	25
3.4.1	CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	26
3.4.2	CÉLULAS MADRE DENTALES	27
3.5	MODELO ANIMAL DE DEFECTO CRITICO	30
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
4.1	HIPÓTESIS	32
4.2	OBJETIVO GENERAL	32
4.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	32
<b>5</b>	<b>METODOLOGÍA.</b>	<b>33</b>
5.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	33
5.2	ANIMALES	33
5.3	OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS (HDPSCs)	34
5.3.1	OBTENCIÓN DE LA PULPA DENTARIA DE DIENTES HUMANOS	34
5.3.2	EXTRACCIÓN DE LA PULPA DENTARIA, OBTENCIÓN DE CÉLULAS Y PREPARACIÓN DE CONSTRUCTOS.	35
5.4	IMPLANTACIÓN DE HDPSCs EN MODELO DE DEFECTO CRÍTICO DE CALOTA DE RATÓN	37
5.4.1	CIRUGÍA DE DEFECTOS ÓSEOS EN CALOTA DE RATONES ADULTOS	37
5.4.2	CUIDADOS POST OPERATORIOS	38
5.5	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A 30 Y 90 DÍAS PARA ANÁLISIS HISTOMORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS	38
5.5.1	OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y TÉCNICA HISTOLÓGICA	38
5.5.2	TÉCNICA HISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA	38
5.5.3	ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO	40
5.6	ANÁLISIS DE LOS DATOS	41
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
6.1	PRESENCIA Y UBICACIÓN DE TEJIDO CARTILAGINOSO EN DEFECTOS CRÍTICOS DE CALOTA DE RATÓN IMPLANTADO CON HDPSCs.	42
6.1.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES	42
6.1.2	FRECUENCIA Y UBICACIÓN DE CARTÍLAGO EN DEFECTOS A LOS 30 Y 90 DÍAS	48

<b>6.2</b>	<b>CARACTERIZACION DEL ESTADO DE MADUREZ HISTOMORFOLÓGICA DEL CARTÍLAGO EN DEFECTO CRITICO A LOS 30 Y 90 DIAS DE IMPLANTADO EL CONSTRUCTO.</b>	<b>51</b>
<b>6.3</b>	<b>DETERMINACION MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DEL ORIGEN DE LA ESPECIE DE LAS CÉLULAS QUE GENERARON EL CARTÍLAGO OBSERVABLE EN LOS CORTES HISTOLÓGICOS.</b>	<b>58</b>
6.3.1	INMUNOMARCAJE DE <i>ANTI-HUMAN VIMENTIN</i>	58
6.3.2	INMUNO-MARCAJE DE <i>ANTI-HUMAN COL2A1</i>	59
6.3.3	INMUNO-MARCAJE DE <i>ANTI-HUMAN OCN</i>	59
<b>7</b>	<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>64</b>
<b>7.1</b>	<b>CONCEPTOS GENERALES</b>	<b>64</b>
<b>7.2</b>	<b>SOBRE LA PRESENCIA, FRECUENCIA Y UBICACIÓN DEL TEJIDO CARTILAGINIOSO DENTRO DEL DEFECTO A LOS 30 Y 90 DIAS</b>	<b>64</b>
<b>7.3</b>	<b>SOBRE EL ESTADO DE MADUREZ HISTOMORFOLOGICA DEL CARTILAGO HALLADO Y SU COMPARACIÓN A LOS 30 Y 90 DIAS</b>	<b>67</b>
<b>7.4</b>	<b>SOBRE EL POSIBLE ORIGEN HUMANO DEL CARTILAGO HALLADO DENTRO DEL DEFECTO CON TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA</b>	<b>69</b>
<b>7.5</b>	<b>APLICACIONES CLÍNICAS.</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b><u>ANEXOS</u></b>	<b>81</b>
<b>10.1</b>	<b>ANEXO 1: AUTORIZACIÓN COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOSEGURIDAD, CAMPUS NORTE</b>	<b>81</b>
<b>10.2</b>	<b>ANEXO 2: AUTORIZACIÓN COMITÉ DE INSTITUCIONAL DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b>	<b>82</b>
<b>10.3</b>	<b>ANEXO 3: AUTORIZACIÓN COMITÉ DE ÉTICA CIENTÍFICO</b>	<b>83</b>
<b>10.4</b>	<b>ANEXO 4: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	<b>84</b>
<b>10.5</b>	<b>ANEXO 5: DESMINERALIZACIÓN, DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN DE MUESTRAS EN PARAFINA</b>	<b>87</b>
10.5.1	DESMINERALIZACIÓN	87
10.5.2	DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN EN PARAFINA	87
<b>10.6</b>	<b>ANEXO 6: TÉCNICAS DE TINCIÓN HISTOLÓGICAS: HEMATOXILINA &amp; EOSINA (H/E), AZUL ALCIÁN Y SAFRANINA O</b>	<b>88</b>
10.6.1	H/E	88
10.6.2	AZUL ALCIÁN	88
10.6.3	O-SAFRANINA	89
<b>10.7</b>	<b>ANEXO 7: TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA</b>	<b>90</b>
<b>10.8</b>	<b>ANEXO 8:</b>	<b>91</b>

# 1 RESUMEN

**Introducción:** en la odontología moderna ha habido un aumento en la investigación sobre ingeniería y regeneración tisular principalmente de tejidos duros, basados en el descubrimiento de células progenitoras del órgano dentario como lo son las células madre de la pulpa dentaria (hDPSCs). Un tipo de tejido que toma un papel crucial dentro de los procesos reparativos óseos es el cartílago. Caracterizar su presencia en un contexto de reparación de calota implantado con hDPSCs es esencial para transferir estos enfoques terapéuticos a la clínica humana.

**Material y métodos:** se recuperó el tejido pulpar de terceros molares. Para obtener una población celular de hDPSCs, la cual fue implantada en defectos críticos de calota de ratón. Las muestras fueron recuperadas a los 30 y a los 90 días para su posterior evaluación histomorfológica e inmunohistoquímica. Se analizaron las diferencias en número, tamaño (área) y ubicación de focos cartilagosos mediante test de diferencia de proporciones y test de Mann-Whitney.

**Resultados:** tanto a los 30 como a los 90 días existe presencia de tejido cartilaginoso, siendo la cantidad de focos significativamente mayor a los 90 días. Su distribución preferente en el defecto vario desde el centro a los 30 días hacia la periferia a los 90 días. El cartílago mostró diversos estados de madurez histomorfológica tanto a los 30 como a los 90 días mostrando características de transdiferenciación. La inmunohistoquímica mostró el origen humano del cartílago hallado al interior del defecto.

**Conclusiones:** las hDPSCs inducen un proceso reparativo de osificación principalmente de tipo endocondral, por la vía canónica como también por procesos de transdiferenciación. El proceso de osificación se extiende desde el centro hacia la periferia del defecto. La evidencia inmunohistoquímica presentada en este trabajo permite establecer el origen humano del tejido cartilaginoso.

## 2 INTRODUCCION

Existen diferentes factores que pueden producir daño o pérdida de tejidos y órganos del cuerpo, entre ellos traumas, enfermedades congénitas, procesos neoplásicos, etc. En la actualidad existen diferentes alternativas terapéuticas para su manejo, pero muchas veces la única solución se limita al uso de prótesis artificiales. De acá surge la necesidad de utilizar técnicas de medicina regenerativa y aplicaciones de ingeniería tisular, en donde los avances en la ciencia y nuevas tecnologías han permitido un progreso importante en sus conocimientos y su aplicación directa en la práctica clínica.

En ingeniería tisular muchos de los avances se basan en el estudio de células madre. Hoy en día se conocen una cantidad considerable de fuentes para este tipo de células en tejidos adultos, lo que ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. El descubrimiento de células madre en los diferentes tejidos del órgano dentario, le ha dado nuevas perspectivas a la odontología moderna. Las células madre de la pulpa dentaria humana (hDPSCs) han sido las más estudiadas pues presentan la gran ventaja de que pueden obtenerse con muy baja morbilidad al extraer la pulpa de un diente o al realizar una extracción dental. En algunos ensayos clínicos, la implantación de hDPSCs en defectos óseos mandibulares, ha favorecido una mejor y rápida reparación, en comparación a defectos sin células (d'Aquino y cols., 2009; Giuliani y cols., 2013).

En el campo de la medicina regenerativa, el tejido óseo ha sido muy estudiado, debido a su alta morbilidad en los tiempos modernos. El hueso dañado es capaz de repararse por un proceso regenerativo dentro de los límites fisiológicos, es decir, mediante la formación de un tejido de similares características respecto al original (Schindeler y cols., 2008), siempre y cuando se presenten las condiciones adecuadas para ello. Hasta ahora se habían descrito dos formas principales de neoformación ósea dependiendo del grado de vascularización y de los movimientos del sitio de la lesión.

Es así como en sitios lesionados cuya movilidad es casi nula, el tejido óseo se formará directamente desde el tejido de granulación maduro (osificación endomembranosa). Sin embargo, lograr inmovilización casi total de huesos lesionados es muy poco probable, de modo que una gran parte de la neoformación ósea en procesos reparativos se produce de manera indirecta (Schindeler y cols., 2008), es decir, con la formación inicial de focos de tejido cartilaginoso que luego de su proliferación, hipertrofia de condrocitos, calcificación de la MEC y apoptosis de condrocitos, será reemplazado por trabéculas óseas. Sin embargo, actualmente se habla de otro mecanismo de neoformación ósea endocondral donde se formaría una línea de condrocitos que se transdiferenciaría a osteoblasto.

El tejido cartilaginoso, entonces, toma un rol fundamental en la mayoría de los procesos reparativos y regenerativos óseos, pero poco se ha descrito de su presencia en investigación sobre ingeniería tisular, origen de sus progenitores, predilección de sitios de su formación para la regeneración de tejido óseo y el papel que puede jugar en estos procesos. Es debido a esto que resulta interesante caracterizar la presencia de tejido cartilaginoso en un modelo de reparación de defecto crítico en la calota de ratón, ya que permite contextualizarnos en un proceso de regeneración de tejido duro en el territorio maxilofacial, el cual presenta gran dominio en el área odontológica, y así hincar una base para dilucidar a futuro cómo ocurre este proceso regenerativo basado en el uso de hDPSCs.

A continuación, se presentará un marco teórico en el cual se desarrollan los temas de mayor relevancia para este trabajo.

### **3 MARCO TEÓRICO**

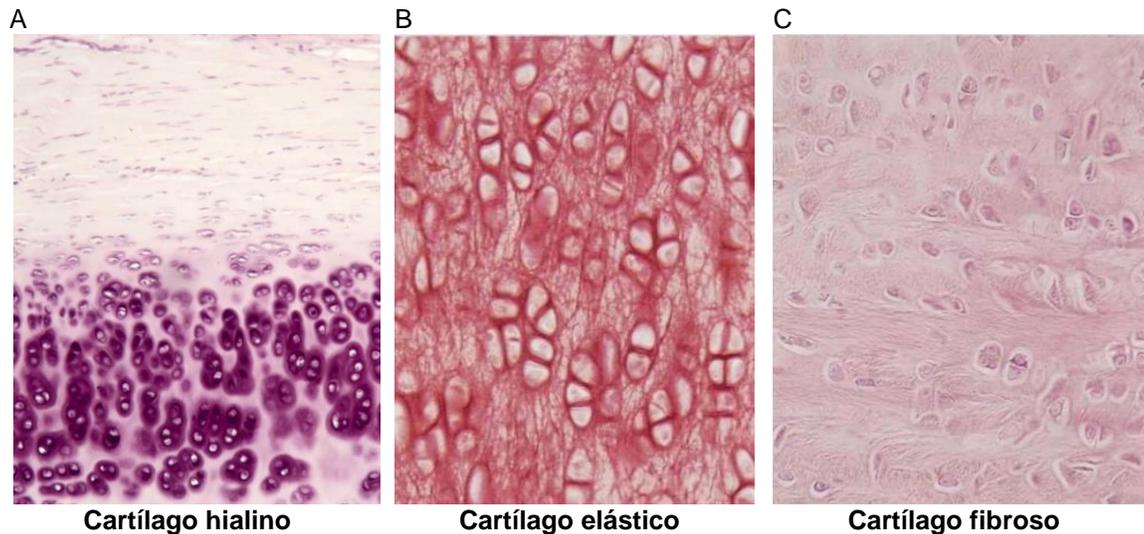
#### **3.1 TEJIDO CARTILAGINOSO**

El cartílago, toma un papel fundamental en muchos de los procesos reparativos óseos debido a que es un precursor intermedio de los procesos de osificación. Es una forma especializada de tejido conectivo constituido por células denominadas condrocitos, (que forman el 5%), distribuidos en una matriz extracelular (MEC) semejante a un gel (que forma el 95% restante) conformada principalmente por colágeno tipo II y glicosaminoglicanos (GAGs). El cartílago presenta una consistencia coloidal, flexible, que posee gran resistencia elástica a la presión, no presenta vasos sanguíneos ni linfáticos, por lo que se nutre por difusión de metabolitos provenientes del conjuntivo circundante a través de la fase acuosa (Brüel y cols., 2014). Existen tres variedades de tejido cartilaginoso en el cuerpo humano: cartílago hialino, elástico y fibroso, siendo el hialino la variedad más abundante (Figura 1).

El cartílago hialino está conformado microscópicamente por células redondeadas u ovalada, que se encuentran en grupos de dos o más en una matriz granular o casi homogénea. Estas células tienen generalmente contornos rectos donde están en contacto entre sí, con el resto de su circunferencia redondeada. Es el cartílago más comúnmente encontrado en el organismo, presentándose en cartílagos costales, en el tabique nasal, en la laringe, en la tráquea, en los bronquios, y en las superficies articulares.

El cartílago elástico histológicamente similar al cartílago hialino, pero con abundantes fibras elásticas en su MEC. Es muy resistente y está adaptado para soportar la flexión repetida. Su presencia en el organismo es más restringida, encontrándose en lugares donde se necesita sostén, pero también flexibilidad como el pabellón auditivo, la trompa faringotimpánica, la epiglotis y algunos cartílagos de la laringe.

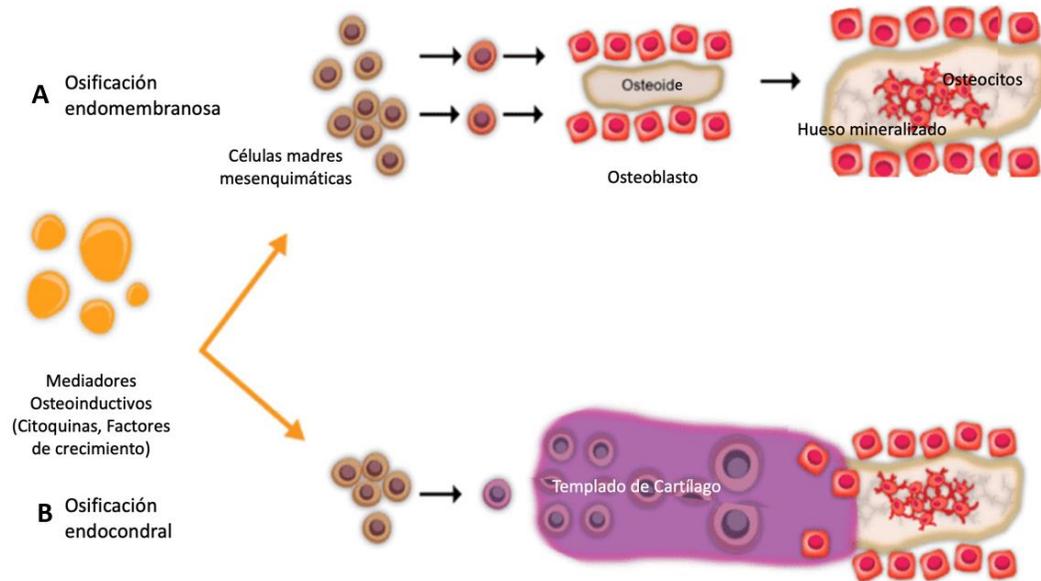
El cartílago fibroso o fibrocartílago, además del colágeno tipo II, contiene gran cantidad de fibras colágenas de tipo I y en la edad adulta carece de pericondrio. Está presente en la sínfisis púbica, en los discos intervertebrales y discos articulares, en sitios de inserción de tendones y ligamentos. El fibrocartílago se continúa gradualmente con los tejidos circundantes.



**Figura 1.** **A)** Porción superficial del cartílago traqueal mostrando la presencia de un cartílago hialino maduro. H & E x135. **B)** Cartílago elástico de epiglotis. La matriz esta entretejida con finas fibras elásticas. Orceína x200 **C)** Cartílago fibroso de disco intervertebral. H & E x275. (Imágenes del atlas de histología, Geneser)

### 3.2 OSTEOGÉNESIS Y REPARACIÓN ÓSEA

La osteogénesis es el proceso de formación del tejido óseo el cual tiene lugar principalmente durante el período de vida intrauterina, proceso llamado osteogénesis primaria, que puede ser de tipo endocondral o de tipo endomembranoso (Figura 2). El proceso básicamente comienza con la formación de una condensación mesenquimática cuyas células presentan una bipotencialidad condro y osteoprogenitoras (Tsang y cols., 2015). Esta condensación de células se forma mediante la producción de N-cadherina y su estado de agregación se mantiene gracias a la síntesis de proteínas fibronectina y N-CAM estimuladas por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), punto en el cual comienzan los programas de diferenciación osteogénico y condrogénico para posteriormente dar paso a la osificación intramembranosa y endocondral respectivamente, dependiendo de los factores de transcripción predominantes (Carlson, 2014).

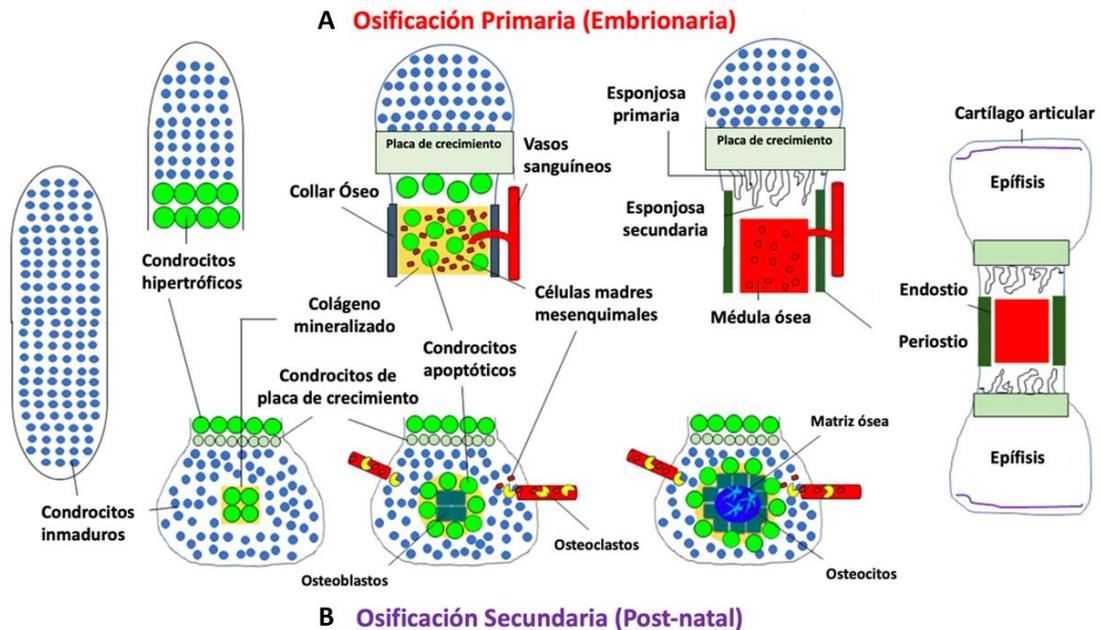


**Figura 2. Representación esquemática de los tipos de osificación. A) Intramembranosa. B) Endocondral (Imagen de Andrzejowki y Giannoudis, 2019)**

**La osificación endo o intramembranosa** conlleva una serie de etapas sucesivas que terminarán por formar a la mayoría de los huesos planos. Inicialmente, a partir de las condensaciones mesenquimáticas, las células expresan básicamente el factor de transcripción Runx2 el cual controla la vía de diferenciación hacia osteoblastos. Estas células secretan matriz extracelular (MEC) de tipo osteoide y establecerán varios centros de osificación para conformar un hueso desde el punto de vista macroscópico. La activa formación del osteoide por osteoblastos y el cambio de polarización de su secreción, determina que muchos queden incluidos en su MEC constituyéndose en osteocitos. El osteoide madura y será mineralizado (calcificación) por osteoblastos y primeros osteocitos, constituyendo un hueso no laminillar. Posteriormente este hueso inmaduro será modelado de acuerdo a los requerimientos funcionales conformando huesos laminillares maduros (Abzhanov y cols., 2007). Mediante este mecanismo de osificación se forman los huesos del neurocráneo, tales como los parietales, frontales, las escamas del occipital y del temporal, así como los huesos del viscerocráneo como la mandíbula y el maxilar (Percival y Richtsmeier, 2013). Los

huesos del neurocráneo, quedarán conformados por dos tablas compactas de tejido óseo, las tablas interna y externa, y entre ellas habrá hueso esponjoso o diploe.

**La osificación endocondral**, el otro mecanismo de osificación primaria, se inicia con la condrogénesis y el establecimiento de verdaderos moldes cartilagosos (cartílago hialino y fibrocartílago) (Figura 3). Inicialmente la condensación del mesénquima, induce la expresión del factor de transcripción Sox 9, llevando al grupo de células mesenquimáticas a la diferenciación en la vía condroblástica. Sin embargo, varios estudios recientes han mostrado que existirían diversos linajes celulares y que células que de una vía de diferenciación condrocitaria podrían llegar a diferenciarse finalmente en osteoblastos



**Figura 3. Paradigma existente para la osificación endocondral de hueso largo. A)** La osificación endocondral primaria comienza con la formación de una plantilla de condrocitos durante la embriogénesis. Los condrocitos hipertrofian a partir de la diáfisis media, y finalmente se extienden a los polos epifisarios. La vascularización invade el hueso en formación, transportando médula, células del estroma mesenquimático y osteoclastos. Las células hipertrofos sufren apoptosis, ayudadas por la eliminación de la matriz por osteoclastos. Las células del estroma mesenquimático se diferencian en osteoblastos y luego en osteocitos. **B)** La osificación secundaria ocurre en la epífisis postnatal en roedores. Los condrocitos inmaduros en el centro de la epífisis se vuelven hipertrofos para producir colágeno mineralizado y eventualmente sufrir apoptosis. La vascularización invade y transporta médula, células estromales mesenquimales y precursores de osteoclastos. La formación ósea se inicia en el centro y se extiende periféricamente (Figura adaptada de Aghajanian y Mohan, 2018).

***En la vía tradicional o canónica***, los condroblastos secretan MEC específica, muchos quedan incluidos en su matriz transformándose en condrocitos inmaduros que proliferan rápidamente, secretando una matriz de colágeno tipo 2 (COL2) y forman tanto el pericondrio como el resto de los condrocitos, los cuales continúan el crecimiento intersticial del tejido formando clonas y los condroblastos el crecimiento aposicional a partir del pericondrio. Esta matriz se degrada cuando los condrocitos experimentan una diferenciación hipertrófica, calcificación de su MEC y secretan enzimas como la metaloproteasa de matriz 13 (MMP13) y ADAM-TS4, además liberan otras moléculas de señalización angiogénica (Aghajanian y Mohan, 2018). Los condrocitos hipertróficos entran en apoptosis y el pericondrio se convierte en periostio, mientras que la capa interna del periostio sufre osificación intramembranosa para formar un collar óseo que encierra los condrocitos en el centro del hueso. Al mismo tiempo, el tejido es invadido por vasos entrantes. Los osteoclastos de la vascularización invasora eliminan los condrocitos de la plantilla y las células del estroma mesenquimático reemplazan los condrocitos apoptosantes. Las células del estroma mesenquimático se diferencian en osteoblastos para producir colágeno tipo 1 (COL1) y otras proteínas de la matriz ósea, como la sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina que estimulan la mineralización ósea (Florencio-Silva y cols., 2015; Aghajanian y Mohan, 2018). Esto genera centros de osificación primaria en diferentes cartílagos del feto, por ejemplo en la base de cráneo y en la diáfisis.

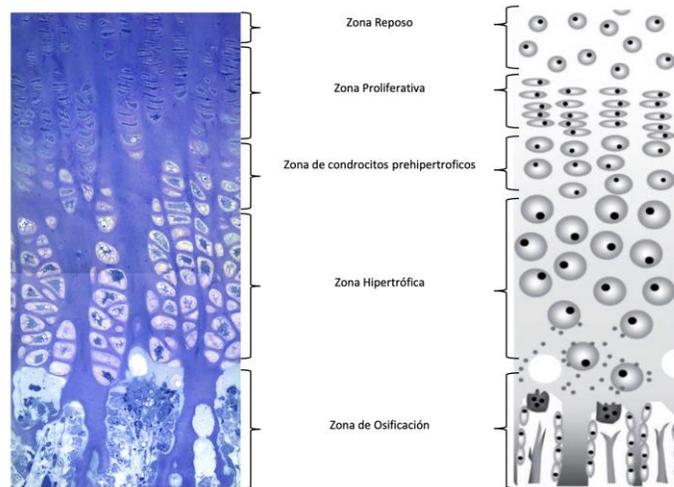
El crecimiento de los huesos continuará gracias a la permanencia de centros de cartílago con actividad proliferativa y osteo-formadora en la placa o disco de crecimiento. Finalmente, los cartílagos de crecimiento terminarán por osificarse y con ello también se detendrá el crecimiento del hueso (Brüel y cols., 2014).

Histológicamente, los condrocitos en el cartílago de crecimiento están dispuestos en zonas morfológicamente distintas (Figura 4), que reflejan los cambios en el estado funcional y molecular de las células. La primera zona consta de condrocitos en reposo en un entorno avascular. Los condrocitos se presentan aislados y de forma oval, secretan factores antiangiogénicos y sintetizan una matriz compuesta principalmente por colágeno II y proteoglicanos.

En la zona adyacente, los condrocitos aplanados o con forma de cuña proliferan y se alinean en columnas paralelas al eje longitudinal del hueso en la llamada zona proliferativa. Posteriormente, los condrocitos se diferencian más y entran en la etapa prehipertrófica, donde comienzan a aumentar su tamaño. Durante esta etapa se producen adseverina (una proteína de unión a actina), proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), la proteína de señalización Indian hedgehog homologue (Ihh), así como los factores de transcripción runx-2 y osterix (también conocido como SP7). La expresión de runx-2 estimula la regulación positiva de marcadores hipertróficos como colágeno X, Ihh y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y está controlada por la tensión de oxígeno. La adseverina participa en los reordenamientos citoesqueléticos de los condrocitos en maduración y es esencial para la hipertrofia celular; además, estimula la expresión de colágeno X e Ihh. A su vez, Ihh, expresado por las células hipertróficas tempranas, estimula la proliferación y la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), que inhibe la transición a la hipertrofia, creando así un ciclo de retroalimentación negativa de hipertrofia de condrocitos (Gawlitta y cols., 2010).

