

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE  
DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL *IN VITRO* UTILIZANDO UN  
NANOANDAMIO DE CARBOXIMETILCELULOSA CON  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Por

KAREN LISSETTE VILLARREAL ARIZPE

Como requisito parcial para obtener el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

Diciembre, 2022

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

**PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE  
DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL *IN VITRO* UTILIZANDO UN  
NANOANDAMIO DE CARBOXIMETILCELULOSA CON  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

---

Karen Lissette Villarreal Arizpe  
TESISTA

**COMITÉ DE TESIS**

---

Dra. Gloria Martínez Sandoval  
DIRECTOR DE TESIS

---

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos  
CO-DIRECTOR DE TESIS

---

Dra. María Gabriela Chapa Arizpe  
ASESOR METODOLÓGICO

Aprobación de Tesis de Maestría por Comité Académico

PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE  
DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL *IN VITRO* UTILIZANDO UN  
NANOANDAMIO DE CARBOXIMETILCELULOSA CON  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA

**COMITÉ ACADÉMICO**

---

Presidente

---

Secretario

---

Vocal

## **DEDICATORIA**

**A todos los que hicieron esto posible, gracias.**

## AGRADECIMIENTOS

A **DIOS**, por todas las bendiciones que me has dado y por no dejarme sola cuando así lo he sentido.

A **mi Familia**, por siempre cuidarme y buscar darme lo mejor que han podido, todo lo que tengo y todo lo que he logrado ha sido gracias a ustedes. Gracias por estar para mí siempre que los he necesitado y por amarme a su manera.

A la **Dra. Gloria Martínez Sandoval**, por su asesoramiento en el desarrollo de esta tesis y por tenernos paciencia al explicarnos en clase.

A la **Myriam Angélica de la Garza Ramos**, por su ayuda y asesoramiento en el desarrollo de esta tesis.

A la **Dra. María Gabriela Chapa Arizpe**, por recordarnos que lo más importante de nuestra profesión, es siempre pensar en nuestros pacientes.

Al **Dr. Jesús Rodríguez Pulido**, por tener la paciencia de revisar cada punto y coma de esta tesis y por escuchar nuestras preocupaciones académicas.

A **Victor Urrutía**, porque sin ti esta tesis no hubiera sido posible.

A **CONACYT**, por el apoyo en estos dos años.

A mis compañeros de generación: **Fabian, Alejandra, Tabatha, Sofía, Daniela, Natalia y Daniel** por los momentos de risas, sus consejos y apoyo en los malos momentos, realmente no pude haber pedido una mejor generación, cada uno de ustedes deja una marca en mi corazón.

A mis perío hermanas menores: **Jessica, Danna, Ashley, Alexa, Montse, Lizzie y Fer**, sin ustedes este último año no hubiera sido el mismo, tenerlas en sonda y las salidas con ustedes mejoraron mucho mi vida en el posgrado.

A **Diana**, por todos los momentos juntas, por escucharme y aconsejarme cada vez que lo necesité, por estar para mí sin importar la hora ni el lugar en el que estuvieras. Gracias por ser mi mejor amiga, alguien en quien puedo confiar ciegamente, mi vida sin ti no sería la misma.

A **Oscar**, eres la persona que mi alma necesitaba, sin esperarlo, te convertiste en una persona muy importante para mí. Gracias por tu apoyo y tu paciencia, me haces querer ser una mejor persona y una mejor periodoncista. Gracias por enseñarme lo bonito de la vida, a disfrutar más y no pensar tanto.