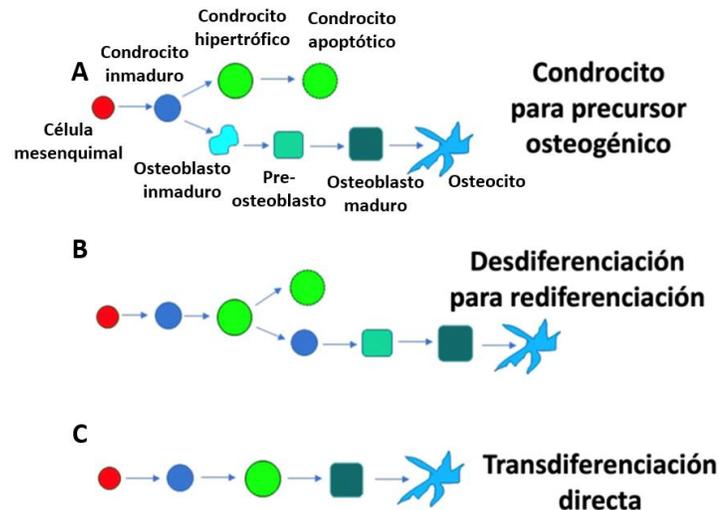
BMP-6 también estimula la expresión de colágeno X. Una vez que se sintetiza el colágeno X, las células se diferencian en la etapa hipertrófica, en la que las células individuales aumentan aún más de tamaño a medida que se alejan de la epífisis, adquiriendo una forma redondeada. Durante esta etapa terminal de diferenciación, las células hipertróficas ya no expresan genes condrogénicos, como sox-9. Ahora se caracterizan por la expresión de los genes osteogénicos fosfatasa alcalina (ALP), runx-2, colágeno I, osteonectina y durante la hipertrofia tardía, osteopontina (también sialoproteína ósea 1 o fosfoproteína 1 secretada), sialoproteína ósea 2 y osteocalcina. Además, la matriz alrededor de los condrocitos hipertróficos tardíos se mineraliza mediante la deposición de hidroxapatita (White y Wallis, 2001; Yang S. y cols., 2003).

Finalmente se presenta la zona de osificación donde ya encontramos la presencia de tejido óseo como tal.



**Figura 4. Morfología del tejido cartilaginoso en osificación endocondral** (imagen modificada de Mackie y cols, 2008 y Gawlitta y cols 2010)

**La otra vía de osificación endocondral**, postulada actualmente, plantea que los condrocitos pueden transdiferenciarse a osteoblastos mediante tres modelos principales, los dos primeros modelos implican transdiferenciación intermedia y el modelo final implica transdiferenciación directa, cada modelo es mecánicamente diferente y puede ser específico para diferentes sitios esqueléticos durante los períodos de crecimiento embrionario, postnatal y en procesos reparativos óseos (Figura 5).



**Figura 5. Modelos de transdiferenciación de condrocitos a osteoblastos. A)** Condrocito a precursor osteogénico. Los condrocitos inmaduros se diferencian en una población precursora osteogénica que luego se diferencia en pre-osteoblastos y osteoblastos. **B)** Desdiferenciación a la rediferenciación. Los condrocitos hipertrofos se diferencian en condrocitos inmaduros, que se diferencian directamente en un destino osteogénico. **C)** Transdiferenciación directa. Los condrocitos hipertrofos se diferencian directamente de los osteoblastos.

**El modelo de condrocito como precursor osteogénico (PO)** sugiere que los condrocitos inmaduros en la placa de crecimiento pueden diferenciarse en un precursor osteogénico transitorio en la metáfisis (Ono y cols., 2014). Durante el rápido crecimiento óseo, esto proporciona un mecanismo para la generación de células estromales y osteoblastos (Figura 5, A). En este modelo, no se cree que los precursores osteogénicos transitorios se renueven por sí mismos. Además, este modelo parece ser específico para el crecimiento metafisario, gran parte del cual ocurre embrionariamente durante la osificación primaria, pero puede extenderse al crecimiento postnatal y está separado de los progenitores mesenquimales adultos.

**El modelo de desdiferenciación a rediferenciación** proporciona una visión alternativa de la transdiferenciación condro-osteogénica. En este modelo, los condrocitos se hipertrofian y continúan hacia la apoptosis o se desdiferencian primero en condrocitos inmaduros, y luego se diferencian en osteoblastos y más tarde en osteocitos (Figura 5, B). Se ha descrito que este modelo ocurre durante el desarrollo embrionario y postnatal (Zhou X. y cols., 2014; Park y cols., 2015), pero también durante la reparación de fracturas (Yang G. y cols., 2014 ; Yang L. y cols., 2014; Hu y cols., 2017).

Finalmente, está **el modelo de transdiferenciación directa** el cual algunos estudios han sugerido como el método por el cual se produce la osificación secundaria postnatal. El modelo de transdiferenciación directa indica que los condrocitos madurarán y se hipertrofiarán, pero no se apoptosarán, sino que se diferencian directamente en osteoblastos y posteriormente en osteocitos (Figura 5, C). Este proceso se inicia antes de que la invasión vascular alcance la región de osificación secundaria. Además, no se observa aumento de la proliferación o apoptosis en los condrocitos hipertróficos epifisarios. En base a hallazgos *in vitro* e *in vivo* (Xing y cols., 2014; Jing y cols., 2015) de que los condrocitos hipertróficos expresan marcadores de osteoblastos, el modelo de transdiferenciación directa también sugiere que “condrocitos hipertróficos” puede ser un nombre inapropiado, y que de hecho son pre-osteoblastos, además este modelo de transdiferenciación directa vendría siendo el mecanismo más probable para la formación de osteoblastos epifisarios, ya que el proceso de desdiferenciación y rediferenciación no ocurriría lo suficientemente rápido en el lapso de tiempo en que el hueso aparece

inmediatamente después de la formación de los condrocitos hipertróficos en la epífisis (Xing y cols., 2014)

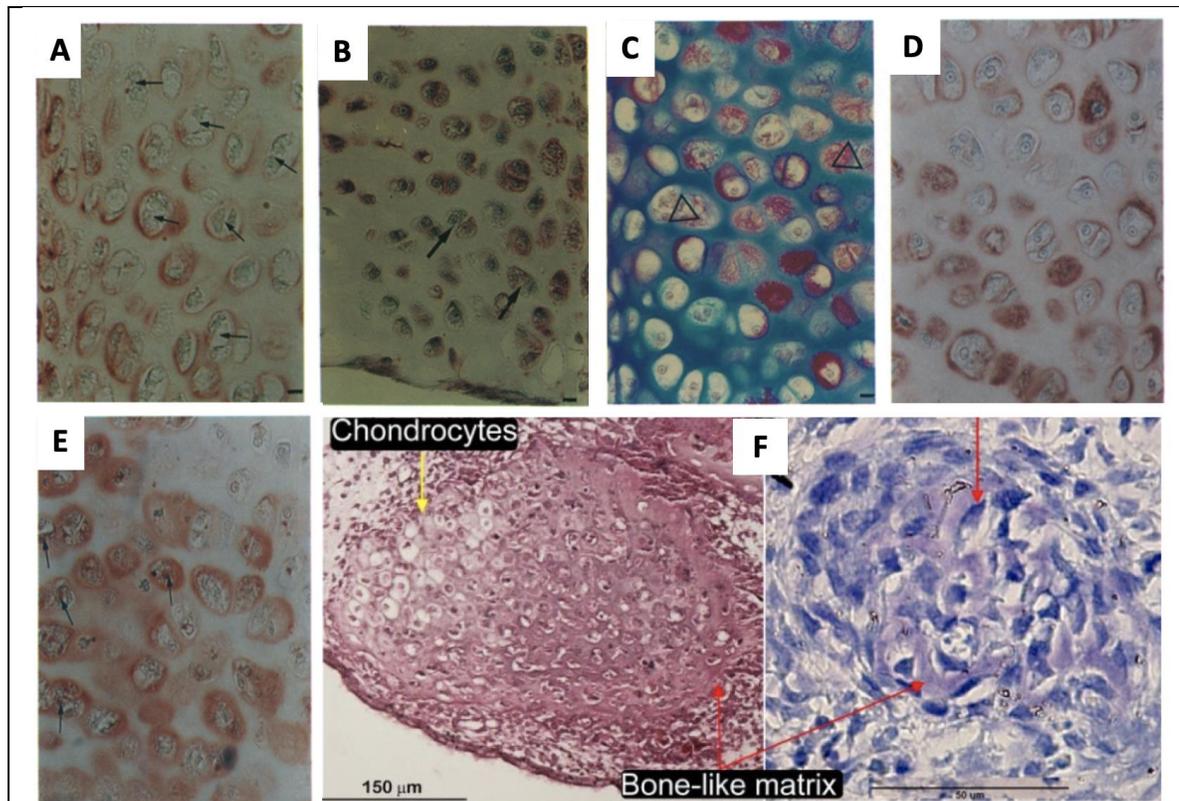
La transdiferenciación directa no es exclusiva de la osificación secundaria, ya que probablemente también se produce durante la osificación primaria, así como durante la curación de la fractura. Algunos estudios han mostrado que, para la osificación de la base del cráneo, no solo estaría involucrada la vía canónica de osificación endocondral, sino varios modelos de osificación abriendo camino a nuevos enfoques para la estimulación de formación de tejido óseo (Hinton y cols., 2017; Sakagami y cols., 2017).

La posibilidad de que los condrocitos hipertróficos (CH) diferenciados terminalmente pudieran sobrevivir y convertirse en osteoblastos *in vivo* se había debatido durante más de un siglo. El apoyo proviene de estudios autoradiográficos, morfológicos y ultraestructurales, en los que se observaron CH en la unión condro-ósea y osteoblastos en lagunas de condrocitos (Farnum y cols., 1990; Roach, 1992; Roach y cols., 1995; Riminucci y cols., 1998).

La evidencia autorradiográfica con timidina trisiada había mostrado que los condrocitos podían sobrevivir a la hipertrofia (Nogami & Urist, 1975) y que no todos los condrocitos de una placa epifisaria experimentaban hipertrofia, mostrando que algunos condrocitos dentro de sus lagunas originales retomaban la capacidad de dividirse, observándose dobletes o tripletes de células basófilas pequeñas dentro de las lagunas en lugar de condrocitos hipertróficos únicos (Figura 6, F). Eran además positivas para fibronectina y secretaban una nueva matriz la cual tenía características tintoriales de matriz ósea incluyendo birrefringencia al teñirse con rojo sirio y la capacidad para mineralizarse (Kahn & Simmons, 1977). Otros estudios confirmaron que condrocitos hipertróficos dentro de las lagunas, de este cartílago en proceso de osificación, tenían características de osteoblastos, tales como la actividad fosfatasa alcalina y tinción inmuno positiva para osteocalcina, osteonectina, osteopontina y colágeno de tipo I y ninguna evidencia de migración celular había sido observada (Figura 6, B-D). Posteriormente esa matriz ósea, inicialmente confinada sólo al interior de las lagunas de condrocitos, se observaba expandida más allá de los confines de la laguna, perdiendo además el marcaje positivo a fibronectina en estas células. Esta nueva matriz fue llamada "osteoides intralacunar", teñida vívidamente con rojo Sirius y fucsina ácida de Van Gieson, pero

no con azul alción específico de cartílago y mostró además un patrón de mineralización diferente al de la matriz típica de cartílago calcificado fuera de la laguna. Otra evidencia fue el marcaje diferente observado para la localización de la actividad de la fosfatasa alcalina, mostrando que en los condrocitos hipertróficos comunes la actividad enzimática se localizaba en la matriz extracelular perilacunar en contraste con la presencia intralacunar alrededor de estas células que se transdiferenciaban a osteoblastos (Figura 6, B). Varios estudios habían demostrado que, mediante la producción de factores reguladores, los CH instruyen a las células pericondriales adyacentes para que se diferencien en osteoblastos, es decir que los condrocitos que se enfrentan a los tejidos pericondriales están contenidos dentro de un microambiente que promueve la osteogénesis. Por el contrario, los CH ubicados en la porción central del cartílago se encuentran en un ambiente separado el cual sería regulado por señales aún no bien clarificadas que lo pondrían en un estado “metaestable” el cual lo llevaría en diferentes vías de diferenciación: divisiones simétricas o asimétricas que conducirían a las células hijas a una transdiferenciación a osteoblastos o a apoptosis (Roach y cols., 1995; Shapiro y cols., 2005).

En el 2014, mediante análisis de rastreo de linajes usando animales transgénicos con variadas ventanas de inducción, algunos autores lograron demostrar que los CH pueden sobrevivir a la transición de cartílago a hueso y convertirse en osteoblastos y osteocitos durante la formación de hueso endocondral en la placa de crecimiento y en la reparación ósea, proporcionando así una nueva fuente potente de osteoblastos durante el crecimiento óseo (Yang L. y cols., 2014; Yang G. y cols., 2014). También mostraron que los CH pueden adoptar destinos de células perivasculares y adipocitos además del destino osteogénico (Yang G. y cols., 2014) y dado que la osificación endocondral es necesaria para la formación de nichos de células madre hematopoyéticas (Chan y cols., 2009), la progenie de condrocitos podría no solo beneficiar la formación ósea sino también apoyar la hematopoyesis. Un resultado importante de todos estos estudios ha sido la creciente conciencia de que el microambiente tisular local juega un papel clave en la regulación de las actividades celulares y la función tisular (Shapiro y cols., 2005).



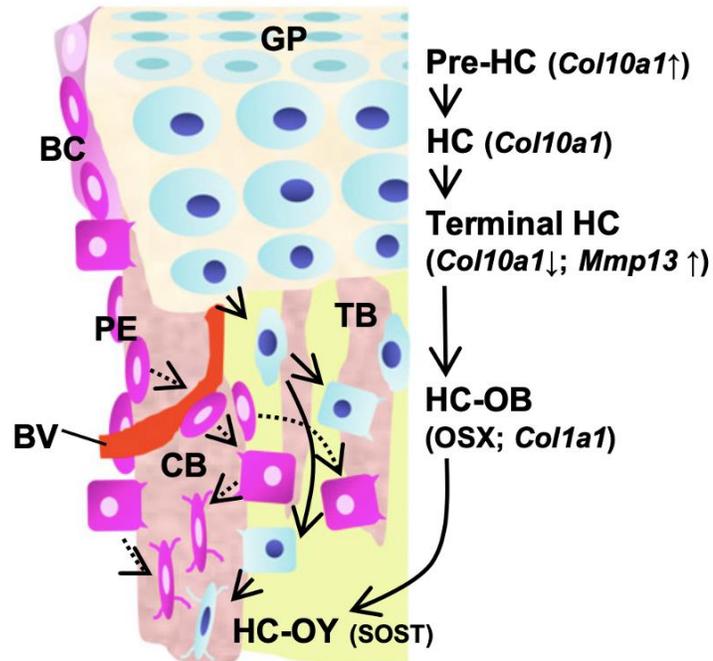
**Figura 6.** De **A-D**: Eventos celulares durante la diferenciación osteogénica de los condrocitos de fémures después de varios períodos de cultivo. (Barras, 10  $\mu$ m) (Tomada y modificada de Roach y cols., 1995). **A**) Colágeno tipo I alrededor de los condrocitos. Todas las lagunas contienen una capa de colágeno tipo I alrededor del perímetro interior, que a veces se extiende a la matriz interterritorial. Muchas lagunas contienen dobletes de células (flechas). **B**) Actividad de la fosfatasa alcalina en condrocitos. La mayoría de los condrocitos muestran actividad enzimática en el citoplasma. Nuevamente, hay muchos dobletes celulares presentes, en dos de estos dobletes la actividad enzimática se encuentra solo en una célula (flechas). **C**) Evidencia del fenotipo osteogénico, la matriz osteoide (roja) está presente dentro de las lagunas condrocíticas en periodos posteriores de desarrollo. La mayoría de las lagunas están todavía intactas y completamente rodeadas por una matriz de cartílago (azul), pero se muestran dos ejemplos donde dos lagunas se han fusionado (triángulos). Estos no están conectados a un canal. **D**) Colágeno de tipo I y **E**) osteopontina dentro o alrededor de las lagunas condrocíticas confirmando que la matriz osteoide contiene colágeno tipo I y osteopontina, esta última en preparación para la mineralización. En algunas células (flechas), la osteopontina todavía está presente en el citoplasma, pero en su mayoría ya está presente en la matriz extracelular. **F**) Condrocitos del cartílago condilar de ratón se transforman en células parecidas a osteoblastos en un cultivo de membrana corioalantoidea (CAM). Las imágenes teñidas con H&E y azul de toluidina revelaron que la matriz con forma de hueso y células similares a osteoblastos (Ob) eran evidentes. (Tomada de Jing y copls., 2015)

**En el caso de una lesión ósea**, se instaura un proceso reparativo, que en cierta forma remeda los procesos de osificación primaria. Después de ocurrida la lesión, se genera un coagulo y la infiltración de células inflamatorias, las que secretan citoquinas y factores de crecimiento importantes para la neovascularización (Street y cols., 2002) y el reclutamiento celular (Gerstenfeld y cols., 2003). Dependiendo del grado de vascularización y de los movimientos del sitio de la lesión, el tejido óseo se formará directamente (osificación membranosa) cuando la movilidad en el sitio lesionado es casi nula, por ejemplo, en el alvéolo post exodoncia. Sin embargo, lograr inmovilización casi total de huesos largos lesionados es muy poco probable, de modo que una gran parte de la neoformación ósea en procesos reparativos óseos se produce de manera indirecta, por osificación endocondral (Schindeler y cols., 2008). Durante una lesión ósea, existen focos de tejido cartilaginoso, que se generan sin establecer un patrón espacial en la lesión, para luego ser reemplazados por trabéculas óseas (Smok y cols., 2014). Algunos estudios de rastreo de linajes para condrocitos hipertróficos, plantearon un modelo para la ontogenia de osteoblastos en hueso endocondral (Figura 7) (Yang L. y cols., 2014). Los osteoblastos y osteocitos derivados de CH contribuyen a la reparación ósea y al concepto revisado de ontogenia de osteoblastos en hueso endocondral. Las fuentes de osteoblastos serían: 1) la diferenciación directa de las células mesenquimales periósticas para formar hueso cortical, 2) los progenitores de osteoblastos derivados del pericondrio que acompañan a la invasión vascular del centro de osificación primaria y 3) la transición de CH a linajes de osteoblastos.

Habitualmente, la dinámica reparativa del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, en pérdidas mayores de tejido óseo se hace necesario desarrollar diferentes sistemas para la reparación pues el organismo no es capaz de reparar en forma autónoma (Leyendecker Junior y cols., 2018).

Para el estudio de la reparación ósea, se creó el concepto de "defecto de tamaño crítico" (DTC), el cual es un modelo animal que se desarrolló originalmente para estandarizar las pruebas de materiales de reparación ósea. Los DTC fueron originalmente definidos como "la herida intraósea de tamaño más pequeño en un hueso y especies de animales en particular, que no reparan espontáneamente durante la vida del animal" (Schmitz y Hollinger, 1986).

Este tipo de modelo ha sido de gran utilidad en el estudio de medicina regenerativa e ingeniería tisular, para la evaluación de propiedades de regeneración y reparación de tejido óseo.



**Figura 7. Modelo para la ontogenia de osteoblastos en hueso endocondral.** Las fuentes de osteoblastos son la diferenciación directa de las células mesenquimales periósticas para formar hueso cortical (CB), los progenitores de osteoblastos derivados del pericondrio que acompañan a la invasión vascular del centro de osificación primario (POC) y la transición de CH a linajes de osteoblastos. BC, collar de hueso; BV, vaso sanguíneo; GP, placa de crecimiento; OB, osteoblasto; OY, osteocito; PE, periostio; TB, hueso trabecular (Tomado de Yang L y cols., 2014).

### **3.3 *MEDICINA REGENERATIVA E INGENIERIA TISULAR***

La medicina regenerativa provee nuevas terapias para reemplazar o restaurar función en cualquier tejido u órgano del cuerpo humano. Esta rama de la ciencia médica nace con el objetivo de superar los obstáculos presentes en las terapias actuales de trasplantes de órganos y tejidos para tratar la falla o pérdida de éstos, ya que existe un número limitado de donantes y, a menudo, complicaciones inmunes graves con este tipo de tratamiento, los cuales se pretenden dejar de lado con esta ciencia (Terzic y Nelson, 2013). La medicina regenerativa incorpora, además, campos como la ingeniería tisular, transferencia nuclear, estudio de diferentes biomateriales y el uso de células progenitoras.

La ingeniería tisular, uno de los componentes del campo de la medicina regenerativa, fue definida hace más de 25 años como "Un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de los tejidos" (Langer y Vacanti, 1993), esta definición ha ido evolucionando e incluyendo conceptos que se relacionan con la creación de nuevas tecnologías atingentes a nuestra época. Se trata de una ciencia que utiliza células, un elemento que las transporta o "carrier" con función de andamiaje y una serie de diferentes factores bioquímicos que propician la formación de tejido. Este constructo puede ser implantado, para finalmente mejorar o reemplazar funciones biológicas, esto, con el objetivo de dar solución a la capacidad limitada de regeneración del cuerpo humano (Akter, 2016; Griffith y Naughton, 2002).

Los carriers o andamios están hechos de materiales compatibles tanto con los tipos de células específicas de los tejidos como con el entorno local deseado dentro del cuerpo humano (Langer, 2009), deben tener estabilidad química, función de adhesión y degradación controlada (Hashemi-Beni y cols., 2017). Estos materiales pueden ser naturales como colágeno o componentes de la matriz extracelular (MEC) descelularizados; o sintéticos biocompatibles. El objetivo de estos carriers es de suplir el entorno tridimensional natural, para que las células puedan proliferar y organizarse en tejidos u órganos manteniendo sus configuraciones especializadas y sus morfologías (Shafiee y Atala, 2017).

Los factores bioquímicos se presentan como factores de crecimiento o de diferenciación para facilitar y promover la proliferación y diferenciación celular, favoreciendo la formación de los elementos de la MEC y moléculas de señalización para la reparación de tejidos dañados, particularmente mediante regeneración de nuevos tejidos, es decir, controlan y modulan respuestas celulares, optimizando así los procesos de ingeniería tisular (Subbiah & Guldberg, 2019).

Las células que se utilizan en las actividades de ingeniería tisular deben tener la capacidad de sintetizar matriz extracelular que luego, junto con las células del huésped, formarán un tejido metabólicamente activo. Estas células pueden ser clasificadas según su origen como autólogas (células propias del huésped), alogénicas (células de individuos de la misma especie) o xenogénicas (de individuos de otra especie). La atención de la ingeniería tisular se ha centrado en el uso de células madre, que son categorizadas según su potencial de diferenciación (Akter, 2016).

### **3.4 CÉLULAS MADRE**

Las células madre o stem cells se definen como células indiferenciadas capaces de proliferar, autorrenovarse y diferenciarse en tipos de células especializadas bajo condiciones específicas (Arias & Felmer, 2009). Las células madre controlan el reabastecimiento de varios tipos de células que ayudan a constituir muchos sistemas de órganos diferentes, lo que permite a los científicos la oportunidad de generar células específicas para recuperar las funciones perdidas en varios estados de enfermedad. Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en:

- i. Totipotentes: Capaces de diferenciarse en tejidos embrionarios, así como extra-embrionarios (Edwards & Beard, 1997). Esta puede generar un organismo vivo completamente funcional.
- ii. Pluripotentes: dan origen a todas las células de todos los tejidos de las tres capas germinativas, a excepción de anexos embrionarios (Beddington, 1981).
- iii. Multipotentes: dan origen a células de un linaje específico (misma capa germinativa).

- iv. Oligopotentes: muy similares a las multipotentes, pero son más restringidas en cuanto a su capacidad de diferenciación. Aunque estas células pueden auto-renovarse y diferenciarse, sólo están limitadas a tipos de células estrechamente relacionadas de una misma capa germinativa.
- v. Unipotentes: capaces de diferenciarse en un solo tipo celular de una capa germinativa.

### 3.4.1 Células Madre Mesenquimales

Un tipo de células multipotentes son las células madre mesenquimales (MSCs), las cuales derivan del mesénquima del embrión. Estas células fueron descubiertas en un inicio en ratón y se caracterizan por ser capaces de adherirse al plástico y formar colonias con gran potencial de diferenciación en líneas fibroblásticas, adiposas, condrogénicas y osteogénicas (Friedenstein y cols., 1970). Más tarde fueron descritas sus equivalentes en humano y su capacidad de diferenciación en distintos tejidos de origen mesodérmico (Pittenger y cols., 1999).

Una de las grandes ventajas de las MSCs en el ámbito terapéutico, es que tienen propiedades de evasión inmune, ya que no muestran marcadores de superficie de células del complejo de histocompatibilidad (MHC) clase II, lo que resalta su falta de respuesta inmune durante el uso alogénico (Le Blanc y cols., 2003; Ankrum y cols., 2014). Además, presentan propiedades inmunosupresoras al secretar factores inmunosupresores como el óxido nítrico (NO) (Sato y cols., 2007).

Sin embargo, las MSCs presentan ciertas limitaciones. Los estudios han demostrado que, con el tiempo, las MSCs eventualmente se vuelven senescentes y pierden irreversiblemente su capacidad de dividirse (Bonab y cols., 2006).

*In vitro* estas células son capaces de autorenovarse, formar colonias y clásicamente diferenciarse en distintos programas celulares: perfil osteogénico, condrogénico y adipogénico (Friedenstein y cols., 1970; Pittenger y cols., 1999). Además se ha reportado la diferenciación hacia un programa miogénico (Wakitani y cols, 1995), tendinogénico e incluso neurogénico (Woodbury y cols., 2000)

Utilizando modelos *in vivo*, estas células han sido capaces de reparar tendones en modelos de conejo (Awad y cols., 1999), tener participación en la reparación de lesiones de médula espinal en modelos de ratón (Hofstetter y cols.,

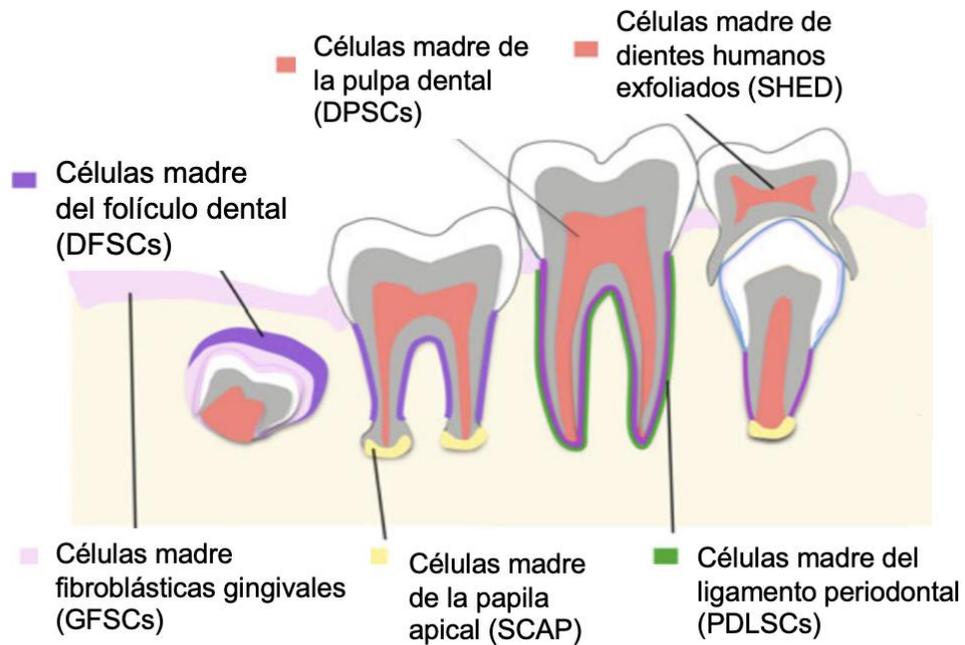
2002) y de formar tejido cartilaginoso (Pereira y cols., 1995) y óseo (Kuznetsov y cols., 1997) en ratones irradiados.

Las fuentes descritas de obtención de las MSC son variadas, se pueden mencionar: las células de médula ósea, que han sido las más caracterizadas (Wagers & Weissman, 2004), las células de tejido adiposo (Zuk y cols., 2002), de placenta (Anker y cols., 2004), de piel (dermis, hipodermis) (Shin y cols., 2006), de sangre de cordón umbilical (Erices y cols., 2000) y de la pulpa dentaria (Gronthos y cols., 2000).

### **3.4.2 Células Madre Dentales**

En los últimos 10 años se han caracterizado un sin número de células madre y en relación a los órganos dentarios se han obtenido células madre adultas mesénquimales multipotentes, cuyo singular origen embrionario en las células de la cresta neural (células ecto-mesénquimales), les ha dado la potencialidad de diferenciación en variados tipos de células de origen mesenquimático y además neuroectodermico (Gronthos y cols., 2000 ; Morsczeck & Reichert, 2018) (Figura 8).

De acuerdo a su origen y localización, las células del órgano dentario se han clasificado en células madre del ligamento periodontal (Silvério y cols., 2010), células madre de la papila apical (Morsczeck y cols., 2005), células madre del folículo dental (IDPSCs, immature dental pulp stem cells) (Morsczeck y cols., 2005), células madre de la pulpa de dientes temporales (DTSC, Deciduous Teeth Stem Cell) (Kerkis & Caplan, 2012) o células madre de la pulpa de dientes temporales exfoliados (SHED, Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) (Miura y cols., 2003) y células madre de la pulpa de dientes definitivos (DPSC, Dental Pulp Stem Cells) (Gronthos y cols., 2000).



**Figura 8. Fuentes de células madre en el dominio odontológico.** (Imagen adaptada de Sharpe, 2016)

#### 3.4.2.1 Células madre de la pulpa dental

Las células madre más estudiadas del órgano dentario son las de la pulpa dental. La pulpa es un tejido conectivo mesenquimático rico en vasos sanguíneos y nervios con una organización celular y matricial bien particular. Tiene un papel central en el desarrollo dental primario y secundario y en su mantenimiento continuo, por ejemplo, en reacción defensiva frente a caries (Luo y cols., 2018). Como tejido mesenquimático posee una alta concentración de células mesenquimáticas multipotentes con características “stem”, conocidas como células madre de la pulpa dentaria humana o *human dental Pulp stem cells* (hDPSCs). Estas se presentan como una potencial fuente autóloga de células madre derivadas de la cresta neural. Las poblaciones progenitoras odontogénicas de la pulpa dental adulta humana fueron por primera vez aisladas el año 2000 por Gronthos y cols. (Gronthos y cols., 2000) siendo uno de los mayores avances de la investigación odontológica.

Dentro de sus ventajas se encuentra su fácil acceso en comparación a las células de la médula ósea, ser de fácil manipulación, facilidad de crioconservación sin perder su potencialidad y la capacidad de ser cultivadas en ausencia de suero

(Caplan y Correa, 2011). Su capacidad de autorrenovación *in vivo* fue demostrada por Gronthos y cols., el año 2002 al aislar y cultivar hDPSCs y trasplantarlas en ratones inmunocomprometidos (Gronthos y cols., 2002).

Algunas características de estas células, es que se localizan de manera perivascular en el órgano pulpar y expresan muchos de los marcadores de células madre mesenquimales como CD105, CD146, CD44 y Stro-1 (Huang y cols., 2009), por lo que son consideradas como tales. Las células mesenquimales provenientes de tejido pulpar se caracterizan además, por poseer morfología tipo fibroblasto y tener capacidad de diferenciación *in vitro* en múltiples linajes tales como tejido neuronal (Arthur y cols., 2008), endotelial (d'Aquino y cols., 2007), condrocitario (Iohara y cols., 2006), adipocitario y odonto/ osteogénico (Gronthos y cols., 2000).

*In vivo*, las DPSC pueden diferenciarse en células secretoras de dentina (Células tipo odontoblasto) con una estructura muy similar al tejido fisiológico (Cordeiro y cols., 2008). En modelos murinos, los estudios muestran que las DPSC mejoran la recuperación de un infarto agudo al miocardio, cuando ellas son inyectadas en la periferia del tejido afectado (Gandia y cols., 2008) o mejoran la regeneración de una lesión cerebral isquémica, cuando son inyectadas en el hemisferio afectado (Sugiyama y cols., 2011; Yamagata y cols., 2013). Un efecto similar es observado cuando las DPSC son inyectadas en la periferia de una lesión de médula espinal y el animal recupera sus funciones motoras (Sakai y cols., 2012).

En cuanto a tejidos duros, algunos autores han demostrado que pueden contribuir a la formación de hueso cuando son implantadas en una lesión craneana de ratón (Seo y cols., 2008). En algunos ensayos clínicos, la implantación de DPSC en defectos mandibulares, ha favorecido una mejor y rápida reparación, en comparación a defectos sin células (d'Aquino y cols., 2009; Giuliani y cols., 2013). Sin embargo, poca o nula ha sido la caracterización del proceso reparativo generado por estas células pulpares en estos defectos craneales, la presencia de diferentes tejidos en el sitio reparativo y su expresión espacio-temporal.

Algunos resultados del proceso reparativo en modelo de defecto crítico de calota de ratón, implantado con hDPSCs, instaurado en nuestro grupo de investigación ha mostrado la presencia de un tejido tipo cartílago en diferentes periodos de observación. Es debido a esto que la propuesta de este trabajo de investigación es caracterizar este tipo de tejido cartilaginoso e identificar el linaje de

especie del tejido cartilaginoso presente en el defecto crítico de calota de ratón, comprendiendo de esta forma su origen, patrón de crecimiento y desarrollo.

Antes de continuar con la metodología se explicarán las características del modelo animal utilizado.

### **3.5 *MODELO ANIMAL DE DEFECTO CRITICO***

Como se mencionó previamente, para el estudio de regeneración ósea ha sido ampliamente utilizado el modelo de defecto de tamaño crítico óseo en animales, el cual no repara espontáneamente durante la vida del animal, a no ser que algún material con propiedades osteogénicas, osteoconductoras u osteoinductivas sea situado en él (Bosch y cols., 1998).

En un defecto mínimo el hueso comienza a extenderse y a formarse desde los bordes de la lesión hacia el centro, hasta cerrar el orificio; este hueso irá madurando lentamente sufriendo un modelaje hasta constituir un hueso laminar maduro el cual puede continuar los procesos de remodelado fisiológico. En un defecto crítico en cambio, la formación ósea sólo ocurre en la periferia, pero no se cierra nunca completamente (Fernández y cols., 2006).

Los tipos de análisis que se pueden realizar en este modelo son sumamente amplios destacándose aquellos principalmente asociados con la evaluación de la neoformación de tejido óseo tanto imagenológicos e histológicos, y además aquellos destinados a evaluar el origen en cuanto a especie del tejido formado usando técnicas inmunohistoquímicas (Gao y cols., 2018), lo cual se aplica directamente en nuestro caso al presentarse una implantación de hDPSCs en un modelo animal.

En este estudio se ha elegido el modelo de ratón ya que son más económicos, fáciles de albergar y provocan menor preocupación social, que los modelos animales de mayor tamaño como ovejas y perros. Específicamente, el modelo de ratón *Mus musculus* NOD/SCID (Severed Combined Immuno Deficient), ya que permite injertar células y tejido humano sin que se produzca rechazo por parte del hospedero (The Jackson Laboratory, 2020), y en particular el modelo de defecto crítico de calota, debido a presentar su origen embrionario del mismo territorio maxilo facial.

La utilización de ratones cepa NOD/SCID responde a una cepa bien conocida y caracterizada en el dominio de las células madre. Estos ratones se caracterizan por una deficiencia inmune inducida genéticamente, homocigotos para la mutación del gen *Prkdc-scid* (comúnmente conocido como *SCID*), convirtiéndose en modelos ideales para investigación de transferencia celular e ingeniería tisular; por otra parte, estudios recientes han descrito que al ser deficientes de células B y células T no desarrollan diabetes autoinmune, por lo que son claves en la investigación del desarrollo de esta patología (The Jackson Laboratory, 2020). Además, los mecanismos moleculares y celulares son, en un porcentaje importante, compartidos y equivalentes entre humanos y ratones en el territorio maxilofacial. Por otra parte, esta cepa permite la implantación de células humanas sin generar rechazo al implante debido a la modificación en el sistema inmunitario eliminando el rechazo de células humanas (Courtot y cols., 2014). Por lo tanto, sería posible evaluar el rol que las células progenitoras humanas adoptan en los procesos de regeneración.

## **4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 HIPÓTESIS**

El proceso de reparación tisular de un defecto crítico de calota de ratón inducido por DPSC humanas (hDPSCs) forma un tejido cartilaginoso de linaje humano, a los 30 y 90 días post implantación.

### **4.2 OBJETIVO GENERAL**

Constatar la presencia de tejido cartilaginoso en un defecto crítico de calota de ratón a 30 y 90 días después de implantación de hDPSCs y verificar su potencial origen humano.

### **4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Describir la presencia y ubicación de tejido cartilaginoso al interior del defecto crítico de calota de ratón a los 30 y 90 días de implantado el constructo con hDPSCs, mediante análisis histológico.
2. Caracterizar el estado de madurez histomorfológica del cartílago hallado en el área del defecto crítico a los 30 y 90 días de implantado el constructo.
3. Determinar mediante inmunohistoquímica el origen de la especie de las células que generaron el cartílago observable en los cortes histológicos.

## **5 METODOLOGÍA.**

### **5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio experimental en ratones de laboratorio enmarcado en el Proyecto PAI N° 79160076, titulado “Células madre aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales”. El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Bioseguridad, Campus Norte (Anexo 1).

En este trabajo en particular se trata de un estudio histomorfológico descriptivo del proceso reparativo y de los tejidos neoformados en defectos críticos con implantación de hDPSCs.

### **5.2 ANIMALES**

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación, Facultad de Odontología, Universidad de Chile (CICUA) (Anexo 2).

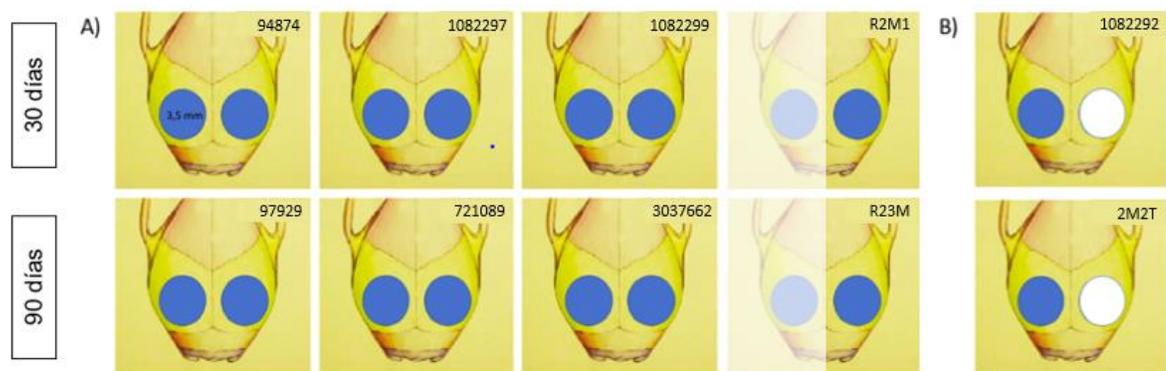
El grupo experimental estuvo compuesto por ratones NOD/SCID machos, de 8 a 10 semanas de edad, de peso mínimo 22 gramos. Estas características han sido clásicamente establecidas por varios equipos de investigación (Collignon y cols., 2019 ; Maraldi y cols., 2013) a manera de estandarizar las muestras, existiendo un potencial adecuado de reparación tisular y disminuyendo el efecto de variables externas que interfieran en los procesos de reparación, principalmente a nivel hormonal (Issa y cols., 2007)

Se efectuaron dos defectos críticos en la calota de cada animal a nivel de ambos huesos parietales (tal como se detallará más adelante). Cada defecto constituyó una unidad de estudio. En el grupo de defectos experimentales, se implantó un constructo tridimensional cargado con hDPSCs. En el grupo control (control negativo), no se implantó nada en concordancia con lo implementado previamente en estudios realizados en el laboratorio de Histomorfología del Departamento de Patología y Medicina Oral (Fernández, 2019).

Se operaron 10 animales: 8 ratones con 2 defectos críticos tratados con hDPSCs (16 defectos tratados con hDPSCs en total); y 2 ratones con 2 defectos críticos, con sólo un defecto tratado con hDPSCs y el otro sin constructo.

5 ratones (4 con ambos defectos tratados con hDPSCs y 1 con un defecto tratado y un defecto control) fueron eutanasiados a los 30 días después de implantados (9 defectos con hDPSCs y 1 defecto control) y 5 ratones con las mismas características, 90 días después de implantados (9 defectos con hDPSCs y 1 defecto control) (Figura 9).

Para los análisis histomorfológicos e inmunohistoquímicos (objetivos de este estudio), se analizó 8 defectos tratados con hDPSCs y 1 defecto control por tiempo de evaluación, 30 y 90 días, respectivamente. Los otros defectos serán evaluados en microscopía electrónica (objetivos de otro estudio).



**Figura 9. Esquema de defectos críticos en calota de ratón. A)** 8 animales con 2 defectos críticos tratados con hDPSCs, en transparencia aquellos defectos que no fueron utilizados para este estudio. **B)** 2 animales con 2 defectos críticos en donde solo uno está tratado con hDPSCs. En azul, defectos críticos tratados con hDPSCs. En blanco, defectos críticos sin tratar con hDPSCs.

### 5.3 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS (hDPSCs)

#### 5.3.1 Obtención de la pulpa dentaria de dientes humanos

Todos los procedimientos y protocolos fueron aprobados por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (CEC-FOUCH) (ver Anexo 3).

La pulpa dentaria se obtuvo de terceros molares de humanos sistémicamente sanos con edades entre 18 y 25 años, con indicación de exodoncia por ortodoncia o en forma profiláctica, sin caries. Los donantes fueron contactados desde las listas de pacientes agendados para exodoncia en la Clínica de Cirugía de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, con

autorización previa del cirujano maxilofacial tratante. Las muestras dentales se solicitaron a los donantes mediante un proceso de consentimiento informado (ver Anexo 4). Se incluyeron solo 2 pacientes en el estudio, extrayendo 2 terceros molares en cada uno de ellos y logrando un total de 4 dientes.

Los dientes recién extraídos fueron lavados y transportados, en un tubo cónico para centrífuga de 50mL (Falcon™) cargado con 5mL de solución RPMI 1640 + L-glutamina (Biological Industries™) en frío (4°C), al laboratorio de Histomorfología del Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (FOUCh) para su posterior procesamiento.

### **5.3.2 Extracción de la pulpa dentaria, obtención de células y preparación de constructos.**

#### *5.3.2.1 Obtención de cultivo primario*

La obtención del cultivo primario se hizo según lo implementado previamente en estudios realizados en el laboratorio de Histomorfología del Departamento de Patología y Medicina Oral, descrita en detalle en otra tesis de pregrado en curso (Fuentes E, 2021). Brevemente, las hDPSCs se obtuvieron por un mecanismo mecánico-enzimático. El diente se redujo obteniendo la pulpa cameral la cual fue disociada mecánicamente (mediante fraccionamiento con hoja de bisturí nº15) y luego por digestión enzimática (5mL de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco + 5µL de colagenasa (3mg/mL) + 34µL dispasa (2U/mL) y agitación constante durante 45 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción utilizando medio stop (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco + Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (HI FBS) 20%, Gibco), se centrifugó a 1000rpm durante 10 min a 25°C para recuperar las células, se retiró el sobrenadante y cuidadosamente se depositó el tejido pulpar en placas de 6 pocillos (Falcon®) tratadas previamente (Gelatina al 0,1% PBS a 37°C por 10 minutos), para finalmente cultivar en 2 dimensiones en 600 µL de medio inicial de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM (1X) + GlutaMAX™, Gibco + Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (HI FBS) 20%, Gibco + 1X de amoxicilina/estreptomicina/anfotericina-b + 1ng/ml de FGF-2) y ser incubado a 37°C en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>. Por cada uno de los 4 dientes extraídos se crearon 4 cultivos independientes.

### 5.3.2.2 *Obtención de cultivo secundario*

Aproximadamente 2-4 semanas posterior a la obtención del cultivo primario, se observó abundantes hDPSCs adheridas en la extensión del pocillo llegando a una confluencia del 80%. Se tripsinizó con 300µl de tripsina (TrypLE™ Express 1x, [-] phenol red (ref. 12504-021, Gibco) a 37°C durante 1 min. Posteriormente se aspiró la tripsina y las células fueron resuspendidas en 1mL de medio de cultivo secundario [DMEM (1x) + GlutaMAX™, suplementado con 10% de suero fetal bovino (HI FBS, Gibco); 1X de amoxicilina/estreptomicina/anfotericina-b; 1ng/ml de FGF-2. Luego, se distribuyeron las células en suspensión en placas de 6 pocillos tratadas previamente con gelatina al 0.1%. Con medio de cultivo secundario se completó hasta 800µl por pocillo. Se llevó a incubadora a 37°C en ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>, continuándose el cultivo hasta llegar a un 80% de confluencia. La población celular solamente llegó hasta el tercer pasaje (P=3) antes de su implantación.

### 5.3.2.3 *Preparación de constructos*

Para la elaboración de los constructos, se debió preparar matrices de ácido poliláctico (PDLLA) de 3.5 mm de diámetro. Luego se embebió en abundante OH- [70%] por aprox. 5 min. Con perforadora punch se presionó para obtener una matriz de 3.5 mm de diámetro y depositarla en placa individual con medio DMEM (1x) + GlutaMAX™ (Gibco).

Luego de obtener las matrices, se tripsinizó y resuspendieron células en tubo eppendorf con 1ml de medio de cultivo secundario. Se tomó 20 µl y realizó recuento estimativo de células utilizando cámara de Neubauer. Las células se centrifugaron a 1000rpm durante 10 min. A continuación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo secundario nuevo a razón de 150.000 células/10 µl de medio. Luego se cargó cada matriz con aproximadamente 150.000 células por constructo. Se llevó a la incubadora a 37°C y atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 45 min, para luego agregar 1ml de medio de cultivo secundario dejando incubar por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas, se procedió a lavar los constructos con 1ml de PBS 1x y se agregó 1 ml de medio de inducción osteogénica [DMEM (1x) + GlutaMAX™, suplementado con 10% de suero fetal bovino (HI FBS, Gibco); 1% de amoxicilina/estreptomicina/anfotericina-b; 20ul/ml de ácido ascórbico; 10ul/ml de

dexametasona; 10ul/ml B-glicerol-fosfato 100ul/10ml] y se incubó por 48 hrs. a 37°C en ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> para su posterior utilización.

Es importante recalcar que no se evaluó la influencia por sí sola del material de andamiaje, ya que sus propiedades han sido descritas previamente y es un material utilizado clásicamente en la práctica clínica, teniendo en cuenta además que el enfoque de este trabajo de investigación es caracterizar la presencia de tejido cartilaginoso en un contexto de regeneración utilizando hDPSCs (Zou y cols., 2019)

#### **5.4 IMPLANTACIÓN DE hDPSCs EN MODELO DE DEFECTO CRÍTICO DE CALOTA DE RATÓN**

##### **5.4.1 Cirugía de defectos óseos en calota de ratones adultos**

Las cirugías fueron efectuadas por la Dra. Soledad Acuña Mendoza en las dependencias del bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, según lo implementado previamente en estudios realizados en el laboratorio de Histomorfología del Departamento de Patología y Medicina Oral (Fernández, 2019). Se utilizaron ratones *Mus Musculus* NOD/SCID (Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency). Brevemente, los animales fueron anestesiados con inyección subcutánea de Ketamina/Xilacina 80mg/kg y 5 mg/kg respectivamente, luego se depiló y desinfectó la zona de la incisión, para posteriormente descubrir la calota del animal y realizar dos defectos críticos. Estos defectos tienen una medida de 3.5 mm, tal como se ha descrito previamente (Seo y cols., 2008) refrigerando en todo momento con suero fisiológico. Los constructos cargados con hDPSCs fueron implantadas en el defecto crítico, luego se aproximaron los bordes de las heridas y se suturó con vicryl (5-0) reabsorbible con punto simple.

Los materiales de andamiaje fueron cargados de forma individual con cultivos celulares independientes (constructo) e implantados al azar en los ratones.

#### **5.4.2 Cuidados post operatorios**

Inmediatamente después de la intervención, se aplicó una inyección subcutánea del analgésico Buprenorfina (0.1 mg/kg). Durante los tres primeros días post operatorios los animales recibieron paracetamol líquido (200 mg/kg) vía oral y control diario.

### **5.5 *OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A 30 Y 90 DÍAS PARA ANÁLISIS HISTOMORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS***

#### **5.5.1 Obtención de muestras y técnica histológica**

Los animales operados fueron eutanasiados mediante dislocación cervical bajo anestesia a los 30 días y 90 días. Estos tiempos quirúrgicos han sido utilizados clásicamente para evaluar reparación ósea, existiendo al mes la primera evidencia histológica de reparación ósea y a los 3 meses cierre del defecto crítico (Collignon y cols., 2018).

Los cráneos fueron disecados, liberados de sus tejidos blandos y fijados por inmersión en Formalina al 10% tamponada en PBS (pH 7,4), por 48 horas a 4°C en las dependencias del laboratorio de Histomorfología del Departamento de Patología y Medicina Oral, FOUCh. Las muestras fueron posteriormente desmineralizadas en una solución acuosa de EDTA al 10%, pH 7,4 usando microondas (Arana-Chavez y Nanci, 2001) e incluidas en parafina según protocolo del laboratorio de Histomorfología FOUCh (Anexo 5).

Con un micrótopo marca Reichert-Jung Mod 1130® se realizaron cortes histológicos seriados de 4 µm en el sentido sagital del cráneo de manera de obtener los dos defectos por corte.

#### **5.5.2 Técnica histoquímica e inmunohistoquímica**

Los cortes fueron colocados en un baño de flotación marca LipShaw® 38°C y fueron recogidos ya sea en portaobjetos convencionales para ser teñidos con Hematoxilina & Eosina (H&E), Azul alcían, el cual cuenta con una gran afinidad por los Glicosaminoglicanos abundantes en la matriz extracelular cartilaginosa y Safranina O (Anexo 6).

Otros cortes fueron recogidos en portaobjetos con carga positiva marca NewPath® para ser usados con la técnica de inmunohistoquímica (Anexo 7) para un marcador de cartílago como es el Colágeno tipo II COL2A1 humano (NBP1-26546, Novous Biologicals) dilución 1/250 µl en Background Blocker (Bio SB), para un marcador células mesenquimales, la vimentina humana (AF2105, R&D Systems) dilución 1/40 µl en Background Blocker (Bio SB) y para un marcador de células en la vía de diferenciación osteogénica, la Osteocalcina BGLAP humano (R&D Systems) dilución 1/100 µl en Background Blocker (Bio SB).

El control positivo recomendado para tejido cartilaginoso: Cortes de Hiperplasia condilar. El control positivo recomendado para anticuerpo de osteocalcina humana: Cortes de osteosarcoma.

Las vimentinas son filamentos intermedios de clase III que se encuentran en varias células no epiteliales, especialmente en las células mesenquimales (Danielsson y cols., 2018; Musaelyan y cols., 2018). La vimentina está adherida al núcleo, al retículo endoplásmico y a las mitocondrias, ya sea lateral o terminalmente. Se encuentran regularmente en fibroblastos, células névicas, células de Schwann, células musculares e histiocitos. En la base de datos Human Protein Atlas, se encontró que la proteína vimentina se expresaba en tejidos que incluían piel, pulmón, riñón, médula ósea y ganglio linfático, <https://www.proteinatlas.org/Células2E0N18S,G7,0x00FO00R0P26E0E2R5R-VEVIMIE/Wtissue> (Uhlén y cols., 2015) y se le ha considerado un buen marcador de células tumorales mesenquimales (Cavanzo, 1985). En este caso por ser un anticuerpo específico para humano fue utilizado como doble positivo, para verificar el posible origen humano del tejido cartilaginoso.

El colágeno II es específico del cartílago hialino y se encuentra en gran abundancia en este tejido permitiéndole formar agregados de proteoglicanos proporcionándole las características típicas de este tejido. Debido a esto, el colágeno II es ampliamente reconocido como un marcador específico de tejido cartilaginoso y de su desarrollo (Suzuki y cols., 2006), además la medición de la síntesis por parte de los condrocitos constituye un importante biomarcador de algunos procesos patológicos como osteoartritis (Garvican y cols., 2010).