## TABLA DE CONTENIDO

### Tabla de contenido

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>4</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>5</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	<b>6</b>
<b>4.1 Periodontitis</b> .....	<b>6</b>
4.1.1 Nueva clasificación periodontal .....	6
4.1.2 Diagnóstico de periodontitis .....	7
4.1.3 Patogenia de la periodontitis .....	8
4.1.4 Tratamiento de la periodontitis. ....	8
<b>4.2 Defectos óseos en la bolsa periodontal</b> .....	<b>9</b>
4.2.1 Defectos intraóseos .....	10
4.2.2 Tratamiento de defectos intraóseos .....	12

<b>4.3 Regeneración en periodoncia .....</b>	<b>12</b>
4.3.1 Regeneración tisular guiada .....	12
4.3.2 Injertos óseos.....	13
4.3.3 Membrana .....	14
4.3.4 Agentes bioactivos .....	16
4.3.5 Nanofibras .....	16
4.3.6 Nanofibra de carboximetilcelulosa .....	17
4.3.7 Nanopartículas de plata .....	18
<b>4.4 Terapia celular .....</b>	<b>19</b>
4.4.1 Células madre.....	19
4.4.2 Tipos de células madre.....	20
4.4.3 Células madre de cordón umbilical.....	21
4.4.4 Osteoblastos .....	22
4.4.5 Diferenciación celular de los osteoblastos in vitro .....	22
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 Diseño del estudio.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2 Universo del estudio .....</b>	<b>25</b>
<b>5.3 Tamaño de la muestra .....</b>	<b>25</b>
<b>5.4 Criterios de selección (inclusión, exclusión y eliminación).....</b>	<b>25</b>
<b>5.5 Descripción del procedimiento.....</b>	<b>26</b>
5.5.1 Descongelación de la línea celular.....	26
5.5.2 Cultivo inicial de células madre mesenquimales del cordón umbilical .....	27
5.5.3 Pase de cultivo celular.....	27
5.5.4 Montaje del ensayo de osteodiferenciación .....	28
5.5.5 Análisis PCR .....	31
<b>5.6 Análisis estadístico .....</b>	<b>34</b>
<b>5.7 Consideraciones éticas .....</b>	<b>34</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>

<b>6.1 Expresión génica .....</b>	<b>35</b>
6.1.1 Colágeno .....	35
6.1.2 Osteocalcina .....	36
6.1.3 RUNX2 .....	37
6.1.4 Fosfatasa alcalina .....	38
<b>6.2 Depósitos de calcio .....</b>	<b>40</b>
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>9. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Ventajas y desventajas de células madre del cordón umbilical. ....	21
II. Resultados del análisis estadístico del PCR de colágeno. ....	36
III. Resultados del análisis estadístico del PCR de osteocalcina. ....	37
IV. Resultados del análisis estadístico del PCR de RUNX2. ....	38
V. Resultados del análisis estadístico del PCR de fosfatasa alcalina. ....	39
VI. Análisis de la prueba de Tukey sobre la cuantificación de rojo alizarina. ....	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Clasificación de los defectos óseos periodontales según Papapanou y Tonetti	10
2. Defectos intraóseos.....	11
3. Diferenciación osteoblástica.....	24
4. Céntrifugadora.....	26
5. Diseño del ensayo de osteodiferenciación.....	29
6. Placa de 96 pozos.....	30
7. Tinción rojo alizarina.....	31

## NOMENCLATURA

ALP	Fosfatasa alcalina
APV	Alcohol polivinílico
BMP	Proteína morfogénica ósea
B-TCP	Fosfato tricálcico beta
CMC	Carboximetilcelulosa
COL1	Colagenasa 1
DBBM	Deproteinized bovine bone mineral por sus siglas en inglés
EMD	Proteínas derivadas de la matriz del esmalte
EPTFE	Politetrafluoroetileno expandido
HA	Hidroxiapatita
IL-1	Interleucina 1
FGF	Factor de crecimiento derivado de fibroblastos
NPAG	Nanopartículas de plata
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PLA	Ácido poliláctico
PGA	Ácido poliglicólico
PRF	Plasma rico en fibrina
PRP	Plasma rico en plaquetas
PTFE	Politetrafluoroetileno
RCF	Fuerza centrífuga relativa o fuerza G

RPM	Revoluciones por minuto
RTG	Regeneración tisular guiada
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral-alfa
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformador-beta
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