La osteocalcina (Ocn) es una proteína ósea, rica en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, descrita como la proteína no colágena más abundante en la matriz extracelular del tejido óseo y como un factor expresado y secretado por los osteoblastos (Hauschka y cols., 1989) y también se ha descrito que en condrocitos en proceso de transdiferenciación expresan esta proteína (Roach, 1992). La Ocn se acumula en las líneas de inversión de la matriz completamente mineralizada (Derkx y cols., 1998) por lo que se la considera un excelente marcador de tejido óseo maduro y del recambio óseo particularmente en trastornos hormonales en adultos (Szulc, 2020). Los osteoblastos secretan esta proteína a la matriz durante la formación ósea y su presencia en la circulación sanguínea está correlacionada con el proceso de formación ósea (Staines y cols., 2012).

### **5.5.3 Análisis Histomorfométrico**

El tejido cartilaginoso fue identificado sobre microfotografías digitales a 10x, de los cortes teñidos con H&E y azul alcian, obtenidas usando una cámara digital Canon EOS Rebel-T3, montada para microscopio óptico Zeiss Axio Lab A1, con software EOS Utility para transferencia de imágenes.

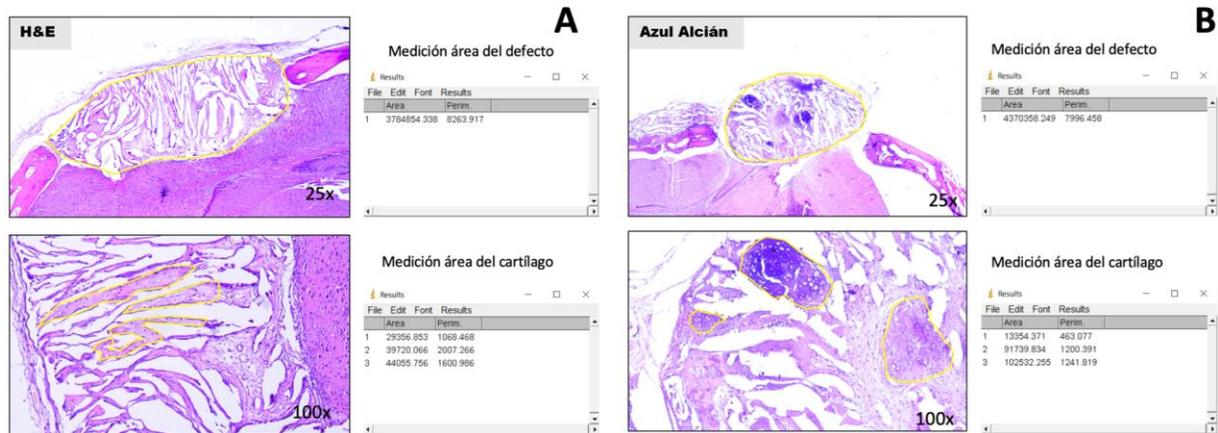
El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el programa de dominio público, multiplataforma ImageJ (web: <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) para Windows y MacOS.

Se analizó la superficie del defecto utilizando 6 cortes seriados separados de al menos 50  $\mu\text{m}$  por ratón, los cuales fueron elegidos al azar tanto para los 30 como para los 90 días y en donde cada imagen tuvo un código específico.

Se estableció la ubicación de los núcleos de cartílago en el área del defecto y se evaluó el estado de desarrollo de los islotes (Roach y cols., 1995).

Se realizó una calibración de las imágenes en el programa ImageJ usando imágenes de tamaño conocido a 2,5x y 10x. En una microfotografía a 2,5x se midió el área total del defecto en  $\mu\text{m}^2$  como se muestra en la Figura 5, A. Posteriormente en microfotografías a 10x se midieron las áreas de cada foco de cartílago en  $\mu\text{m}^2$  como se muestra en la Figura 5, B.

Un mismo observador calibrado realizó las mediciones en dos ocasiones con 3 semanas de intervalo. La concordancia intraobservador fue testada mediante el Coeficiente de Correlación Intraclase (ICC=0,9).



**Figura 10. Cuantificación y medición de área de cartilago usando Image J.** Esquema a modo de ejemplo para determinar la medición del área del defecto y las áreas de focos cartilaginosos **A)** tinción Hematoxilina Eosina. **B)** tinción Azul Alcian

## 5.6 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos fueron tabulados en Microsoft Excel y los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATA 12.0.

Para el análisis de los datos, las variables expresadas en frecuencias y porcentajes se analizaron estadísticamente mediante test de diferencia de proporciones. Para el análisis de las variables continuas (áreas de cartilago, proporción de áreas de cartilago etc.), se determinó su distribución de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk ( $p > 0.05$ ) y se comparó mediante test de Mann-Whitney a los 30 y 90 días.

## 6 RESULTADOS

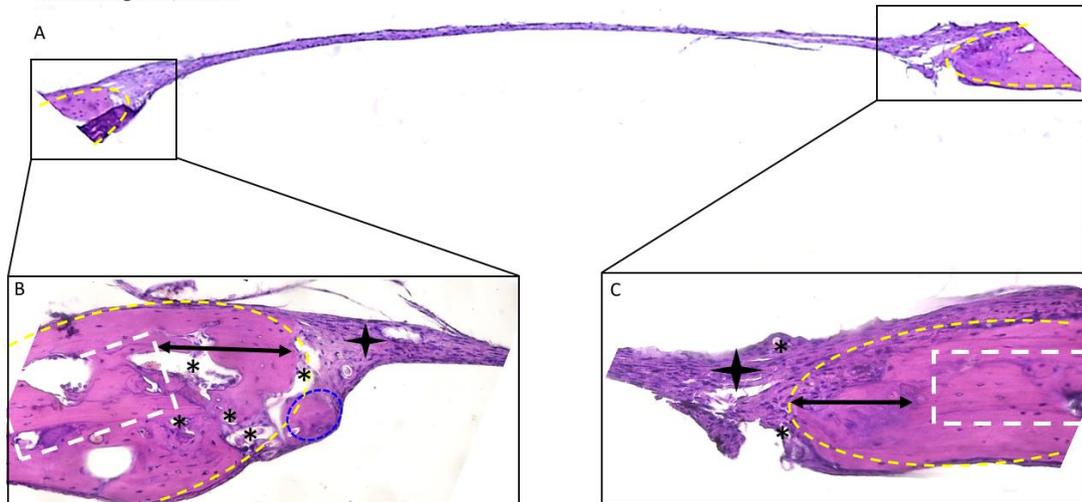
### 6.1 ***PRESENCIA Y UBICACIÓN DE TEJIDO CARTILAGINOSO EN DEFECTOS CRÍTICOS DE CALOTA DE RATÓN IMPLANTADO CON hDPSCs.***

#### 6.1.1 **Características generales**

Todos los ratones utilizados para este trabajo sanaron sin evidencia de infección u otras complicaciones, además fueron recuperados sin inconvenientes y en los tiempos determinados según lo descrito previamente para su análisis histomorfológico.

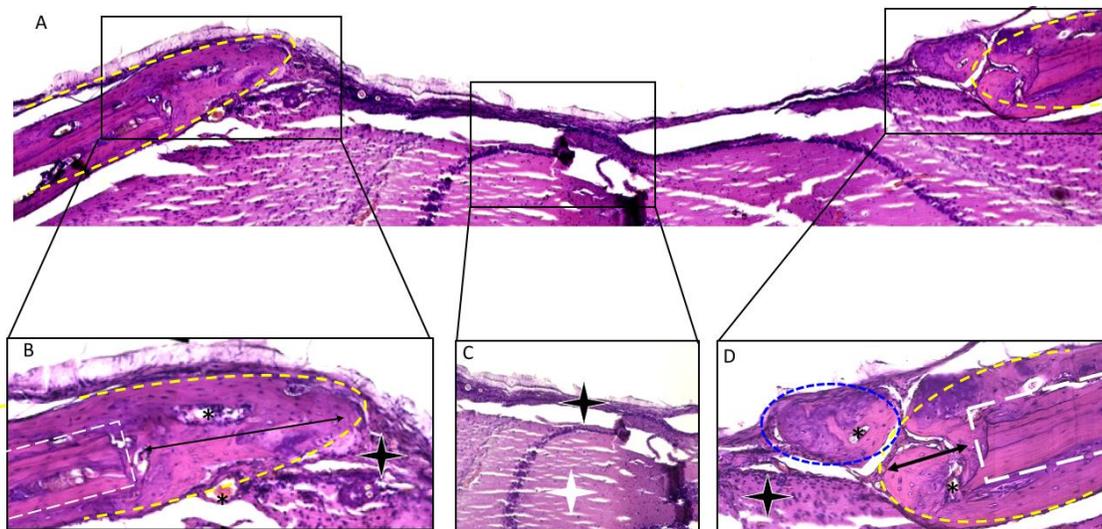
**En el grupo control sin material de andamiaje ni hDPSCs** (Fernández, 2019), a los 30 días se observó claramente la presencia de un amplio defecto en la calota (Figura 11, A). A mayor aumento en los cabos del defecto se distinguió el hueso laminillar nativo con osteonas, limitado por la línea de corte de la trefina (Figura 11, B y C: cuadrado de línea blanca punteada). Producto del proceso reparativo del ratón se observó apenas un tejido óseo neoformado con aspecto no laminillar (Figura 11, B y C: línea punteada amarilla), con algunos vasos de pequeño calibre. Entre los extremos de hueso inmaduro neoformado nativo se observó una extensión de un tejido fibroso, sin signos de organización osteoide y ningún tipo de formación de tejido cartilaginoso al interior o en los bordes del defecto (Figura 11, B y C: estrella negra). A los 90 días no se observaron grandes cambios, con la persistencia del tejido fibroso entre los cabos del defecto, pero hubo reducción del número de vasos observados en las cercanías del hueso nativo organizados en algunos sistemas de Havers (Figura 12, A, B y D). Al igual que a los 30 días, no se observó ningún tipo de formación cartilaginosa al interior o en los bordes del defecto.

Control Negativo/30 días



**Figura 11. Defecto crítico sin constructo a 30 días de la cirugía. Control negativo, H&E. Aumento 100X. A)** Observación panorámica del defecto crítico, en los extremos se muestran, delimitados por una línea punteada amarilla, los cabos del defecto con tejido óseo nativo y entre ambos interpuesto un tejido fibroso. **B)** Extremo izquierdo del defecto. El tejido óseo nativo (delimitado por un cuadrado blanco punteado), hueso neoformado (flecha negra) con algunos núcleos de mineralización (círculo azul), algunos vasos sanguíneos dispersos (asteriscos negros) y tejido fibroso (estrella negra). **C)** Cabo derecho del defecto presenta características similares al extremo izquierdo.

Control Negativo/90 días

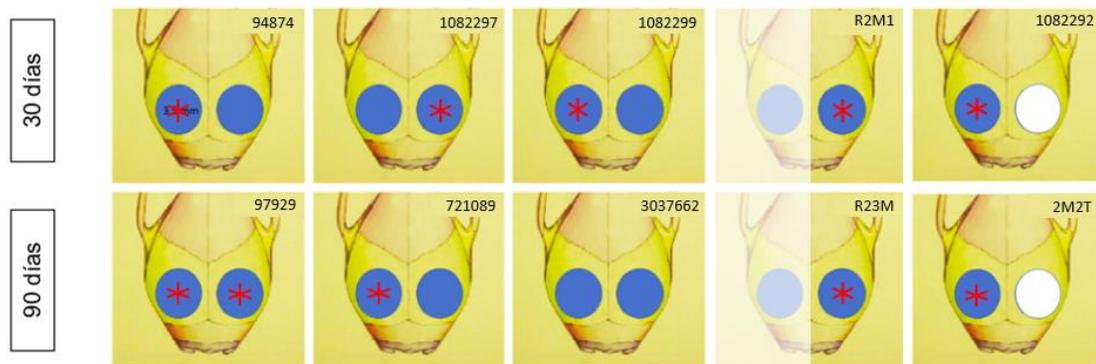


**Figura 12. Defecto crítico sin constructo a 90 días de la cirugía. Control negativo, H&E. Aumento 100X. A)** Observación panorámica del defecto crítico, en los extremos se muestran, delimitados por una línea punteada amarilla, los cabos del defecto con tejido óseo nativo y entre ambos interpuesto aún un tejido fibroso. **B)** Extremo izquierdo del defecto. Se observa el tejido óseo nativo (delimitado por un cuadrado blanco punteado), hueso neoformado (flecha negra) con algunos núcleos de mineralización (círculo azul), se observan menos vasos sanguíneos que a los 30 días, ordenados en sistemas de Havers (asteriscos negros) y tejido fibroso (estrella negra). **C)** Zona central del defecto con tejido nervioso encefálico (estrella blanca) y tejido fibroso que lo recubre (estrella negra). **D)** Cabo derecho del defecto presenta características similares al extremo izquierdo, aunque con menor cantidad de tejido óseo neoformado.

**En el grupo experimental**, todos los defectos cargados con material de andamiaje y hDPSCs mostraron la presencia de un tejido de apariencia trabecular que cerraba el defecto, en algunos de los cuales se observó tejido cartilaginoso, tanto a los 30 como a los 90 días (Figuras 14 y 15).

Los resultados generales sobre la detección de cartílago en el tejido que cerraba el defecto se muestran en la Figura 13 y en la tabla de Anexo 8.

De 16 defectos experimentales cortados y analizados en 10 ratones, 10 defectos mostraron tejido cartilaginoso (62,5%) correspondiente a al menos 1 defecto en cada ratón experimental. Sólo 1 ratón a los 90 días después del injerto no presentó cartílago en el tejido que cerraba el defecto, pero mostró un tejido óseo trabecular (Figura no mostrada).

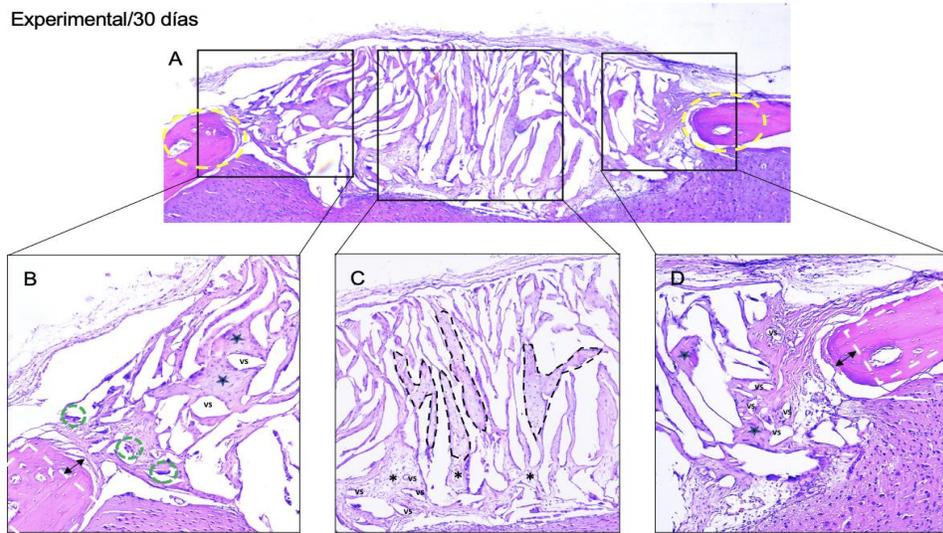


**Figura 13. Esquema representativo de la presencia de cartílago en defectos críticos.** Asterisco rojo: presencia de tejido cartilaginoso dentro del defecto. En azul: defectos críticos cargados con hDPSCs. En blanco: defectos críticos sin tratar.

**A los 30 días** se observó el hueso laminillar nativo limitado por la línea de corte de la trefina, similar a lo descrito en los defectos controles (Figura 14, B y D: cuadrado de línea blanca punteada); el cual se continuaba con un tejido óseo neoformado nativo mixto, laminillar y no laminillar (Figura 14, B y D: flecha negra). Hacia el centro, los defectos se mostraban cerrados mediante un tejido de diversas características histológicas. Al centro del defecto se observaron trabéculas con un tejido de morfología principalmente cartilaginosa (Figura 14, C: línea punteada negra; Figura 16, A), el cual se verificó mediante su afinidad histoquímica en los cortes teñidos con azul alcian y o-safranina (Figura 17, B y C), mostrando núcleos cartilaginosos de diferentes tamaños, algunos en continuidad con trabéculas de tejido de aspecto más fibroso (similar a una matriz provisional) con varios vasos

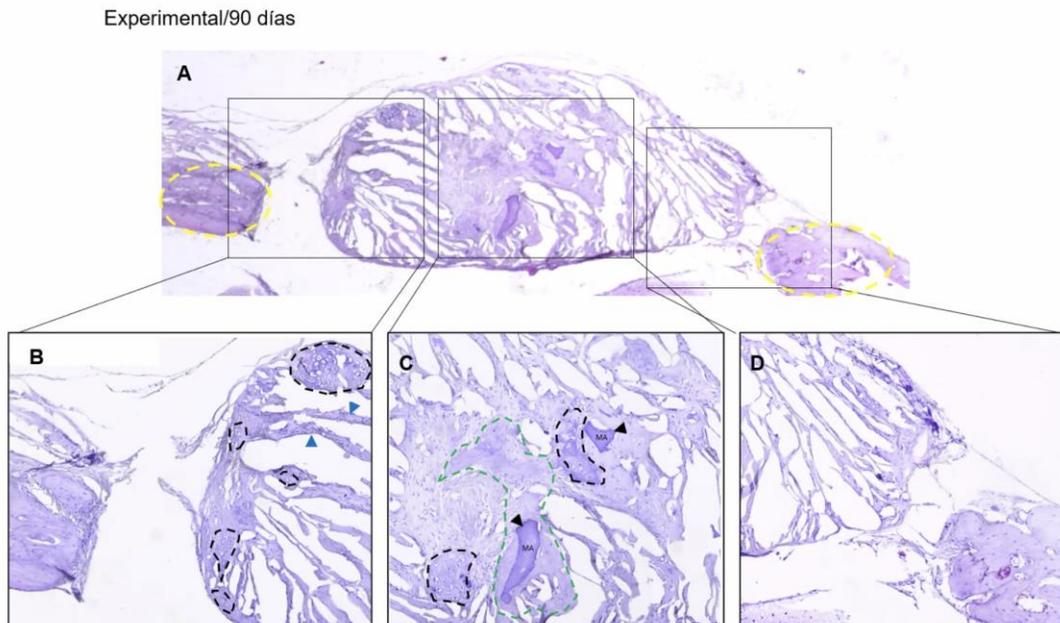
sanguíneos incluidos en su matriz (Figura 14, C: asteriscos negros; Figura 16, B). En algunos sectores más periféricos también se observaron trabéculas de aspecto osteoide, con osteocitos en sus lagunas, rodeadas por un tejido fibroso (matriz provisional) (Figura 14, B y D: estrellas negras; Figura 16, C y D).

**A los 90 días** todos los defectos cargados con material de andamiaje y células madre, mostraron la presencia de un tejido con trabéculas de apariencia mixta que cerraban el defecto (Figura 15, A), con tejido fibroso (Figura 16, E), cartilaginoso (Figura 16, F) y óseo (no laminillar y laminillar) (Figura 16, G y H). Hacia el centro del defecto las trabéculas se mostraron más anchas que a 30 días y constituidas de un tejido principalmente óseo laminillar y no laminillar (Figura 15, C; Figura 16, G y H). En algunas zonas las trabéculas de tipo osteoide mostraban un material bizarro de formas irregulares que eventualmente podría corresponder a restos del material de andamiaje que acompaña a las células implantadas (Figura 15, C: punta flecha negra, MA). Hacia la periferia las trabéculas se presentaron más finas y de un tejido de apariencia fibrosa (Figura 15, B: punta de flecha azules; Figura 16, E), pero se distinguieron más núcleos cartilaginosos en la periferia del defecto respecto a lo observado a los 30 días (Figura 15, B: línea negra punteada).



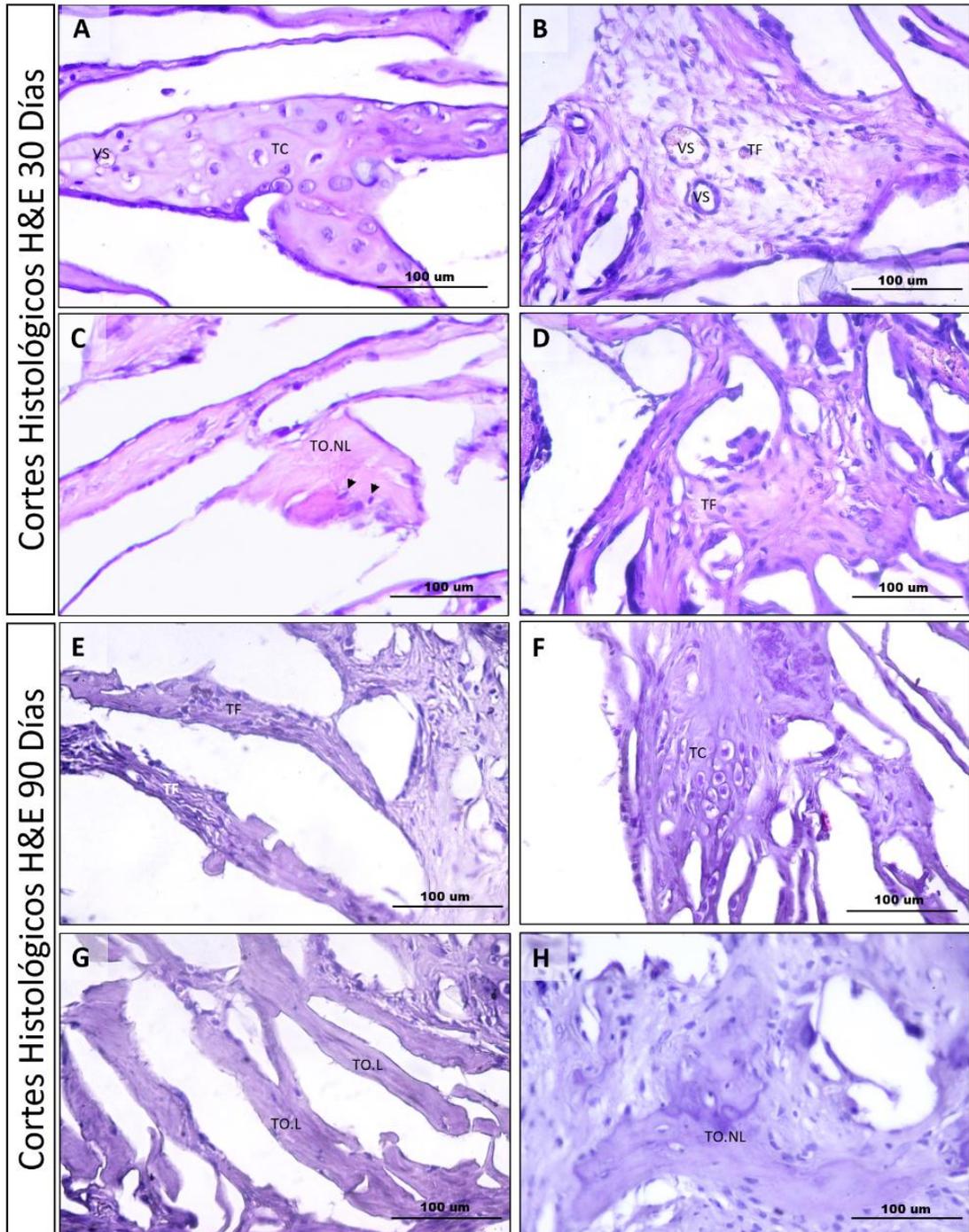
**Figura 14. Experimental con hDPSCs a 30 días de la cirugía del defecto, H&E.**

**A)** Observación panorámica del defecto crítico 25x. A los costados se aprecia el tejido óseo nativo delimitado por una línea punteada amarilla, entre ambos cabos se observa un tejido de apariencia fibrosa y ósea. **B)** Extremo izquierdo del defecto 100x. El tejido óseo nativo (delimitado por un cuadrado blanco punteado), hueso neoformado (flecha negra), trabéculas de hueso no laminillar (estrellas negras), células gigantes multinucleadas (círculo verde) y vasos sanguíneos (VS). **C)** En el centro del defecto 100x, múltiples focos de tejido cartilaginoso (delimitados por línea punteada negra) y continuados por un tejido fibroso con presencia de vasos sanguíneos (asteriscos negros). **D)** Cabo derecho del defecto 100x, similar al extremo izquierdo.



**Figura 15. Experimental con hDPSCs a 90 días de la cirugía del defecto, H&E.**

**A)** Observación panorámica del defecto crítico 25x. Hueso nativo (línea punteada amarilla), observe el tejido óseo no laminillar cerrando el defecto. **B)** Sector izquierdo del defecto 100x, trabéculas con focos cartilaginosos (línea punteada negra), hacia la periferia trabéculas más finas con tejido fibroso (punta de flecha azules). **C)** Hacia el centro, trabéculas anchas de hueso no laminillar (línea verde punteada), algunas encerrando un material bizarro irregular (punta flecha negra). **D)** Sector derecho del defecto, múltiples focos de tejido cartilaginoso (línea punteada negra) y un resto de material de andamiaje (punta flecha negra, M.A.).



**Figura 16. Tejido formado al interior de los defectos a 30 y 90 días de la cirugía del defecto, H&E. Aumento 400X. Barras 100µm.** Luego de la implantación de hDPSCs se observó **A-B)** Tejido cartilaginoso (TC) y tejido fibroso (TF) tipo matriz provisional con vasos sanguíneos (VS) en su interior. **C)** trabécula de tejido óseo no laminillar (TO.NL) con osteocitos en su interior (punta de flecha negra). **D)** Tejido fibroso (TF) tipo matriz provisional. **E)** Trabéculas de tejido fibroso (TF). **F)** Trabécula de tejido cartilaginoso (TC). **G-H)** Trabéculas de tejido óseo laminillar (TO.L) y no laminillar (TO.NL)

### 6.1.2 Frecuencia y ubicación de cartílago en defectos a los 30 y 90 días

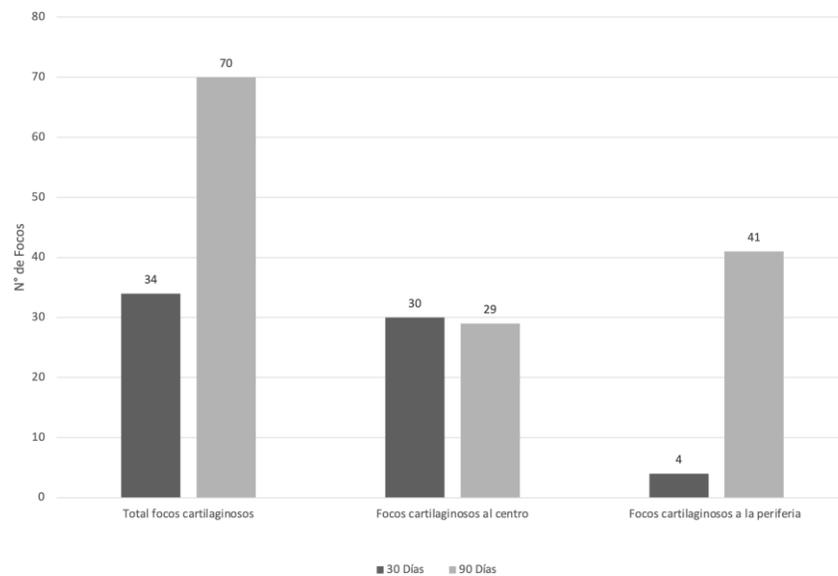
Se determinó la frecuencia y ubicación de focos cartilaginosos observados en los defectos a los 30 y 90 días. La distribución se muestra en el gráfico 1.

A los 30 días el número de focos de cartílago localizados al centro del defecto fue significativamente mayor que aquellos observados en la periferia del defecto (test de diferencia de proporciones  $p=0.0000$ ).

En cortes observados a los 90 días de reparación, el número de focos de cartílago al centro del defecto fue menor, produciéndose un aumento significativo del número de focos de cartílago en la periferia del defecto (test de diferencia de proporciones  $p=0.0037$ ).

El número de focos de cartílago observados a 30 días fue significativamente menor que los observados a los 90 días (test de diferencia de proporciones  $p=0.0000$ ).

**Gráfico N°1**  
Frecuencia y ubicación de focos de cartílago en el defecto a 30 y 90 días



Se realizó también la medición en  $\mu\text{m}^2$  del área de cada foco de tejido cartilaginoso y se estableció una proporción respecto al área total del defecto observado. Se calcularon las medias de las áreas y de las proporciones, de manera general y según su localización en el defecto tanto a los 30 como a los 90 días. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1 y Gráfico 2.

A los 30 días la media de las proporciones de las áreas de focos cartilaginosos fue mayor al centro del defecto en comparación con lo observado en la periferia del defecto y esta diferencia fue estadísticamente significativa (Test de Mann-Whitney  $p=0.049$ ).

A los 90 días la media de las proporciones de las áreas de focos cartilaginosos fue mayor al centro del defecto en comparación con lo observado en la periferia, sin embargo, esta diferencia de proporción de áreas no fue significativa (Test de Mann-Whitney  $p=0.1685$ ).

La proporción del área total de los focos de cartílago observados al interior del defecto a 30 días (0,021) fue bastante menor a la observada a los 90 días (0,047) (ver Gráfico 2), sin embargo, la media de las proporciones de las áreas de focos cartilaginosos totales observadas entre los 30 días ( $0,0058 \pm 0,0046$ ) y los 90 días ( $0,0056 \pm 0,0056$ ) no mostró diferencias significativas (Test de Mann-Whitney  $p=0.4351$ ).

La media de las proporciones de las áreas de focos cartilaginosos observados al centro del defecto a los 30 días ( $0,0062 \pm 0,0046$ ) se mostró muy similar a lo observado a los 90 días ( $0,0065 \pm 0,0061$ ) (No significativo: Test de Mann-Whitney  $p=0.7398$ ). La media de las proporciones de las áreas de focos cartilaginosos observados en la periferia del defecto fue mayor a los 90 días ( $0,0049 \pm 0,0053$ ) respecto a lo observado a los 30 días ( $0,0022 \pm 0,0011$ ), pero esta diferencia no fue significativa (Test de Mann-Whitney  $p=0.2641$ ).

**Tabla 1.**

Frecuencia de focos, medias y proporciones de áreas de cartilago según su localización en el área total del defecto

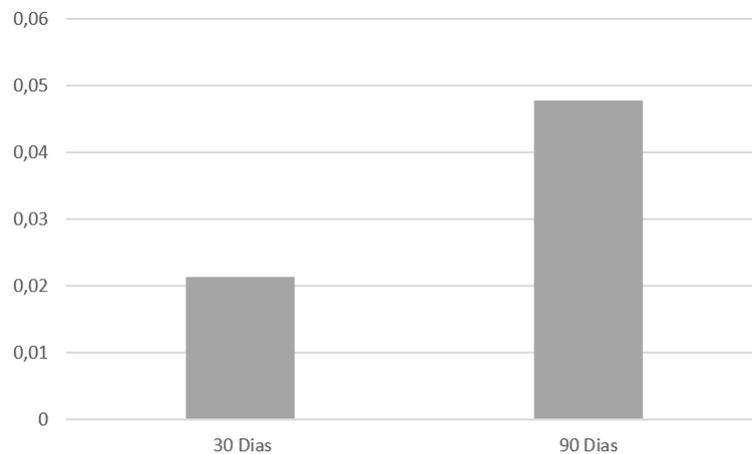
Días	Nº total de focos de cartilago y %	Media del área de focos de cartilago (um <sup>2</sup> )	Media de la proporción de áreas de focos de cartilago (um <sup>2</sup> )	Nº total de focos de cartilago al centro y %	Media área de focos al centro (um <sup>2</sup> )	Media de la proporción de áreas de focos al centro (um <sup>2</sup> )	Nº total de focos de cartilago a la periferia y %	Media área de focos a la periferia (um <sup>2</sup> )	Media de la proporción de áreas de focos a la periferia (um <sup>2</sup> )
30	36(*) (100%)	18649±14176 (Min. 3.327 Max. 52.488)	0,0058±0,0046 (Min. 0,00088 Max. 0,01878)	32(*) (89%)	13912±14503 (Min.3988 Max.52488)	0,0062±0,0046(**) (Min. 0,0011 Max. 0,0188)	4(*) (11%)	8525±4152 (Min.3327 Max.13055)	0,0022±0,0011(**) (Min.0,00088 Max.0,00345)
90	70(*) (100%)	23347±23625 (Min. 2.381 Max. 113.007)	0,0056±0,0056 (Min. 0,00037 Max. 0,02652)	29(*) (41%)	26252±25512 (Min. 3984 Max.113007)	0,0065±0,0061 (Min.0,00061 Max.0,02652)	41(*) (59%)	21292±22288 (Min.2381 Max.92565)	0,0049±0,0053 (Min.0,00037 Max.0,02173)

(\*) Test de diferencia de proporciones significativo ( $p < 0,05$ )

(\*\*) Test de Mann-Whitney significativo ( $p < 0,05$ )

**Gráfico N°2**

Proporción del área total de cartilago al interior de los defectos según periodo de observación



En resumen, se observó una diferencia estadísticamente significativa en el número de focos cartilagosos entre períodos, siendo mayor a los 90 días. Además, dentro de cada período hubo una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al número de focos según su localización al interior del defecto, viéndose a los 30 días mayor cantidad de focos al centro y a los 90 días mayor cantidad de focos en la periferia. Por otro lado, solo a los 30 días hubo una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la media de las proporciones de las áreas de focos cartilagosos según su localización en el defecto, siendo esta mayor al centro, lo que indica que en promedio estos focos del centro, de manera individual ocupan una mayor área al interior del defecto en comparación con los de la periferia. Finalmente, la proporción del área total de cartilago al interior de los defectos fue mas del doble a los 90 días (0,047) en comparación a los 30 días (0,021).

## **6.2 CARACTERIZACION DEL ESTADO DE MADUREZ HISTOMORFOLÓGICA DEL CARTÍLAGO EN DEFECTO CRITICO A LOS 30 Y 90 DIAS DE IMPLANTADO EL CONSTRUCTO.**

Se determinó mediante microscopia de luz el estado de desarrollo del cartílago hallado dentro de los defectos a los 30 y 90 días de acuerdo con las características histomorfológicas presentadas.

**A los 30 días** el tejido cartilaginoso de las trabéculas centrales del defecto mostró diversos estados de madurez observándose:

Cartílago hialino típico, con **condrocitos en reposo** (CR) de tamaño pequeño con un núcleo bien marcado, en sus lagunas bien definidas y rodeados de una matriz más intensamente teñida con las tinciones de H&E, Azul Alcían y O-safranina (Figura 17, A-C; 18, A).

Cartílago con **grupos isógenos en división** (Figura 17, D; 18, B), donde se ven dos células al interior de una laguna intacta (flecha celeste).

Cartílago con **condrocitos hipertróficos**, células de gran tamaño con un núcleo claramente identificable y generalmente centrado, con citoplasma claro y en general únicos en su laguna bastante más amplia en comparación con los condrocitos en reposo o en división. Y en algunos sectores cartílago con una MEC de apariencia calcificada con **condrocitos hipertróficos sin núcleos**, algunas lagunas vacías y algunos vasos sanguíneos. Algunas de estas trabéculas estaban rodeadas de células multinucleadas tipo osteoclastos (Figura 17, E; 18, C y D). Estas características parecían corresponder a un proceso de osificación endocondral clásico.

Por otra parte, se observaron otras trabéculas constituidas de un tejido de aspecto óseo no laminillar con escasos vasos sanguíneos, que reacciona menos a las coloraciones características de O-safranina y azul alcían, con células incluidas que presentaban formas diversas, algunas de aspecto osteocitario (flecha negra) y otras células con aspecto condrocitario (flecha roja) donde aún la laguna está claramente identificable, un núcleo más pequeño, basofilo y citoplasma reducido, en comparación a un condrocito hipertrófico “clásico” que se observa con un amplio citoplasma e incluso sin núcleo cuando está en vía de apoptosis (Figura 17, F y G; 18, E y F).

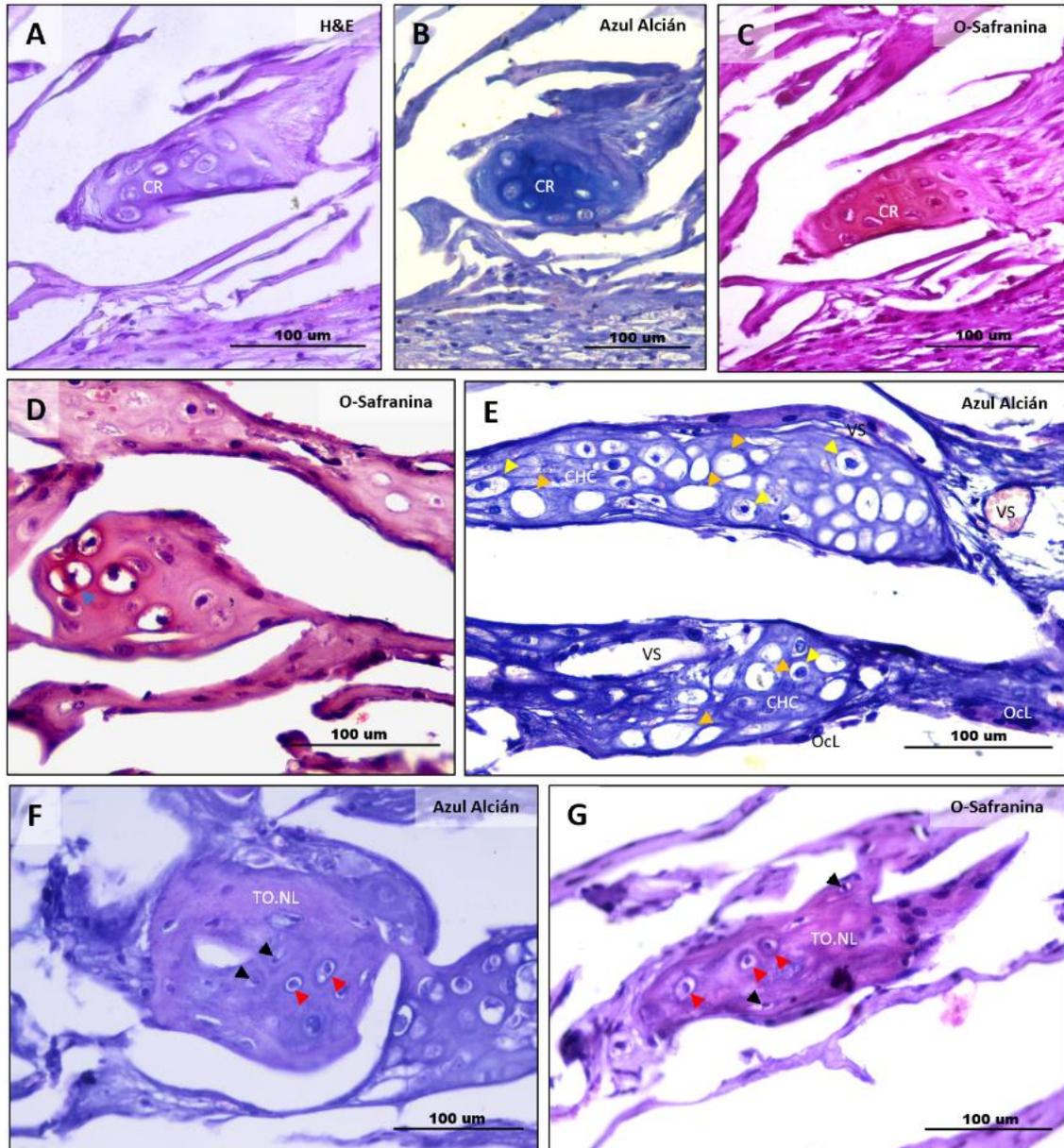
A los 90 días también se observaron múltiples trabéculas de tejido cartilaginoso (Figura 19, A-C) en diferentes etapas de desarrollo, particularmente ubicadas en la periferia del defecto: **Cartílago en reposo** (Figura 19, E; 20, A), **Cartílago en división** (Figura 19, D; 20, B) y otras con **cartílago con condrocitos hipertróficos** (Figura 19, A; 20, C), matriz calcificada e invasión vascular (osificación endocondral canónica).

Estas trabéculas de matriz calcificada tipo osteoide se veían en mayor proporción que a los 30 días, observándose además un tejido de aspecto osteoide con células mixtas osteocitarias y condrocitarias (Figura 19, G; 20, F) y vasos sanguíneos (Figura 19, F; 20, E y F).

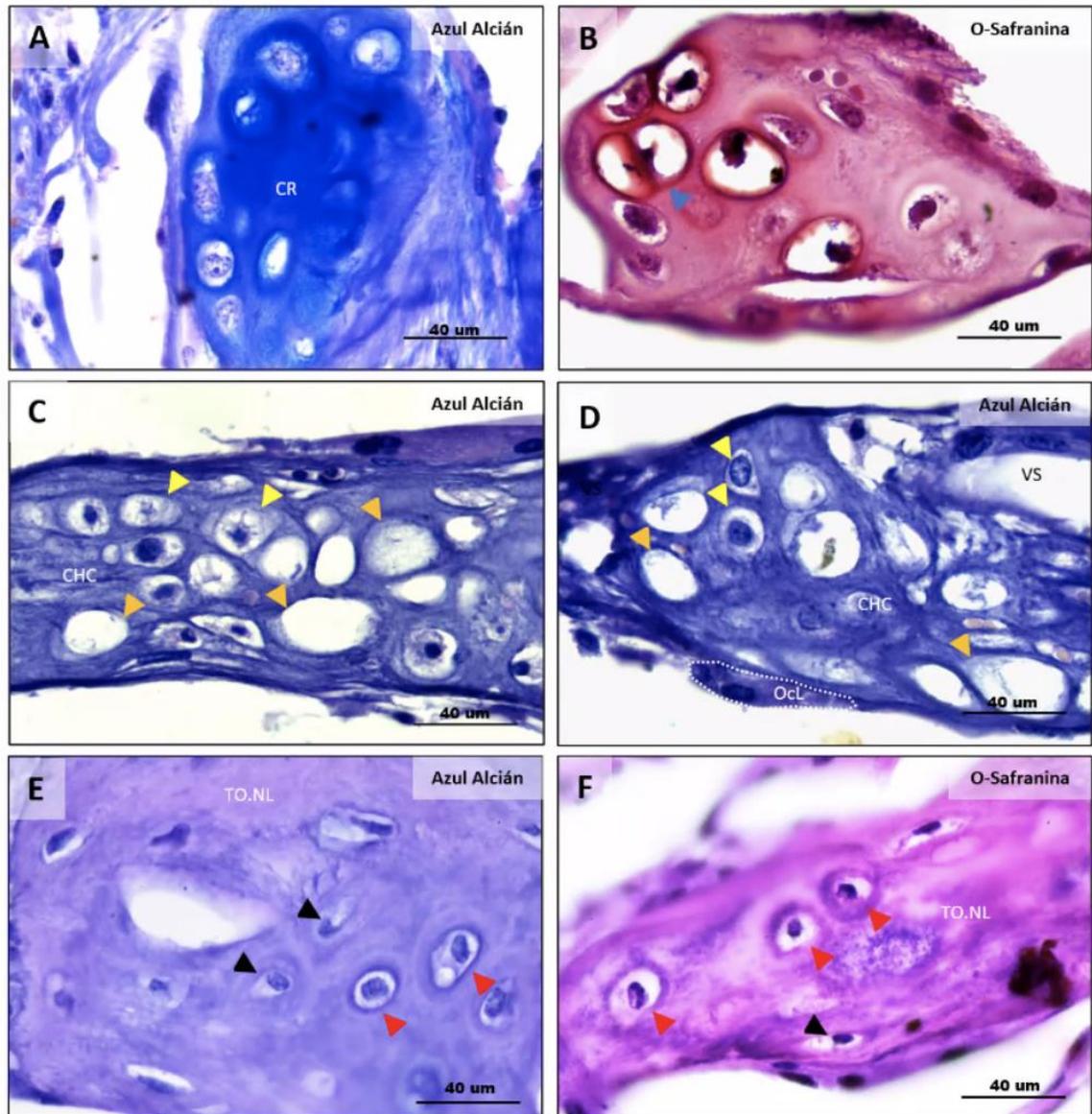
En cortes seriados con diferentes tinciones, se observó la transición que presentan algunas trabéculas en que, de cartílago en división en cortes periféricos, pasan por cartílago hipertrófico y en cortes más profundos se observan ya las trabéculas óseas (Figura 21, A-C). Algunas trabéculas a la periferia mostraron su MEC muy marcada por las tinciones de o safranina y azul alcian, otras con marcaje de menor intensidad en la periferia (Figura 21, B y C).

Al comparar el estado de desarrollo del cartílago entre los 30 y 90 días, se observó que a los 30 días la mayoría de las trabéculas cartilaginosas se encontraban en el centro del defecto en diferentes estados de desarrollo, desde cartílago en reposo hasta regiones de cartílago en vías de osificación, mientras otras mostraron aspecto mixto de trabéculas osteoides con células tipo condrocitos hipertróficos y osteocitos.

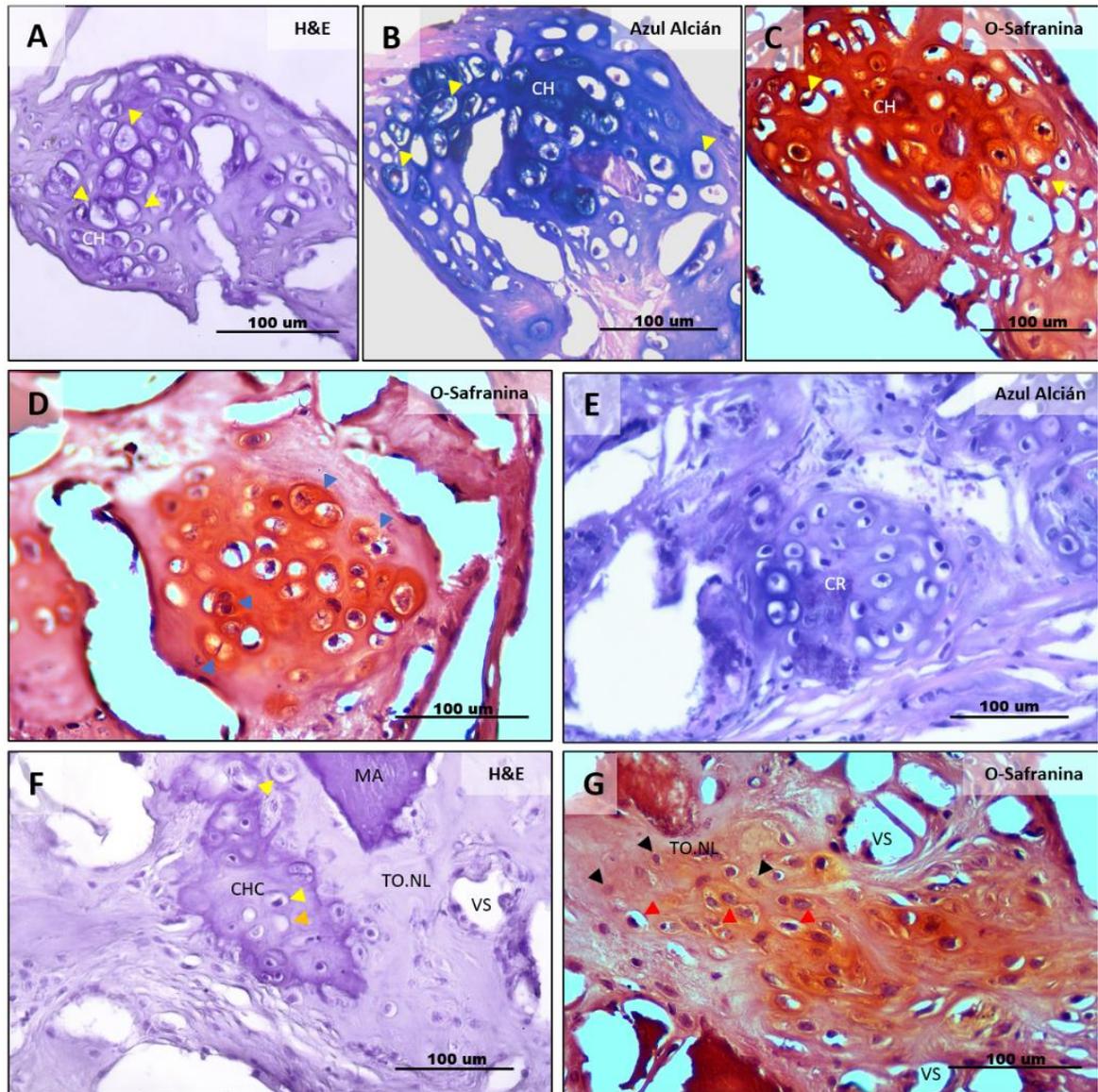
A los 90 días los núcleos de cartílago del centro del defecto se mostraron más pequeños en relación con trabéculas osteoides, en cambio se observaron más trabéculas de tejido cartilaginoso hacia la periferia del defecto, mostrando también diversas etapas de osificación endocondral.



**Figura 17. Diferentes tipos de tejidos cartilagosos encontrados en el defecto crítico tratado con hDPSCs, a los 30 días, H&E, Azul alción y O-safranina. Aumento 400X. Barras 100um. A-C) Corte seriado de trabéculas de cartílago en reposo (CR). D) Trabécula de tejido cartilaginoso con condrocitos en división (punta de flecha azul). E) Trabéculas de tejido cartilaginoso hipertrófico calcificado (CHC), con condrocitos hipertróficos (punta de flecha amarilla) e hipertróficos apoptóticos (punta de flecha naranja), vasos sanguíneos (VS) y células multinucleadas tipo osteoclastos (OcL). F-G) Trabéculas de tejido óseo no laminillar (TO.NL) con células de aspecto osteocitario (punta de flecha negra) y condrocitario (puntas de flecha roja).**

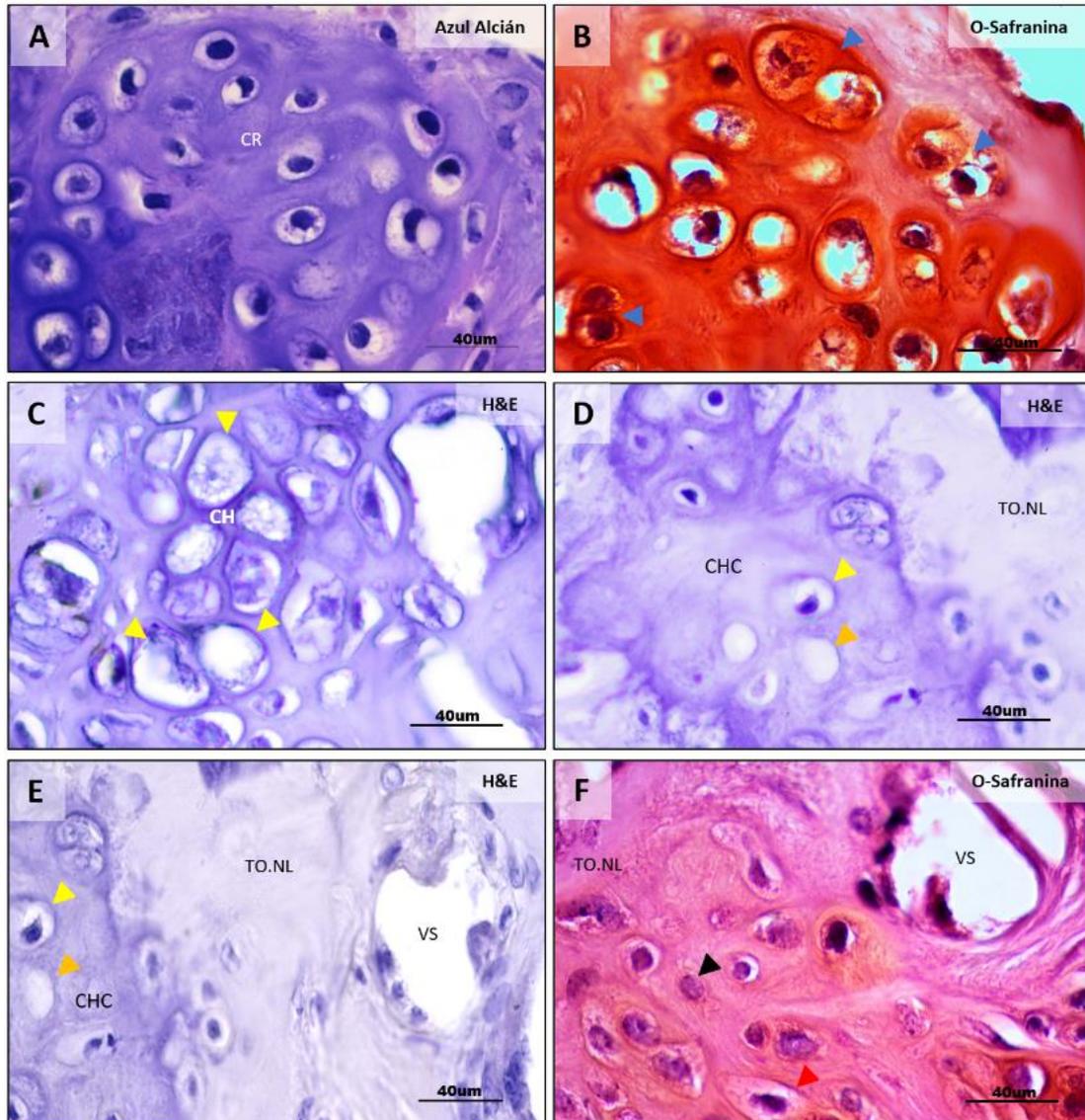


**Figura 18: Diferentes tipos de tejidos cartilagosos encontrados dentro del defecto crítico tratado con hDPSCs a los 30 días, H&E, Azul alcian y O-safranina. Aumento 1000X. Barras 40µm. A)** Trabécula de cartílago en reposo (CR). **B)** Trabécula de tejido cartilagosos con condrocitos en división (punta de flecha azul). **C)** Trabéculas de tejido cartilagosos hipertrófico calcificado (CHC), con condrocitos hipertróficos (punta de flecha amarilla) e hipertróficos apoptóticos (punta de flecha naranja). **D)** Trabéculas de tejido cartilagosos hipertrófico calcificado (CHC), vasos sanguíneos (VS) y células multinucleadas tipo osteoclastos (OcL). **E-F)** Trabéculas de tejido óseo no laminillar (TO.NL) con células de aspecto osteocitario (punta de flecha negra) y condrocitario (puntas de flecha roja).

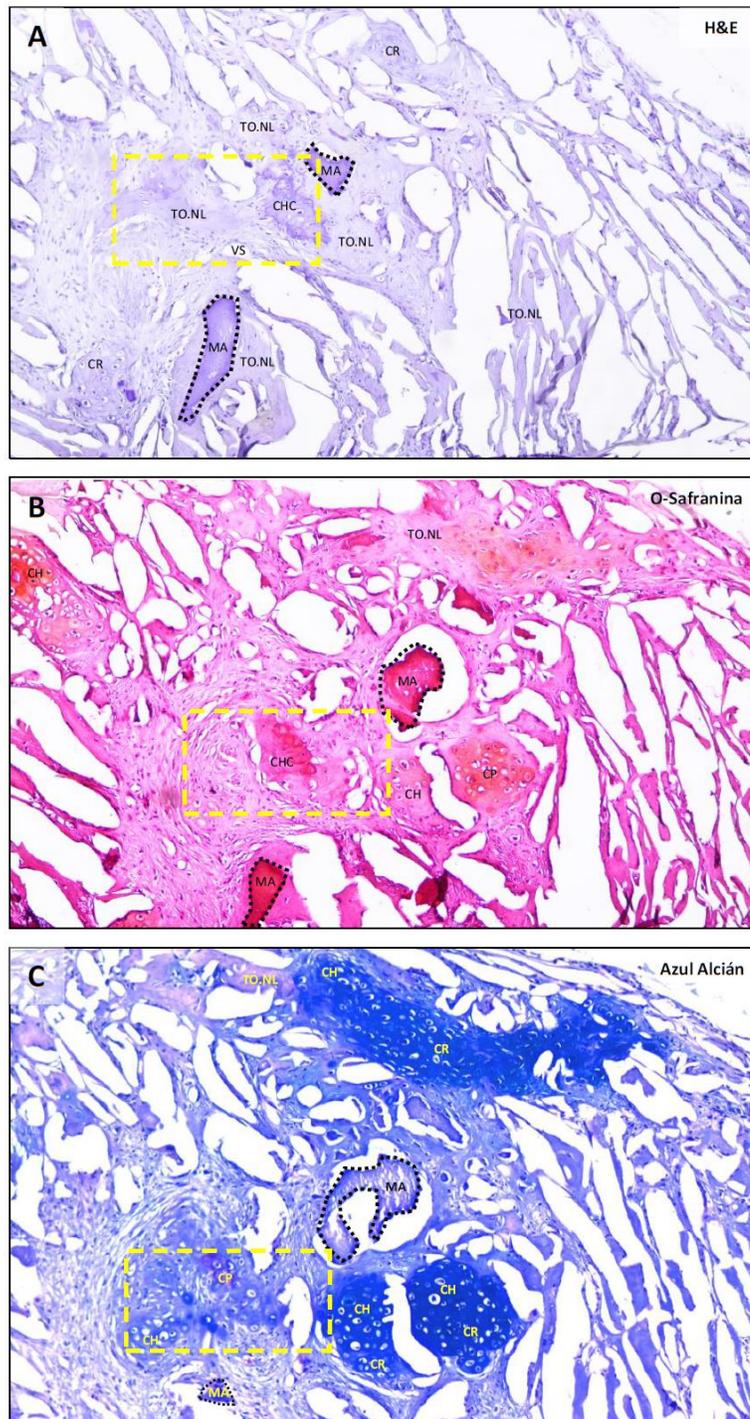


**Figura 19.** Diferentes tipos de tejidos cartilagosos encontrados en el defecto crítico tratado con hDPSCs, a los 90 días, H&E, Azul alción y O-safranina. Aumento 400X. Barras 100µm.

**A-C)** Corte seriado de trabéculas de cartílago (CH) con condrocitos hipertróficos (punta de flecha amarilla) en diferentes tinciones. **D)** Trabécula de cartílago con condrocitos en división (punta de flecha azul). **E)** Trabécula de cartílago en reposo (CR). **F)** Trabéculas de cartílago hipertrófico calcificado (CHC), con condrocitos hipertróficos (punta de flecha amarilla), hipertróficos apoptóticos (punta de flecha naranja), vasos sanguíneos (VS), tejido óseo no laminillar (TO.NL), material de andamiaje (MA). **G)** Trabéculas de tejido óseo no laminillar (TO.NL) con células de aspecto osteocitario (punta de flecha negra), condrocitario (puntas de flecha roja) y vasos sanguíneos (VS).



**Figura 20. Diferentes tipos de tejidos cartilaginosos encontrados en el defecto crítico tratado con hDPSCs a los 90 días, H&E, Azul alcian y O-safranina. Aumento 1000X. Barras 40µm. A)** Trabécula de cartílago en reposo (CR). **B)** Trabécula con condrocitos en división (puntas de flecha azul). **C)** Trabécula cartílago hipertrófico (CH) con condrocitos hipertróficos (puntas de flecha amarilla). **D-E)** Trabéculas de cartílago hipertrófico calcificado (CHC), con condrocitos hipertróficos (punta de flecha amarilla), hipertróficos apoptóticos (punta de flecha naranja), vasos sanguíneos (VS), tejido óseo no laminillar (TO.NL). **F)** Trabéculas de tejido óseo no laminillar (TO.NL) con células de aspecto osteocitario (punta de flecha negra) y condrocitario (puntas de flecha roja), vaso sanguíneo (VS).



**Figura 21. Cortes seriados desde el centro del defecto hacia la periferia, de una región de osificación endocondral canónica, en proceso reparativo de 90 días. H&E, Azul alcian y O-safranina. Aumento 100X. A)** Corte central del defecto, H&E, múltiples trabéculas de tejido óseo no laminillar (TO.NL), cartílago en reposo (CR), material de andamiaje (MA). En el sector de observación (rectángulo punteado amarillo), cartílago hipertrófico calcificado (CHC), tejido óseo no laminillar, vaso sanguíneo (VS). **B)** Corte más periférico del defecto, O-safranina, mayor número de núcleos de tejido cartilaginoso en diferentes estados de diferenciación: Cartílago en proliferación (CP), cartílago hipertrófico (CH), cartílago hipertrófico calcificado (CHC). En el sector de observación cartílago hipertrófico calcificado (CHC). **C)** Corte aún más periférico del defecto, abundantes núcleos de tejido cartilaginoso en diferentes estados de diferenciación: Cartílago en proliferación (CP), cartílago hipertrófico (CH). En el sector de observación cartílago en proliferación (CP) e hipertrófico (CH).

### **6.3 DETERMINACION MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DEL ORIGEN DE LA ESPECIE DE LAS CÉLULAS QUE GENERARON EL CARTÍLAGO OBSERVABLE EN LOS CORTES HISTOLÓGICOS.**

Habiendo demostrado morfológicamente la presencia de tejido cartilaginoso en diferentes estados de desarrollo en vías de osificación endocondral, tanto a los 30 como a los 90 días en los defectos óseos críticos cargados con una matriz tridimensional con hDPSC; se intentó establecer el origen del tejido cartilaginoso.

Con ese fin se realizó un inmunomarcaje para Vimentina humana (*Anti-human Vimentin*), para Colageno tipo II humano (*Anti-human COL2A1*) y Osteocalcina humana (*Anti-human Ocn*)

Las vimentinas son filamentos intermedios de clase III que se encuentran en células no epiteliales, especialmente en las células mesenquimales (Danielsson y cols., 2018; Musaelyan y cols., 2018). El colágeno II es específico del cartílago hialino, se encuentra en gran abundancia permitiendo formar agregados de proteoglicanos proporcionándole las características típicas de este tejido (Suzuki y cols., 2006). La osteocalcina es un marcador que clásicamente se usa para identificar tejido óseo, sin embargo, también se ha visto que condrocitos hipertróficos en proceso de transdiferenciación expresan esta proteína (Roach, 1992).

#### **6.3.1 Inmunomarcaje de *Anti-human Vimentin***

Los resultados del inmunomarcaje con *Anti-human Vimentin* tanto en los defectos como en sus controles se presentan en la Figura 22.

En los cortes de defectos experimentales, en los focos cartilaginosos, se observó un marcaje marrón muy leve en el citoplasma de los condrocitos, tanto a los 30 (Figura 22, A y B) como a los 90 días (Figura 22, C y D).

En los cortes de controles negativos de especie en cartílago de ratón, cóndilo mandibular del ratón, no se observó ningún marcaje de *Anti-human Vimentin* en los condrocitos (Figura 22, E y F).

En los controles positivos de especie en hiperplasia condilar humana, se observó un marcaje positivo, particularmente en la capa cartilaginosa más profunda, en relación con el hueso subcondral (Figura 22, G y H).

No se observó ningún marcaje de *Anti-human Vimentin* en los controles negativos, sin uso de anticuerpo (Figura no mostrada)

### **6.3.2 Inmuno-marcaje de *Anti-human COL2A1***

Los resultados del inmunomarcaje con *Anti-human COL2A1* tanto en los defectos como en sus controles se presentan en la Figura 23.

En los cortes de defectos implantados con constructo con hDPSCs, el anticuerpo *Anti-human COL2A1*, mostró marcaje positivo de la matriz extracelular que rodea a los condrocitos (tinción marrón) del tejido cartilaginoso al interior del defecto, tanto a los 30 (Figura 23, A y B) como a los 90 días (Figura 23, C y D).

En los cortes de controles negativos de especie en cartílago de ratón, cóndilo mandibular del ratón, también se observó marcaje positivo para *Anti-human COL2A1* en la MEC del cartílago (Figura 23, E y F).

En los controles positivos de especie en hiperplasia condilar humana, se observó un intenso marcaje positivo en la capa cartilaginosa más profunda, en relación con el hueso subcondral (Figura 23, G y H).

No se observó ningún marcaje de colágeno II en los controles negativos, sin uso de anticuerpo (Figura no mostrada).

### **6.3.3 Inmuno-marcaje de *Anti-human Ocn***

Los resultados del inmunomarcaje con *Anti-human Ocn* tanto en los defectos como en sus controles se presentan en la Figura 24.

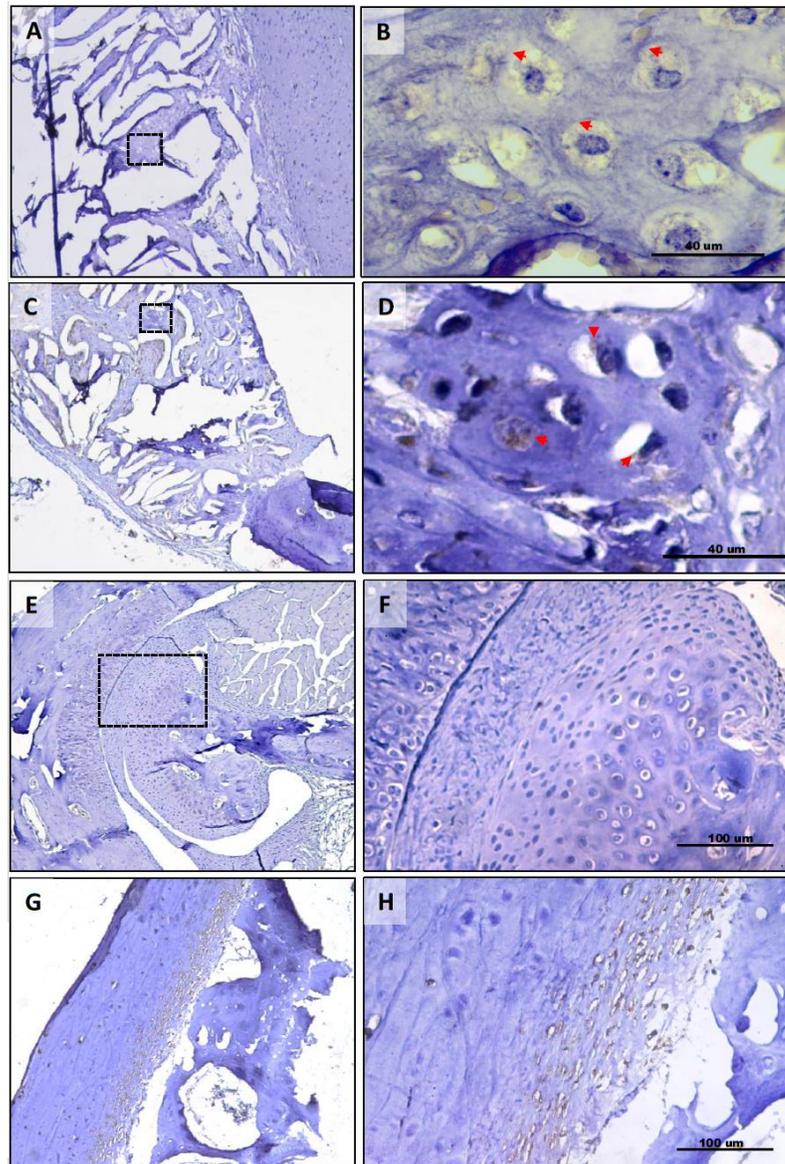
En los cortes de defectos implantados con constructo con hDPSCs, el anticuerpo mostró marcaje positivo de la matriz al interior de la mayoría de las lagunas condrocitarias tanto a los 30 días (imágenes no mostradas) como a los 90 días (Figura 24, A-D). Solo algunas lagunas de aspecto apoptótico no mostraron marcaje (Figura 24, D: punta de flecha negra), como tampoco el tejido óseo circundante propio del ratón.

En algunas zonas, también se observó el marcaje de *Anti-human Ocn* en la MEC, de modo característico de tejido óseo (Figura 24, B: línea roja punteada); donde además hay células positivas y negativas para *Anti-human Ocn*.

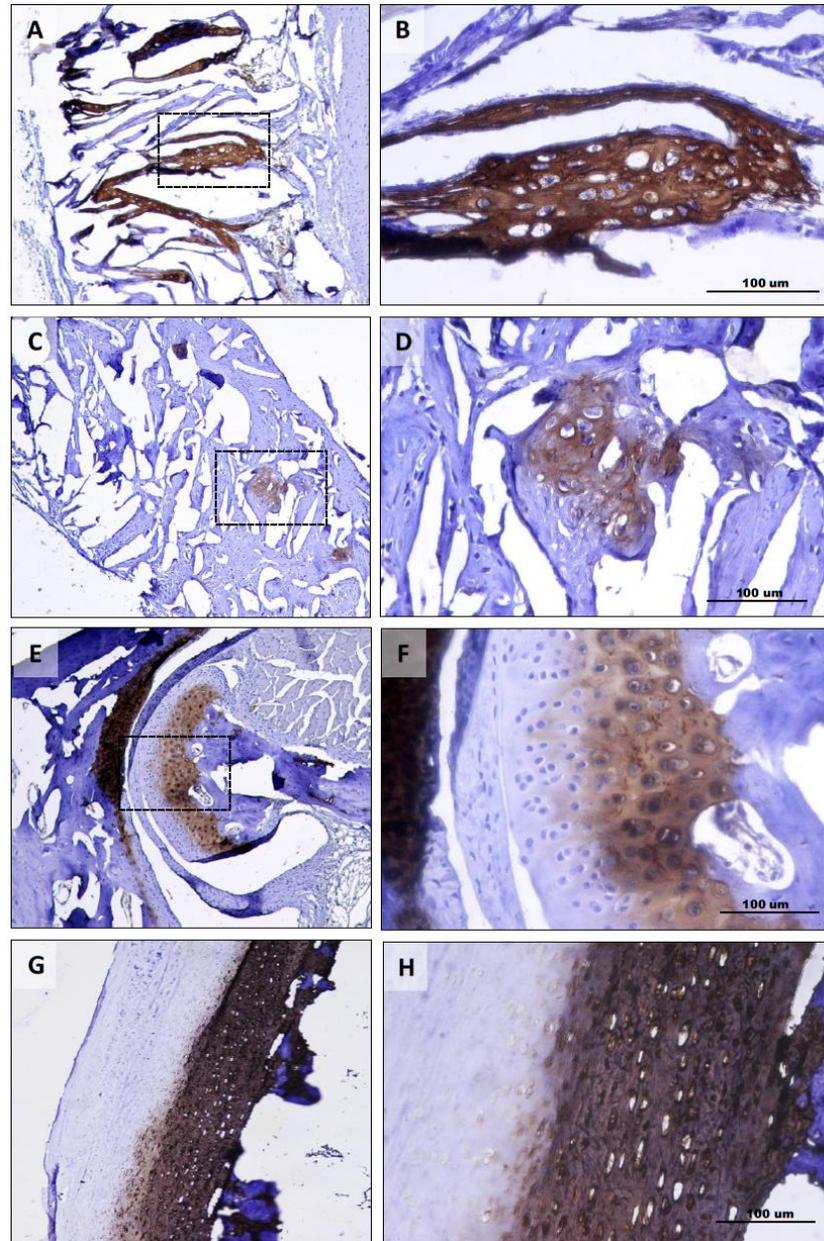
Paralelamente, se observaron células positivas en proximidad de vasos sanguíneos de bajo calibre (Figura 24, D: punta flecha verde).

La morfología de las células positivas para *Anti-human Ocn* es similar a la descrita como célula en transdiferenciación: Laguna bien delimitada, núcleo basófilo, citoplasma pequeño (Figura 24, B-D: punta flecha amarilla). Finalmente, células con morfología de osteoblasto también dieron positivos para el anticuerpo (Figura 24, C: punta flecha negra).

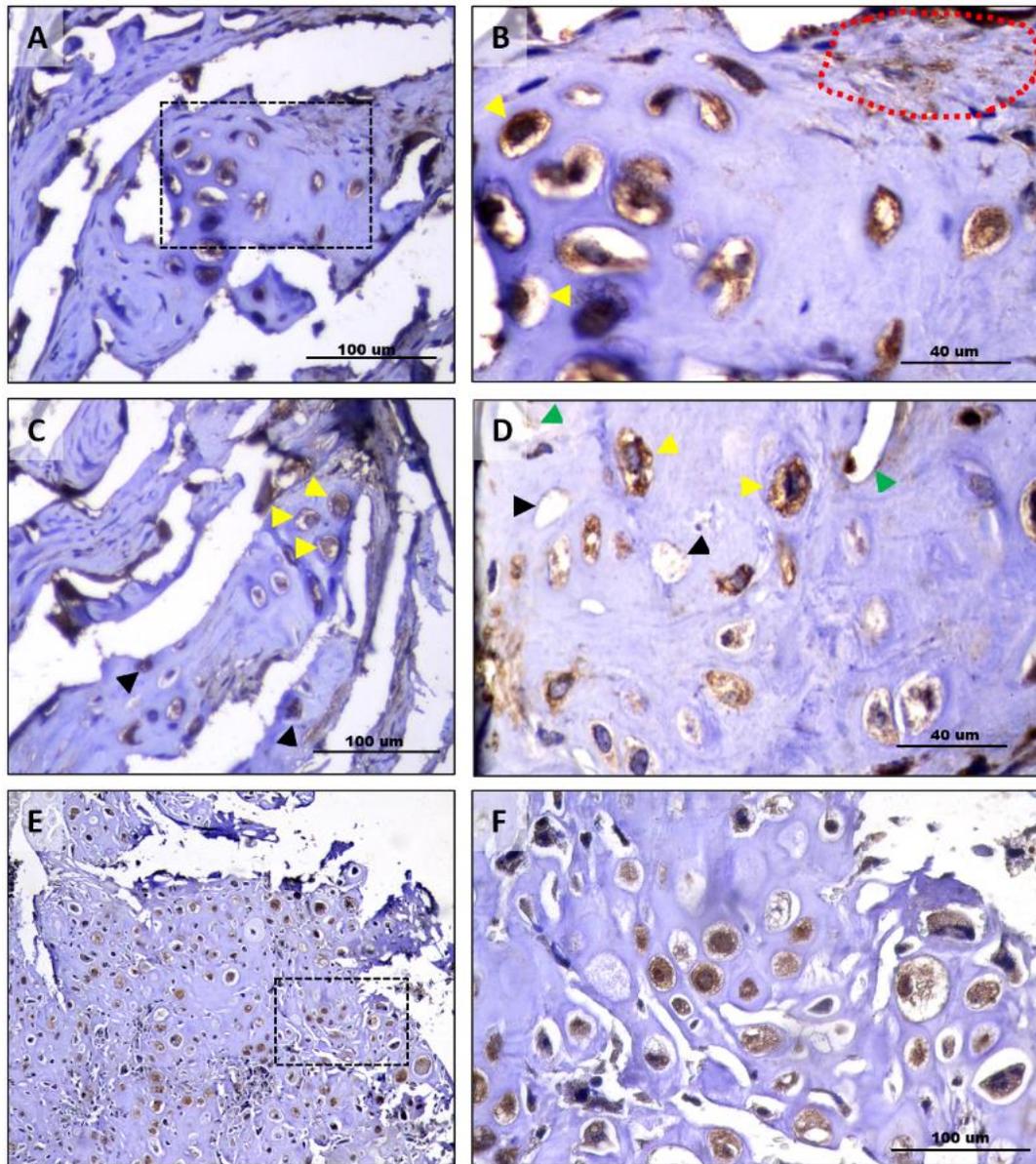
En los controles positivos de especie en osteosarcoma humano, se observó un marcaje positivo en las células cartilaginosas y osteoides tumorales (Figura 24, F y G).



**Figura 22. Inmunohistoquímica con *Anti-human Vimentin*, Revelado con DAB (color marrón). A-B) Defecto crítico con constructo implantado con material de andamiaje con células madre a 30 días, A) Sector medio del defecto pequeño foco de tejido cartilaginoso 100x, cuadrado punteado negro representa magnificación 1000x en B. B) Foco de tejido cartilaginoso 1000x: condrocitos con marcaje positivo en algunas zonas del citoplasma (puntas flecha roja) C-D) Defecto crítico con constructo implantado con material de andamiaje con células madre a 90 días. C) Sector medio del defecto pequeño foco de tejido cartilaginoso 100x, cuadrado punteado negro representa magnificación 1000x en D. D) Foco de tejido cartilaginoso 1000x: condrocitos con marcaje positivo en algunas zonas del citoplasma (puntas flecha roja) E-F) Control negativo de especie: cóndilo mandibular de ratón. E) 100x, cuadrado punteado negro representa magnificación 400X en F. F) a 400x no se observa ningún marcaje positivo para *Anti-human Vimentin* en el tejido cartilaginoso del cóndilo de ratón. G-H) Control positivo de especie: cóndilo mandibular humano (hiperplasia condilar). Se observa marcaje positivo para *Anti-human Vimentin* en los condrocitos.**



**Figura 23. Inmunohistoquímica con *Anti-human COL2A1*, Revelado con DAB (color marrón). A-B) Defecto crítico implantado con constructo con células madre a 30 días, A) Sector medio del defecto crítico, 100x, diferentes focos cartilagosos con marcaje positivo para anticuerpo *Anti-human COL2A1*, cuadrado punteado negro representa magnificación 400X en B. B) Foco cartilaginoso 400x, el anticuerpo *Anti-human COL2A1* marca la matriz extracelular presente en el tejido cartilaginoso. C-D) Defecto crítico con constructo implantado con células madre a 90 días. C) Sector medio del defecto crítico 100x, trabécula con cartilago marcado positivamente con anticuerpo *Anti-human COL2A1*, cuadrado punteado negro representa magnificación 400X en D. D) Foco cartilaginoso 400x: anticuerpo *Anti-human COL2A1* marca la matriz extracelular presente en el tejido cartilaginoso. E-F) Control negativo de especie: cóndilo mandibular ratón. E) cartilago articular del cóndilo mandibular, 100x, marcaje positivo para anticuerpo *Anti-human COL2A1*. Cuadrado punteado negro representa magnificación 400X en F. F) a 400x, marcaje positivo con anticuerpo *Anti-human COL2A1* en la capa del cartilago condilar adyacente al hueso. G-H) Control positivo de especie: Cóndilo mandibular humano (hiperplasia condilar): se observa marcaje para positivo para el anticuerpo *Anti-human COL2A1* en la matriz extracelular del cartilago adyacente al hueso.**



**Figura 24. Inmunohistoquímica con *Anti-human Ocn*, Revelado con DAB (color marrón). A-B) Defecto crítico implantado con constructo con células madre a 90 días, A) Sector medio del defecto crítico, 400x, foco cartilaginoso y células con marcaje positivo para anticuerpo *Anti-human Ocn*, cuadrado punteado negro representa magnificación 1000X en B. B) Foco cartilaginoso 1000x, el anticuerpo *Anti-human Ocn* marca zonas positivas dentro del citoplasma de condrocitos (puntas flecha amarilla). C) trabécula mixta, 400x, el anticuerpo *Anti-human Ocn* marca positivo en citoplasma de condrocitos (punta flecha amarilla) y células tipo osteoblasto (punta flecha negra). D) 1000x, anticuerpo *Anti-human Ocn* marca positivo para condrocitos (punta flecha amarilla) cercanos a vasos sanguíneos (punta de flecha verde) y condrocitos de aspecto apoptótico (punta de flecha negra) no mostraron marcaje. G-H) Control positivo de especie: osteosarcoma humano. Se observa marcaje positivo para *Anti-human Ocn* en células cartilaginosas y osteoides tumorales.**

## **7 DISCUSIÓN**

### **7.1 CONCEPTOS GENERALES**

En el presente estudio se caracteriza la presencia de tejido cartilaginoso en el proceso de reparación en un modelo *in vivo* de defecto crítico de calota de ratón, implantado con un constructo con hDPSCs.

La presencia de tejido cartilaginoso en este tipo de modelo utilizando células madre pulpares murinas ya ha sido descrito previamente (Collignon y cols., 2019), sin embargo, existen pocos estudios que hayan profundizado en el posible papel o función que pueda estar cumpliendo el cartílago en el proceso reparativo de calota de ratón utilizando hDPSCs o en investigar la causa de su presencia.

La ingeniería tisular cumple un rol fundamental en el desarrollo de futuras terapias con enfoque regenerativo para recuperar y reparar funciones de los tejidos perdidos y/o dañados. Sin embargo, es de suma importancia conocer y abordar todos los mecanismos ligados al proceso de formación y reparación de los tejidos antes de transferir estos enfoques terapéuticos a la clínica humana, ya que este conocimiento permitiría guiar correctamente y estandarizar los procesos regenerativos de ingeniería tisular.

### **7.2 SOBRE LA PRESENCIA, FRECUENCIA Y UBICACIÓN DEL TEJIDO CARTILAGINOSO DENTRO DEL DEFECTO A LOS 30 Y 90 DÍAS**

Nuestros resultados muestran que después de 30 y 90 días de proceso reparativo, en los defectos se encontraron trabéculas compuestas por diversas formas de tejido: óseo, fibroso y cartilaginoso.

Actualmente la participación de los condrocitos y la plantilla del cartílago hipertrófico, se ha descrito como una característica única durante la curación de huesos largos, no así en la curación de fracturas de calota donde se ha asociado principalmente al modelo de osificación intramembranosa durante las etapas de formación ósea (Wang y cols., 2020), por lo que resulta de gran interés dilucidar la presencia de tejido cartilaginoso hallado en este trabajo.

Algunos estudios han demostrado que la aplicación de cierto grado de tensión mecánica propicia la formación de diferentes tipos de tejido al interior del callo óseo, dentro de los cuales se encuentra el tejido cartilaginoso, además de estimular la producción de ciertas proteínas como FAK y RhoA que podrían estar relacionadas con el proceso de desarrollo del cartílago durante la reparación ósea (Miller y cols., 2015). Sin embargo, no es posible asegurar que esto ocurra al interior de los defectos de calota, de hecho, varios autores refieren que la calota repara principalmente a través de la osificación directa (Le y cols., 2001; Thompson y cols., 2002) ya que no habría inestabilidad mecánica de los constructos implantados que pueda influenciar la formación de este tejido cartilaginoso al interior del defecto.

Otro factor que induce la presencia y/o participación del tejido cartilaginoso en la reparación de lesiones óseas está relacionada con el grado de oxigenación local principalmente en el centro de las fracturas producto de la isquemia por lesión vascular. En ese ambiente de baja tensión de oxígeno o hipoxia se favorece la diferenciación a condrocitos a partir de células madre mesenquimales (Bornes y cols., 2015). Por otra parte, en las células residentes de la placa de crecimiento se ha descrito que los condrocitos responden a la escasez de vasos sanguíneos y la deuda de oxígeno concomitante, regulando al alza el metabolismo anaeróbico, proponiendo que la regulación de los eventos que impulsan al condrocito terminalmente diferenciado hacia su destino final es probablemente parcial o completamente dependiente de factores microambientales (Shapiro y cols., 2005). Los resultados de este estudio a los 30 días mostraron la presencia de cartílago principalmente al centro del defecto, asociado a escasos y pequeños vasos sanguíneos. Mientras que, en la periferia, había más presencia de vasos sanguíneos, en relación con los cabos de tejido óseo nativo.

En la unión condro-ósea, la invasión de vasos sanguíneos en el cartílago (posiblemente relacionada con la expresión de VEGF dependiente de HIF) provoca un aumento repentino de la tensión tisular de oxígeno. Si las células del cartílago experimentaran este tipo de cambio oxémico, se precipitarían a la muerte celular. De hecho, algunos autores observando el comportamiento de condrocitos en cultivo celular, han reportado que los condrocitos hipóxicos son refractarios no sólo a la muerte celular mediada por pares iónicos, sino también a la apoptosis mediada por

FasL. Sin embargo, tras la reoxigenación, estos condrocitos se sensibilizan a los apoptógenos anteriores y sufren una rápida apoptosis (Shapiro y cols., 2005).

Por otro lado, a los 90 días nuestros resultados mostraron mayor frecuencia de focos cartilaginosos y área total de cartílago, el cual se ubicó preferentemente en la periferia. Mientras que en el centro del defecto, el tejido en general presentaba una forma más compacta, y mayor cantidad de trabéculas de tejido óseo no laminillar y laminillar. Este hallazgo sugiere que el tejido óseo se ha formado desde el centro hacia la periferia gracias a la acción de las hDPSCs implantadas, del mismo modo como ha sido descrito por otros autores que han utilizado células murinas para reparar defectos (Collignon y cols., 2019; Chamieh y cols., 2016).

Se ha reportado que las células hipertróficas mueren mediante la inducción de la autofagia. En lugar de activar inmediatamente la maquinaria de muerte celular, los condrocitos muestran un fenotipo de supervivencia inicial y oxidan sus propias macromoléculas estructurales para generar ATP. La importancia del estrés oxidativo como estímulo para la muerte celular se desarrolló aún más en estudios que utilizan el modelo de isquemia-reperfusión. Cuando este modelo se aplica a la unión condro-ósea, el estímulo para la muerte celular es la vascularización y oxigenación de la propia placa. Estos dos conceptos (muerte celular programada tipo II y lesión por isquemia-reperfusión) enfatizan la importancia del microambiente local y, en particular, el papel de la presión de O<sub>2</sub> en la dirección de la supervivencia y la apoptosis en los condrocitos (Shapiro y cols., 2005).

Este es el mecanismo más aceptado en la reparación de fracturas, donde a través de vasos sanguíneos invasores, se introducen células madre mesenquimales que proliferan y se diferencian para convertirse en osteoblastos. Sin embargo, la evidencia actual apoya que el periostio local y la médula ósea son las dos fuentes principales de células formadoras de hueso durante la reparación; de hecho, los experimentos de parabiosis (donde dos animales comparten la misma circulación sanguínea), no respaldan contribuciones significativas de las células circulantes a la reparación de lesiones. (Chan y cols., 2015 ; Colnot, 2009; Colnot y cols., 2006; Yu y cols., 2010; Zhang y cols., 2005; Zhou B. y cols., 2014).

En contraste con lo clásicamente descrito en reparación de lesiones de tejido duro, que involucra la apoptosis de condrocitos y la contribución vascular como el origen de las células madre mesenquimales, este estudio al igual que el de otros autores (Khan y Simmons, 1977; Roach, 1992; Yang L. y cols, 2014; Park y cols, 2015; Hinton y cols, 2017) demuestra que los condrocitos experimentan un comportamiento y morfología diferente a lo que clásicamente se evidencia, la cual se describe como transdiferenciación.

A los 30 días aparecen focos de cartílago los cuales aumentan a los 90 días, esto concuerda con otros reportes durante los procesos de curación ósea de huesos largos, donde aparecen focos de tejido cartilaginoso, que se generan sin establecer un patrón espacial en la lesión, estos cartílagos crecen y se fusionan formando plantillas o moldes para la osificación, o reemplazo por trabéculas óseas (Smok y cols., 2014). Estos puntos o focos pequeños de cartílago que luego crecen y se fusionan generando una placa de cartílago donde sus células se hipertrofian y generan puntos de osificación primaria, es observado también en la osificación de la base del cráneo durante el periodo fetal (Carlson, 2014).

### **7.3 SOBRE EL ESTADO DE MADUREZ HISTOMORFOLOGICA DEL CARTILAGO HALLADO Y SU COMPARACIÓN A LOS 30 Y 90 DIAS**

Dentro del defecto, hubo diferentes características histomorfológicas del tejido cartilaginoso. Tanto a los 30 como 90 días, había trabéculas de tejido cartilaginoso con condrocitos con características de estar en reposo, trabéculas con condrocitos en división celular y trabéculas con condrocitos hipertróficos. Estas características histomorfológicas nos lleva a pensar directamente que estamos bajo un proceso de osificación endocondral de tipo canónica (Aghajanian y Mohan, 2018) la cual se ha mantenido en ambos periodos, en los diferentes sectores del defecto crítico. En este proceso los condrocitos hipertróficos están sumergidos en una MEC de aspecto fibrilar con células multinucleadas tipo osteoclasto a su alrededor. Sin embargo, para validar nuestras observaciones, sería necesario realizar una coloración tipo von kossa para confirmar la presencia de depósitos de sales de calcio o evaluar la muerte celular mediante técnica TUNEL, por ejemplo.

Paralelo a ese tipo de osificación en el proceso reparativo, tanto a los 30 como a los 90 días, fue posible observar que ciertas trabéculas presentaron características histomorfológicas poco convencionales, con una matriz de aspecto óseo no laminillar que tenía poca reacción a las coloraciones de O-safranina y Azul Alcian. Sumergidas en esa MEC al interior de lagunas, había células mixtas de apariencia osteocitaria y condrocitaria, positivas a la osteocalcina. La expresión de diferentes marcadores óseos incluyendo la osteocalcina, por parte de los condrocitos ha sido descrita desde hace varios años (Gerstenfeld y Shapiro, 1996; Roach y cols., 1992; Park y cols., 2015) para sustentar la hipótesis de la transdiferenciación. A la época, Roach en 1992, describía condrocitos hipertróficos, pero de menor tamaño, con un citoplasma reducido y más basófilos, del mismo modo como lo observado en este estudio. La talla pequeña del condrocito inmerso en una matriz con características óseas se debería a la división celular que sufriría el condrocito hipertrófico que está en proceso de transdiferenciación. (Roach, 1992; Roach y cols., 1995).

Paralelamente otros estudios complementarios apoyan la transdiferenciación de células condrogénicas a osteogénicas en contextos de reparación ósea, afirmando que entre el 5-12% de los condrocitos siguen la vía de diferenciación canónica, apoptótica (Aghajanian y Mohan, 2018; Tsang y cols, 2015).

En la actualidad, el proceso de transdiferenciación se ha descrito en varios contextos gracias a nuevos métodos como el rastreo de linaje genético, durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta (cóndilo mandibular) y en contextos de osificación de procesos reparativos ayudando a demostrar y caracterizar ese mecanismo de osificación endocondral no canónico (Aghajanian y Mohan, 2018; Hinton y cols, 2017), pero ha sido poco descrito en la regeneración de tejidos maxilofaciales utilizando poblaciones de células progenitoras humanas.

Entonces las preguntas que hoy en día se plantean van dirigidas hacia entender ¿quién y cómo se comanda o se decide por un mecanismo u otro? ¿Será el tejido hospedero quien decide y determina los mecanismos de reparación o serán las poblaciones celulares implantadas quienes siguen su “imprinting” y activan las vías de señalización necesarias para reparar un tejido? Y ¿cuál sería el mecanismo más indicado o beneficioso al pensar en terapias regenerativas?

#### **7.4 SOBRE EL POSIBLE ORIGEN HUMANO DEL CARTILAGO HALLADO DENTRO DEL DEFECTO CON TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA**

En los párrafos anteriores se discutió que el tejido cartilaginoso jugaba un rol dentro del proceso reparativo. Para determinar el origen de esas células que participan en la regeneración del defecto se utilizaron anticuerpos contra las proteínas humanas: anti-vimentina, anti-COL2A1 y anti-Ocn.

El anticuerpo anti-vimentina humana demostró la presencia de células de origen humano al interior del defecto (Figura 22) así como algunos de los focos de tejido cartilaginoso que pudieran ser de origen humano. Para complementar ese resultado, la reacción del anticuerpo anti-COL2A1 humano arrojó positivo para el cartílago al interior del defecto, confirmando las características condrocitarias observada con las coloraciones O-safranina y Azul Alcian. Sin embargo, también resultó positivo para el cartílago nativo de la articulación temporomandibular del ratón. El colágeno tipo II es una proteína altamente conservada entre las especies, lo que podría explicar este marcaje, además el anticuerpo utilizado es de tipo policlonal y presenta una mayor posibilidad de reactividad cruzada debido al reconocimiento de múltiples epítomos (Proteintech Group, 2017), nuevos experimentos serían recomendables con este anticuerpo.

Para complementar los resultados anteriores en cuanto al origen y para apoyar la observación de la activación de dos vías endocondrales: canónica y transdiferenciación, se utilizó el anticuerpo anti-Ocn humana. El marcaje positivo para la Ocn humana de los condrocitos hipertróficos, pero no en el hueso nativo del ratón, demuestra que los condrocitos que participan en la regeneración del defecto son de origen humano por medio de las hDPSCs y que participan mediante un mecanismo de transdiferenciación de condrocitos a osteoblastos (Park y cols, 2015). Esto confirma la hipótesis de que las hDPSCs inducen la formación de un tejido cartilaginoso en el proceso reparativo del defecto crítico de calota de ratón.

Paralelamente a las células positivas para la Ocn humana, hubo células con características condrocitarias negativas (Figura 24), lo que puede sugerir por un lado que: 1) el proceso de reparación ósea mediante osificación endocondral tiene carácter de cooperativo, con una combinación de tejidos aportados tanto por el huésped como por las hDPSCs. 2) Las células condrogénicas negativas para la Ocn-humana no sufrieron el proceso de transdiferenciación, sino siguieron la vía

clásica, esto correspondería a algunos condrocitos aparentemente apoptóticos observados en los cortes y para corroborar afirmación sería interesante realizar marcajes para detección de apoptosis (TUNEL o Caspasas)

## **7.5 APLICACIONES CLÍNICAS.**

Las futuras terapias para las fracturas sin consolidación implican estrategias que utilizan células madre mesenquimales derivadas de pacientes y/o factores de crecimiento, para promover la formación ósea directa en el sitio de la fractura. Sin embargo, no se ha demostrado que estas estrategias sean efectivas o puedan ser predecibles en grandes defectos óseos (Ho-Shui-Ling y cols., 2018). Dado que la proliferación y diferenciación de condrocitos predominan en las primeras etapas del proceso de reparación de la fractura, quizás, podría ser más prudente expandir los condrocitos existentes y convertirlos en osteoblastos capaces de realizar todas las funciones necesarias para resorber cartílago y producir hueso como lo realizan los condrocitos epifisarios en la osificación secundaria, considerando que al interior de las lesiones hay un cierto grado de hipoxia que es más adecuado para una población condrocitaria.

Nuestra comprensión de los eventos moleculares que conducen la conversión de condrocitos hacia osteoblastos implicados en el control temporal y espacial de los eventos de diferenciación, podría conducir a posibles avances en términos de identificación de nuevas estrategias terapéuticas para curar fracturas sin consolidación o de talla crítica, manipulando las señales que controlan estos eventos para obtener un beneficio terapéutico en el tratamiento de lesiones y enfermedades articulares, cuando el cartílago articular está dañado o atrófico.

Si bien la osificación endocondral canónica es el paradigma y mecanismo conocido desde hace mucho tiempo, el mecanismo de transdiferenciación puede estar trabajando junto con la osificación endocondral canónica para promover la salud ósea. De hecho, es posible que estos dos procesos se manifiesten conjuntamente, colaborativamente o que cada proceso tenga una preferencia temporal y regional. A medida que los estudios innovadores se vuelven más frecuentes en la literatura, la contribución del tejido cartilaginoso al hueso nuevo

puede proporcionar nuevas vías para la terapéutica de diversas enfermedades osteodegenerativas y metodologías de curación de fracturas.

Lo que gatilla la elección de un mecanismo u otro, puede a la fecha, solo ser especulado. Es evidente que el cambio de las condiciones fisiológicas: tipo de lesión, hipoxia, inflamación, harán reaccionar a los tejidos y a las células, pero aún no está claro, exactamente, cuáles son los factores que inclinan la formación ósea mediante un mecanismo de osificación endomembranoso o un mecanismo endocondral clásico canónico o por transdiferenciación. Las ventajas o desventajas de cada mecanismo pueden ser discutidos ampliamente, y por lo tanto, también deben ser discutidos cual o cuales son los enfoques para elegir o fomentar un mecanismo sobre otro, teniendo en mente un rápido, adecuado o predecible proceso de regeneración tisular.

La importancia de identificar si son las hDPSCs las que sintetizan el nuevo tejido, o si estas hDPSCs liberan factores que estimulan la síntesis de nuevo tejido por parte del hospedero (acción paracrina) tiene relevancia en la estrategia terapéutica. En el caso de que sean las células las responsables directas de una síntesis de tejido el equipo clínico debería organizar sus esfuerzos para producir poblaciones celulares competentes para tal fin. En el caso de tener una acción paracrina los esfuerzos deberían estar enfocados en identificar estas moléculas y eventualmente suministrarlas como fármacos o moléculas bioactivas.

## 8 CONCLUSIONES

- 1) En un defecto crítico de calota en el modelo de ratón presentado en este estudio, las hDPSCs inducen un proceso reparativo de osificación principalmente de tipo endocondral en varias de sus formas, extendiéndose desde el centro hacia la periferia del defecto.
- 2) La evidencia inmunohistoquímica presentada en este trabajo permite establecer el origen humano del tejido cartilaginoso.
- 3) Serían recomendables más estudios de análisis molecular con otros marcadores (condrocitos no hipertróficos: Colágeno II, colágeno XI y Agrecan; Condrocitos hipertróficos: colágeno X y VEGF; Sox9), anticuerpos monoclonales, o estudios de seguimiento genético de las hDPSCs permitirían establecer bases más sólidas para determinar el origen del tejido cartilaginoso observado.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abzhanov, A., Rodda, S. J., McMahon, A. P., & Tabin, C. J. (2007). Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development (Cambridge, England)*, 134(17), 3133–3144. <https://doi.org/10.1242/dev.002709>
- Aghajanian, P., & Mohan, S. (2018). The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone research*, 6, 19. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0021-z>
- Akter, F. (2016). *Tissue engineering made easy. Chapter 1 - What is Tissue Engineering?* Cambridge, UK.
- Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(7), 1338–1345. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>
- Ankrum, J. A., Ong, J. F., & Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology*, 32(3), 252–260. <https://doi.org/10.1038/nbt.2816>
- Arana-Chavez, V. E., & Nanci, A. (2001). High-resolution immunocytochemistry of noncollagenous matrix proteins in rat mandibles processed with microwave irradiation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 49(9), 1099–1109. <https://doi.org/10.1177/002215540104900904>
- Arias, ME, & Felmer, R. (2009). Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. *Archivos de medicina veterinaria*, 41(3), 185–195. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2009000300002>
- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A., & Gronthos, S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(7), 1787–1795. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0979>
- Awad, H. A., Butler, D. L., Boivin, G. P., Smith, F. N., Malaviya, P., Huibregtse, B., & Caplan, A. I. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue engineering*, 5(3), 267–277. <https://doi.org/10.1089/ten.1999.5.267>
- Beddington S. P. (1981). An autoradiographic analysis of the potency of embryonic ectoderm in the 8th day postimplantation mouse embryo. *Journal of embryology and experimental morphology*, 64, 87–104.
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., & Nikbin, B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC cell biology*, 7, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-14>
- Bornes, T. D., Jomha, N. M., Mulet-Sierra, A., & Adesida, A. B. (2015). Hypoxic culture of bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells differentially enhances in vitro chondrogenesis within cell-seeded collagen and hyaluronic acid porous scaffolds. *Stem cell research & therapy*, 6(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0075-4>
- Bosch, C., Melsen, B., & Vargervik, K. (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *The Journal of craniofacial surgery*, 9(4), 310–316. <https://doi.org/10.1097/00001665-199807000-00004>
- Brüel, A., Christensen, E. I., Qvortrup, K., Trantum-Jensen, J., & Geneser, F. (2014). Geneser Histología. Capítulo 12 – Tejido esquelético. In *Editorial medica panamericana*.
- Caplan, A. I., & Correa, D. (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell*, 9(1), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.008>
- Carlson, B. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 5a ed. Capítulo 9 – Sistema tegumentario, esquelético y muscular. Barcelona, Elsevier, 2014.

- Cavanzo FJ. (1985) Marcadores Tumorales E Enmunohistoquímica En Patología Quirúrgica Acta Médica Colombiana Vol 10 No. 6 (Noviembre-Diciembre)
- Chamieh, F., Collignon, A. M., Coyac, B. R., Lesieur, J., Ribes, S., Sadoine, J., Llorens, A., Nicoletti, A., Letourneur, D., Colombier, M. L., Nazhat, S. N., Bouchard, P., Chaussain, C., & Rochefort, G. Y. (2016). Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Scientific reports*, 6, 38814. <https://doi.org/10.1038/srep38814>
- Chan, C. K., Chen, C. C., Luppen, C. A., Kim, J. B., DeBoer, A. T., Wei, K., Helms, J. A., Kuo, C. J., Kraft, D. L., & Weissman, I. L. (2009). Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature*, 457(7228), 490–494. <https://doi.org/10.1038/nature07547>
- Chan, C. K., Seo, E. Y., Chen, J. Y., Lo, D., McArdle, A., Sinha, R., Tevlin, R., Seita, J., Vincent-Tompkins, J., Wearda, T., Lu, W. J., Senarath-Yapa, K., Chung, M. T., Marecic, O., Tran, M., Yan, K. S., Upton, R., Walmsley, G. G., Lee, A. S., Sahoo, D., ... Longaker, M. T. (2015). Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell*, 160(1-2), 285–298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.002>
- Collignon, A. M., Castillo-Dali, G., Gomez, E., Guilbert, T., Lesieur, J., Nicoletti, A., Acuna-Mendoza, S., Letourneur, D., Chaussain, C., Rochefort, G. Y., & Poliard, A. (2019). Mouse Wnt1-CRE-RosaTomato Dental Pulp Stem Cells Directly Contribute to the Calvarial Bone Regeneration Process. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 37(5), 701–711. <https://doi.org/10.1002/stem.2973>
- Collignon, A. M., Lesieur, J., Anizan, N., Azzouna, R. B., Poliard, A., Gorin, C., Letourneur, D., Chaussain, C., Rouzet, F., & Rochefort, G. Y. (2018). Early angiogenesis detected by PET imaging with <sup>64</sup>Cu-NODAGA-RGD is predictive of bone critical defect repair. *Acta biomaterialia*, 82, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.008>
- Colnot C. (2009). Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 24(2), 274–282. <https://doi.org/10.1359/jbmr.081003>
- Colnot, C., Huang, S., & Helms, J. (2006). Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(3), 557–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.079>
- Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., Smith, A. J., & Nör, J. E. (2008). Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of endodontics*, 34(8), 962–969. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.04.009>
- Courtot, A. M., Magniez, A., Oudrhiri, N., Féraud, O., Bacci, J., Gobbo, E., Proust, S., Turhan, A. G., & Bennaceur-Griscelli, A. (2014). Morphological analysis of human induced pluripotent stem cells during induced differentiation and reverse programming. *BioResearch open access*, 3(5), 206–216. <https://doi.org/10.1089/biores.2014.0028>
- d'Aquino, R., De Rosa, A., Laino, G., Caruso, F., Guida, L., Rullo, R., Checchi, V., Laino, L., Tirino, V., & Papaccio, G. (2009). Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 312B(5), 408–415. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21263>
- d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., & Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell death and differentiation*, 14(6), 1162–1171. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402121>
- Danielsson, F., Peterson, M. K., Caldeira Araújo, H., Lautenschläger, F., & Gad, A. (2018). Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells*, 7(10), 147. <https://doi.org/10.3390/cells7100147>
- Derx, P., Nigg, A. L., Bosman, F. T., Birkenhäger-Frenkel, D. H., Houtsmuller, A. B., Pols, H. A., & van Leeuwen, J. P. (1998). Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone*, 22(4), 367–373. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(97\)00299-8](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(97)00299-8)

- Edwards, R. G., & Beard, H. K. (1997). Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molecular human reproduction*, 3(10), 863–905. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.10.863>
- Erices, A., Conget, P., & Minguell, J. J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology*, 109(1), 235–242. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x>
- Farnum, C. E., Turgai, J., & Wilsman, N. J. (1990). Visualization of living terminal hypertrophic chondrocytes of growth plate cartilage in situ by differential interference contrast microscopy and time-lapse cinematography. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 8(5), 750–763. <https://doi.org/10.1002/jor.1100080517>
- Fernández Wyss Ian (2019). “Implementación de un modelo in vivo de defecto crítico de calota para regeneración de tejidos duros.” Trabajo de Investigación Requisito para Optar al Título de Cirujano-Dentista. Adscrito a Proyecto CONICYT PAI N° 79160076 Santiago – Chile.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera-Gracia, M. A., del-Canto-Pingarrón, M., & Blanco-Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 11(1), E47–E51.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*, 2015, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, 3(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
- Fuentes Pino Edgar (2021). “Cultivo y aplicación de células madre pulpares humanas en proceso reparativo, modelo in vivo, un análisis descriptivo.” Trabajo de Investigación Requisito para Optar al Título de Cirujano-Dentista. Adscrito a Proyecto CONICYT PAI N° 79160076 Santiago – Chile. EN CURSO
- Gandia, C., Armiñan, A., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, M. D., Sanchez-Torrijos, J., Payá, R., Mirabet, V., Carbonell-Uberos, F., Llop, M., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(3), 638–645. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0484>
- Gao, X., Lu, A., Tang, Y., Schnependahl, J., Liebowitz, A. B., Scibetta, A. C., Morris, E. R., Cheng, H., Huard, C., Amra, S., Wang, B., Hall, M. A., Lowe, W. R., & Huard, J. (2018). Influences of donor and host age on human muscle-derived stem cell-mediated bone regeneration. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 316. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1066-z>
- Garvican, E. R., Vaughan-Thomas, A., Innes, J. F., & Clegg, P. D. (2010). Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 185(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.011>
- Gawlitza, D., Farrell, E., Malda, J., Creemers, L. B., Alblas, J., & Dhert, W. J. (2010). Modulating endochondral ossification of multipotent stromal cells for bone regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 16(4), 385–395. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0712>
- Gerstenfeld, L. C., & Shapiro, F. D. (1996). Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *Journal of cellular biochemistry*, 62(1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(199607\)62:1%3C1::AID-JCB1%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(199607)62:1%3C1::AID-JCB1%3E3.0.CO;2-X)
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., & Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 88(5), 873–884. <https://doi.org/10.1002/jcb.10435>
- Giuliani, A., Manescu, A., Langer, M., Rustichelli, F., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Laino, L., d'Aquino, R., Tirino, V., & Papaccio, G. (2013). Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather

- than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem cells translational medicine*, 2(4), 316–324. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0136>
- Griffith, L. G., & Naughton, G. (2002). Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1009–1014. <https://doi.org/10.1126/science.1069210>
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*, 81(8), 531–535. <https://doi.org/10.1177/154405910208100806>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Hashemi-Beni, B., Khoroushi, M., Foroughi, M. R., Karbasi, S., & Khademi, A. A. (2017). Tissue engineering: Dentin - pulp complex regeneration approaches (A review). *Tissue & cell*, 49(5), 552–564. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.07.002>
- Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E., & Gundberg, C. M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological reviews*, 69(3), 990–1047. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.990>
- Hinton, R. J., Jing, Y., Jing, J., & Feng, J. Q. (2017). Roles of Chondrocytes in Endochondral Bone Formation and Fracture Repair. *Journal of dental research*, 96(1), 23–30. <https://doi.org/10.1177/0022034516668321>
- Ho-Shui-Ling, A., Bolander, J., Rustom, L. E., Johnson, A. W., Luyten, F. P., & Picart, C. (2018). Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*, 180, 143–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>
- Hofstetter, C. P., Schwarz, E. J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D. J., & Olson, L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2199–2204. <https://doi.org/10.1073/pnas.042678299>
- Hu, D. P., Ferro, F., Yang, F., Taylor, A. J., Chang, W., Miclau, T., Marcucio, R. S., & Bahney, C. S. (2017). Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development (Cambridge, England)*, 144(2), 221–234. <https://doi.org/10.1242/dev.130807>
- Huang, G. T., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9), 792–806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
- Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Tomokiyo, A., Matsushita, K., & Nakashima, M. (2006). Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(11), 2493–2503. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0161>
- Issa, João Paulo Mardegan, Tiossi, Rodrigo, Mello, Amaro Sergio da Silva, & Iyomasa, Mamie Mizusaki. (2007). Regulation of the Bone Healing Process by Hormones. *International Journal of Morphology*, 25(2), 385-392. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022007000200025>
- Jing, Y., Zhou, X., Han, X., Jing, J., von der Mark, K., Wang, J., de Crombrughe, B., Hinton, R. J., & Feng, J. Q. (2015). Chondrocytes Directly Transform into Bone Cells in Mandibular Condyle Growth. *Journal of dental research*, 94(12), 1668–1675. <https://doi.org/10.1177/0022034515598135>
- Kahn, A. J., & Simmons, D. J. (1977). Chondrocyte-to-osteocyte transformation in grafts of perichondrium-free epiphyseal cartilage. *Clinical orthopaedics and related research*, (129), 299–304. <https://doi.org/10.1097/00003086-197711000-00042>
- Kerkis, I., & Caplan, A. I. (2012). Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 18(2), 129–138. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0327>

- Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., & Robey, P. G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 12(9), 1335–1347. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.9.1335>
- Langer R. (2009). Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 21(32-33), 3235–3236. <https://doi.org/10.1002/adma.200902589>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S. E., & Ringdén, O. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*, 57(1), 11–20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x>
- Leyendecker Junior, A., Gomes Pinheiro, C. C., Lazzaretti Fernandes, T., & Franco Bueno, D. (2018). The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731417752766. <https://doi.org/10.1177/2041731417752766>
- Luo, L., He, Y., Wang, X., Key, B., Lee, B. H., Li, H., & Ye, Q. (2018). Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. *Stem cells international*, 2018, 1731289. <https://doi.org/10.1155/2018/1731289>
- Maraldi, T., Riccio, M., Pisciotta, A., Zavatti, M., Carnevale, G., Beretti, F., La Sala, G. B., Motta, A., & De Pol, A. (2013). 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*, 4(3), 53. <https://doi.org/10.1186/scrt203>
- Miller, G. J., Gerstenfeld, L. C., & Morgan, E. F. (2015). Mechanical microenvironments and protein expression associated with formation of different skeletal tissues during bone healing. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 14(6), 1239–1253. <https://doi.org/10.1007/s10237-015-0670-4>
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–5812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
- Morsczeck, C., & Reichert, T. E. (2018). Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. *Expert opinion on biological therapy*, 18(2), 187–196. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1402004>
- Morsczeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., & Hoffmann, K. H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(2), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.12.004>
- Musaelyan, A., Lapin, S., Nazarov, V., Tkachenko, O., Gilburd, B., Mazing, A., Mikhailova, L., & Shoenfeld, Y. (2018). Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunity reviews*, 17(9), 926–934. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.04.004>
- Nogami, H., & Urist, M. R. (1975). Transmembrane bone matrix gelatin-induced differentiation of bone. *Calcified tissue research*, 19(2), 153–163. <https://doi.org/10.1007/BF02563999>
- Ono, N., Ono, W., Nagasawa, T., & Kronenberg, H. M. (2014). A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones. *Nature cell biology*, 16(12), 1157–1167. <https://doi.org/10.1038/ncb3067>
- Park, J., Gebhardt, M., Golovchenko, S., Perez-Branguli, F., Hattori, T., Hartmann, C., Zhou, X., deCrombrughe, B., Stock, M., Schneider, H., & von der Mark, K. (2015). Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage. *Biology open*, 4(5), 608–621. <https://doi.org/10.1242/bio.201411031>

- Percival, C. J., & Richtsmeier, J. T. (2013). Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 242(8), 909–922. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23992>
- Pereira, R. F., Halford, K. W., O'Hara, M. D., Leeper, D. B., Sokolov, B. P., Pollard, M. D., Bagasra, O., & Prockop, D. J. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), 4857–4861. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4857>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Proteintech Group. (2017, 13 diciembre). Polyclonal vs. monoclonal antibodies. <https://www.ptglab.com/news/blog/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies/>
- Riminucci, M., Bradbeer, J. N., Corsi, A., Gentili, C., Descalzi, F., Cancedda, R., & Bianco, P. (1998). Vis-à-vis cells and the priming of bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 13(12), 1852–1861. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.12.1852>
- Roach H. I. (1992). Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix. *Bone and mineral*, 19(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(92\)90840-a](https://doi.org/10.1016/0169-6009(92)90840-a)
- Roach, H. I., Erenpreisa, J., & Aigner, T. (1995). Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *The Journal of cell biology*, 131(2), 483–494. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.483>
- Sakagami, N., Ono, W., & Ono, N. (2017). Diverse contribution of Col2a1-expressing cells to the craniofacial skeletal cell lineages. *Orthodontics & craniofacial research*, 20 Suppl 1(Suppl 1), 44–49. <https://doi.org/10.1111/ocr.12168>
- Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., Hibi, H., Kadomatsu, K., Ishiguro, N., & Ueda, M. (2012). Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 80–90. <https://doi.org/10.1172/JCI59251>
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., & Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 109(1), 228–234. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246>
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in cell & developmental biology*, 19(5), 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.07.004>
- Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*, (205), 299–308.
- Seo, B. M., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuri, T., Akiyama, K., Lee, J. S., & Shi, S. (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral diseases*, 14(5), 428–434. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01396.x>
- Shafiee, A., & Atala, A. (2017). Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annual review of medicine*, 68, 29–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-102715-092331>
- Shapiro, I. M., Adams, C. S., Freeman, T., & Srinivas, V. (2005). Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 75(4), 330–339. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20057>
- Shin, S., Mitalipova, M., Noggle, S., Tibbitts, D., Venable, A., Rao, R., & Stice, S. L. (2006). Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined

- adherent culture conditions. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 24(1), 125–138. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0150>
- Silvério, K. G., Rodrigues, T. L., Coletta, R. D., Benevides, L., Da Silva, J. S., Casati, M. Z., Sallum, E. A., & Nociti, F. H., Jr (2010). Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *Journal of periodontology*, 81(8), 1207–1215. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.090729>
- Smok C., Meruane M., Rojas M. (2014). Implantation of autologous stem cells derived from adipose tissue in rat bone fractures. *International Journal of Medical and Surgical Sciences*, 1(2):105-15.
- Staines, K. A., MacRae, V. E., & Farquharson, C. (2012). The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *The Journal of endocrinology*, 214(3), 241–255. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0143>
- Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F. V., Jr, Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J. L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H. P., Carano, R. A., & Filvaroff, E. H. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 9656–9661. <https://doi.org/10.1073/pnas.152324099>
- Subbiah, R., & Guldberg, R. E. (2019). Materials Science and Design Principles of Growth Factor Delivery Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Advanced healthcare materials*, 8(1), e1801000. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801000>
- Sugiyama, M., Iohara, K., Wakita, H., Hattori, H., Ueda, M., Matsushita, K., & Nakashima, M. (2011). Dental pulp-derived CD31<sup>-</sup>/CD146<sup>-</sup> side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue engineering. Part A*, 17(9-10), 1303–1311. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0306>
- Suzuki, T., Sakai, D., Osumi, N., Wada, H., & Wakamatsu, Y. (2006). Sox genes regulate type 2 collagen expression in avian neural crest cells. *Development, growth & differentiation*, 48(8), 477–486. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00886.x>
- Zsulc P. (2020). Biochemical bone turnover markers in hormonal disorders in adults: a narrative review. *Journal of endocrinological investigation*, 43(10), 1409–1427. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01269-7>
- Terzic, A., & Nelson, T. J. (2013). Regenerative medicine primer. *Mayo Clinic proceedings*, 88(7), 766–775. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.04.017>
- The Jackson Laboratory. (2020 fecha de última consulta). NOD.Cg-Prkdc /J. <https://www.jax.org/Strain/UrlAsPDF/001303>
- Tsang, K. Y., Chan, D., & Cheah, K. S. (2015). Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: death or lineage extension?. *Development, growth & differentiation*, 57(2), 179–192. <https://doi.org/10.1111/dgd.12203>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., ... Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6220), 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5), 639–648. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00208-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00208-9)
- Wakitani, S., Saito, T., & Caplan, A. I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & nerve*, 18(12), 1417–1426. <https://doi.org/10.1002/mus.880181212>
- Wang, D., Gilbert, J. R., Zhang, X., Zhao, B., Ker, D., & Cooper, G. M. (2020). Calvarial Versus Long Bone: Implications for Tailoring Skeletal Tissue Engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 26(1), 46–63. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2018.0353>

- White A, Wallis G. Endochondral ossification: a delicate balance between growth and mineralisation. *Curr Biol.* 2001 Aug 7;11(15):R589-91. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00359-1. PMID: 11516962.
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*, 61(4), 364–370. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000815\)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C)
- Xing, W., Cheng, S., Wergedal, J., & Mohan, S. (2014). Epiphyseal chondrocyte secondary ossification centers require thyroid hormone activation of Indian hedgehog and osterix signaling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 29(10), 2262–2275. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2256>
- Yamagata, M., Yamamoto, A., Kako, E., Kaneko, N., Matsubara, K., Sakai, K., Sawamoto, K., & Ueda, M. (2013). Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke*, 44(2), 551–554. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.676759>
- Yang, G., Zhu, L., Hou, N., Lan, Y., Wu, X. M., Zhou, B., Teng, Y., & Yang, X. (2014). Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell research*, 24(10), 1266–1269. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.111>
- Yang, L., Tsang, K. Y., Tang, H. C., Chan, D., & Cheah, K. S. (2014). Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), 12097–12102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302703111>
- Yang, S., Wei, D., Wang, D., Phimphilai, M., Krebsbach, P. H., & Franceschi, R. T. (2003). In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(4), 705–715. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.705>
- Yu, Y. Y., Lieu, S., Lu, C., & Colnot, C. (2010). Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone*, 47(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.03.012>
- Zhang, X., Xie, C., Lin, A. S., Ito, H., Awad, H., Lieberman, J. R., Rubery, P. T., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J., & Goldberg, R. E. (2005). Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(12), 2124–2137. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050806>
- Zhou, B. O., Yue, R., Murphy, M. M., Peyer, J. G., & Morrison, S. J. (2014). Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell stem cell*, 15(2), 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.008>
- Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., & de Crombrughe, B. (2014). Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS genetics*, 10(12), e1004820. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004820>
- Zou, L., Zhang, Y., Liu, X., Chen, J., & Zhang, Q. (2019). Biomimetic mineralization on natural and synthetic polymers to prepare hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 178, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.004>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

## 10 ANEXOS

### 10.1 ANEXO 1: AUTORIZACIÓN COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOSEGURIDAD, CAMPUS NORTE



Comité Institucional de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte  
FDO N°89

Santiago, 15 de Noviembre de 2016.

#### C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación titulado "Células madres aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales". El Investigador Responsable de este proyecto es Dra. Soledad Acuña Mendoza.

Todos los ensayos propuestos a realizar del tipo bioquímicos como la obtención de las pulpas dentarias de molares y premolares/terceros molares provenientes de ratones y humanos, respectivamente, así como inmunohistoquímica se procesarán en el Laboratorio de Anatomía Patológica; los ensayos moleculares como PCR en tiempo real se realizarán en el Laboratorio de Biología Periodontal y, por último, los ensayos con los ratones BalbC y ratones transgénicos (*Mus musculus* C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J) se realizarán en la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología. El personal técnico que manipulará las muestras biológicas y los animales se encuentra debidamente entrenados en esta área. Además, ellos estarán bajo la supervisión de la Dra. Acuña.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico, químico y animales de experimentación a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Acuña para ser presentado al Concurso Nacional Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia (Programa de Atracción e Inserción de Capital Humano Avanzado, PAI) 2016.

Dr. Mario Chiong  
Secretario

Dra. Carla Lozano M.  
Presidenta

## 10.2 ANEXO 2: AUTORIZACIÓN COMITÉ DE INSTITUCIONAL DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN



UNIVERSIDAD DE CHILE  
COMITÉ INSTITUCIONAL de CUIDADO y USO de ANIMALES (CICUA)

1

### PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES (Debe ser presentado en español)

#### Uso Interno

Investigador: Dra. Soledad Acuña  
Código CICUA: FOUGH111601



#### A. ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS

**A.1. Título y tiempo de ejecución del proyecto presentado (mes y año de inicio y término).**  
Células madres aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales

Mes de inicio: marzo 2017. Mes de término: febrero 2020

**A.2. Tipo de proyecto y actividad (marque con una cruz)**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**  **DOCENCIA:**  **TESIS:**  **OTRO:**

**Fuente Financiamiento (Nombre y n°):**

Programa para la inserción a la academia (PAI) 2016

**A.3. Nombre del Investigador Responsable:** Soledad Acuña Mendoza

**Nombre Patrocinado, si existiese (Investigador externo, Postdoctorante, Tesista):**

**A.4. Teléfono(s) de contacto:** Numero de departamento: (56-2)2 978 1791

En caso de urgencia me puede llamar al celular 0033 658242418 (cuando viva en Chile y tenga numero chileno lo informaré a la Plataforma Experimental)

**e-mail:** soledad.acuna@u.uchile.cl

**A.5. Mencione el Laboratorio y Departamento de la Facultad en la que se desarrollará el trabajo con animales** Laboratorio de histología y patología, Departamento de Patología y medicina oral.

**A.6. Contacto en caso de una emergencia con los animales en horario no laboral.**

Nombre: Soledad Acuña Mendoza Teléfono: 0056 222675372 (casa del representante legal en Chile)  
Cuando tenga casa y teléfono en Chile lo comunicaré a la Plataforma de Experimentación.

### 10.3 ANEXO 3: AUTORIZACIÓN COMITÉ DE ÉTICA CIENTÍFICO



#### INFORME

PROYECTO: "Células madres aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales",

Investigadora Responsable: Dra. Soledad Acuña.

Se justifica el estudio debido a que el IP declara el uso exclusivo de las células madres que extraerá de 15 dientes donados por pacientes que consientan mediante CI firmado, la IP declara manejo estricto y confidencial de los datos

Visado Consentimiento:

El CI cumple con los requisitos solicitados por este comité de ética

  
Prof. Dr. Eduardo Fernández Godoy  
Presidente Comité Etico Científico



Santiago, noviembre 14 de 2016.

## 10.4 ANEXO 4: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



Universidad de Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Odontología – Departamento de Patología y Medicina Oral  
Ed: 17/11/2016

Facultad de Odontología Proyecto de Investigación PAI  
Académico Responsable: Soledad Acuña M

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACION DE DIENTES PARA INVESTIGACIÓN

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

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

Se le dará una copia del Documento completo de Consentimiento Informado

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

#### I. INFORMACION

##### Antecedentes Generales

Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio patrocinado por Conicyt, titulado "Células madres aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales". Este proyecto de investigación se enmarca en una estrategia institucional de la Facultad de Odontología para crear una nueva línea de investigación en la utilización de células madres para la terapia y regeneración tisular. El Investigador Responsable es la Dra. Soledad Acuña Mendoza, académica de nuestra Facultad. Para iniciar la nueva línea de investigación de células madres, nos focalizaremos en implementar técnicas de cultivo estandarizadas de células pulpares humanas (de diente temporal y permanente) y de ratón. Luego, las células madres obtenidas serán utilizadas en modelos animales para sentar las bases del estudio y desarrollo de técnicas en regeneración/repación tisular. Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

##### Procedimiento de toma de las muestras

Se incluirán pacientes agendados para exodoncia de terceros molares, premolares o piezas temporales sanas en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología previa autorización del Cirujano tratante y de la firma del presente consentimiento informado visado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Los dientes recién extraídos serán lavados en solución Hanks y transportados en medio de cultivo DMEM/F12 en frío al laboratorio para su procesamiento.

El total de muestras y datos obtenidos serán registrados e identificados por el investigador responsable mediante códigos para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales y se utilizarán códigos para mantener oculta la identidad de los participantes. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable.



Dpto. de Odontología Patología/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 1903



**Beneficios de participar en el estudio**

Se les dará a conocer y se consignará en su ficha clínica los resultados de los análisis que resultan de las muestras biológicas tomadas a los pacientes.

**Riesgos de participar el estudio**

No hay riesgo para para el paciente. En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable: Soledad Acuña, son: 9781700.

El presente protocolo no tiene costo para el paciente y todos los eventos adversos serán resueltos sin costo para el paciente. Se señala además que en el presente estudio no hay retribución económica.

**Procedimiento de resguardo de la información personal**

En conformidad a las leyes vigentes, la información recogida a través del examen o de la entrevista, al igual que sus datos personales o los de su representado, se analizarán y archivarán de manera codificada para garantizar su confidencialidad, ya que los datos serán utilizados estrictamente para fines científicos y que aún tras la publicación de los resultados se continuará con la debida reserva. No obstante, el equipo de investigación, la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile o sus representantes, y el Comité de Ética Científico (CEC) podrán acceder a los datos confidenciales después de haber pasado por el proceso de anonimación, lo que permite que sus datos no sean identificados por su nombre.

La información que Ud. nos facilite sólo será utilizada o revelada para la realización de este estudio de investigación y los resultados que se obtengan serán presentados en ponencias de congresos y publicaciones escritas, resguardando la confidencialidad de los participantes.

Para mayor detalle del protocolo utilizado para el resguardo de información personal, leer apartado de Protocolo de Protección de Datos Nominativos.

**Información complementaria**

Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, acudiendo calle Olivos N°943, Independencia, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Departamento de Patología y Medicina Oral y comunicarse con la Dra. Acuña los días martes, jueves o viernes de 8 a 12 horas o al teléfono 29781839.

También puede contactarse con el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología cuyo presidente es el Dr. Eduardo Fernández Godoy, al fono 29781703, en horarios de oficina o al mail [cec.fouch@odontologia.uchile.cl](mailto:cec.fouch@odontologia.uchile.cl).





UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Odontología – Departamento de Patología y Medicina Oral  
Ed: 17/11/2016

### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaro haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mi entregados.

Declaro haber leído y comprendido el protocolo donde se me explica como mis datos personales van ser resguardados, analizados y archivados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el Presidente del Comité de Ética de la Investigación de la Facultad, Dr. Eduardo Fernández.

#### Identificación Paciente

Nombre: \_\_\_\_\_  
Rut: \_\_\_\_\_  
Fono: \_\_\_\_\_  
Firma \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

#### Identificación Testigo

Nombre \_\_\_\_\_  
Fono: \_\_\_\_\_  
Firma \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

#### Identificación del Director de la Clínica Odontológica

Nombre \_\_\_\_\_  
Fono: \_\_\_\_\_  
Firma \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

#### Identificación Investigador Responsable

Nombre: \_\_\_\_\_  
Fono: \_\_\_\_\_  
Firma \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_



Dpto. de Odontología Patología/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 1903

---

ANEXO 5: Desmineralización, deshidratación e inclusión en parafina de muestras  
Desmineralización

## **10.5 ANEXO 5: DESMINERALIZACIÓN, DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN DE MUESTRAS EN PARAFINA**

### **10.5.1 Desmineralización**

Las muestras serán colocadas en un contenedor y cubiertas por completo con solución acuosa de EDTA al 10%, pH 7,4 y sometidas a radiación de microondas por 108 ciclos de 2 min de duración. Durante todo el tiempo el contenedor con las muestras será expuesto a microondas rodeado de abundante hielo para mantener un control de la temperatura de modo que no supere los 37°C. El hielo será reemplazado a medida que sea requerido. La solución de EDTA 10% será cambiada cada 56 ciclos. Al terminar el proceso de desmineralización las muestras serán lavadas profusamente con agua corriente y pasadas a solución de PBS 1X durante 48hr

### **10.5.2 Deshidratación e inclusión en parafina**

Las muestras serán deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (95° y 100°) de la siguiente manera:

- 3 baños de etanol 95°, de 2 horas cada uno.
- 2 baños de etanol 100°, de 3 horas cada uno.
- Posteriormente serán sometidas a 2 baños de Xilol, de 3 horas cada uno para su aclaramiento.

Posteriormente se realizará impregnación de las muestras en 2 baños de parafina de 24 horas cada uno a 60°C para finalmente ser incluidos en cubos de parafina.

## **10.6 ANEXO 6: TÉCNICAS DE TINCIÓN HISTOLÓGICAS: HEMATOXILINA & EOSINA (H/E), AZUL ALCIÁN Y SAFRANINA O**

### **10.6.1 H/E**

- Desparafinar cortes mediante baños de 10 minutos en xileno (2 baños), alcohol 100° (2 baños), alcohol 95° (2 baños) y agua destilada (2 baños) de forma secuencial.
- Sumergir muestras desparafinadas en hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
- Lavar en agua corriente por 3 minutos.
- Sumergir por 3 minutos en eosina
- Lavado con agua corriente por 3 minutos
- Deshidratar los cortes recién teñidos en alcohol en concentraciones crecientes 95° y 100° (2 baños de 10 min c/u) y xilol (2 baños de 10 min c/u), para su montaje final con cubreobjetos usando el polímero de metacrilato Flo-Tex (Laboratorios Lerner).

### **10.6.2 Azul Alcían**

- Desparafinar cortes mediante baños de 10 minutos en xileno (2 baños), alcohol 100° (2 baños), alcohol 95° (2 baños) y agua destilada (2 baños) de forma secuencial.
- Sumergir muestras desparafinadas durante 45 min en Azul Alcían
- Lavado con agua destilada por 1 minuto
- Sumergir por 2 min en hematoxilina
- Lavado en agua corriente por 2 minutos
- Sumergir en eosina por 30 segundos
- Lavado en agua corriente por 2 minutos
- Deshidratar los cortes recién teñidos en alcohol en concentraciones crecientes 95° y 100° (2 baños de 10 min c/u) y xilol (2 baños de 10 min c/u), para su montaje final con cubreobjetos usando el polímero de metacrilato Flo-Tex (Laboratorios Lerner).

### 10.6.3 O-Safranina

- Desparafinar cortes mediante baños de 10 minutos en xileno (2 baños), alcohol 100° (2 baños), alcohol 95° (2 baños) y agua destilada (2 baños) de forma secuencial.
- Sumergir muestras desparafinadas en hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
- Lavado en agua corriente por 10 min
- Sumergir en verde rápido 5 min
- Lavado en ácido acético al 1% por 10 segundos
- Sumergir en Safranina O durante 30 min
- Deshidratar los cortes recién teñidos en alcohol en concentraciones crecientes 95° y 100° (2 baños de 10 min c/u) y xilol (2 baños de 10 min c/u), para su montaje final con cubreobjetos usando el polímero de metacrilato Flo-Tex (Laboratorios Lerner)

## **10.7 ANEXO 7: TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA**

La técnica inmunohistoquímica consistió en lo siguiente:

- Desparafinar en alcoholes descendentes hasta agua destilada
- Lavado en Tampón PBS (10 min)
- Recuperación Antigénica con Buffer citrato pH6 precalentado en vaporera por 10 minutos, incubar 20 minutos y luego enfriar rápidamente en hielo hasta lograr temperatura ambiente.
- Lavado en Tampón PBS (40 min).
- Marcado con lápiz hidrófobo individualizando cada corte por separado
- Bloqueo de peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol al 3% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado en Tampón PBS (30 min)
- Bloqueo 2 de peroxidasa endógena con componente del kit Peroxidasa Blocker por 20 min a T<sup>o</sup> ambiente en cámara húmeda.
- Lavado en Tampón PBS (40 min).
- Incubación con anticuerpo primario COL2A1, Vimentina humana y Osteocalcina humana en concentración 1:250  $\mu$ L, 1:40  $\mu$ L y 1:100  $\mu$ L respectivamente, preparado en Background blocker (Bio SB ImmunoDNA Background blocker BSB0104) en cámara húmeda toda la noche a 4°C.
- Lavado en Tampón PBS (2 cambios de 25 min cada uno)
- Incubación con Biotina (Bio SB Immuno Detector Biotinylated Link BSB0003) 20 min a T<sup>o</sup> ambiente en cámara húmeda
- Lavado en Tampón PBS (60 min)
- Incubación en HRP LABEL (Bio SB ImmunoDetector HRP Label BSB0003) (60 min)
- Lavado en Tampón PBS (60min)
- Incubación en DAB (Bio SB DAB Buffer Substrate BSB0003, Bio SB DAB Chromogen BSB0003) entre 1min a 1min 30seg para COL2A1 y para Vimentina humana a T<sup>o</sup> ambiente
- Lavado en Agua Destilada por 15 min
- Tinción de contraste con hematoxilina
- Hidratación y montaje de la muestra

**10.8 ANEXO 8:**

Tabla  
Resumen de Resultados generales presencia de cartílago

Ratón	Código	Defecto				Tiempo Reparación
		Izquierdo		Derecho		
		Contenido	Cartílago	Contenido	Cartílago	
1	1082292	Carrier+Células	Si	Defecto vacío	No	30 Días
2	94874	Carrier+Células	Si	Carrier+Células	No	30 Días
3	1082297	Carrier+Células	No	Carrier+Células	Si	30 Días
4	1082299	Carrier+Células	Si	Carrier+Células	No	30 Días
5	R2M1	Carrier+Células	No	Carrier+Células	Si	30 Días
6	97929	Carrier+Células	Si	Carrier+Células	Si	90 Días
7	2M2T	Carrier+Células	Si	Defecto Vacío	No	90 Días
8	721089	Carrier+Células	Si	Carrier+Células	No	90 Días
9	R23M	Carrier+Células	No	Carrier+Células	Si	90 Días
10	3037662	Carrier+Células	No	Carrier+Células	No	90 Días