**TESISTA: Karen Lissette Villarreal Arizpe**  
**DIRECTOR DE TESIS: Dra. Gloria Martínez Sandoval**  
**CODIRECTOR DE TESIS: Myriam Angélica de la Garza Ramos**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE  
DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL *IN VITRO* UTILIZANDO UN  
NANOANDAMIO DE CARBOXIMETILCELULOSA CON  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA

**RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN:** Actualmente existen distintos tratamientos que buscan conseguir una regeneración completa y funcional de los tejidos periodontales, sin embargo, estas técnicas tienen un éxito limitado, por lo que se siguen buscando alternativas más predecibles. **OBJETIVO:** Evaluar el potencial de proliferación, diferenciación osteogénica y de deposición de calcio de las células madre del cordón umbilical en una nanofibra a base de carboximetilcelulosa (CMC) con nanopartículas de plata y alcohol polivinílico. **METODOLOGÍA:** Se cultivaron células mesenquimales humanas del cordón umbilical (ATCC PCS-500-100) en presencia de una nanofibra de carboximetilcelulosa y nanopartículas de plata para su posterior análisis de depósitos de calcio con rojo alizarina y PCR para la expresión génica de COL1, RUNX2, ALP, Osteocalcina y B-actina. **RESULTADOS:** Esta nanofibra promueve la expresión de genes osteogénicos, en un radio de mínimo 2, en comparación con el grupo control. Así mismo, en todos los casos, la membrana de CMC indujo una mayor expresión y deposición de calcio (OD 595 nm = 0.215) que la membrana del grupo control (OD 595 nm = 0.021). **CONCLUSIONES:** El presente estudio demuestra el potencial uso de la nanofibra como un nanoandamio para la regeneración de defectos óseos, sin embargo, es necesario realizar estudios *in vivo* para confirmar su efecto en la diferenciación celular.

**TESISTA: Karen Lissette Villarreal Arizpe**  
**DIRECTOR DE TESIS: Dra. Gloria Martínez Sandoval**  
**CODIRECTOR DE TESIS: Myriam Angélica de la Garza Ramos**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

PROLIFERATION AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF STEM  
CELLS DERIVED FROM UMBILICAL CORD *IN VITRO* USING A  
CARBOXIMETHYL CELLULOSE NANOANDAMIUM  
WITH SILVER NANOPARTICLES.

### **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Currently, there are different treatments that seek to achieve a complete and functional regeneration of periodontal tissues, however, these techniques have limited success, so more predictable alternatives are still being sought.

**OBJECTIVE:** To evaluate the potential for overload, osteogenic differentiation, and calcium deposition of umbilical cord stem cells on a carboxymethylcellulose (CMC) based nanofiber with silver nanoparticles and polyvinyl alcohol.

**METHODOLOGY:** Human umbilical cord mesenchymal cells (ATCC PCS-500-100) were cultured in the presence of a carboxymethylcellulose nanofiber and silver nanoparticles for subsequent analysis of calcium deposits with alizarin red and PCR for gene expression of COL1, RUNX2, ALP, Osteocalcin and B-actin.

**RESULTS:** This nanofiber promotes the expression of osteogenic genes, in a odds ratio of at least 2, compared to the control group.

Likewise, in all cases, the CMC membrane induced a greater expression and deposition of calcium (OD 595 nm = 0.215) than the membrane in the control group (OD 595 nm = 0.021).

**CONCLUSIONS:** The present study demonstrates the potential use of nanofiber as a nano scaffold for the regeneration of bone defects, however, it is necessary to carry out *in vivo* studies to confirm its effect on cell differentiation.

## 1. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica del periodonto asociada a microorganismos y mediada por el huésped. Afectando a billones de individuos y generando considerables costos en salud, esta patología es la sexta enfermedad más prevalente en el mundo. Las formas más severas afectan aproximadamente al 10% de la población y, junto con la caries y pérdida dentaria, contribuye a los \$442 billones de dólares de costos directos e indirectos mundiales en términos de productividad.

Esta patología se caracteriza por la inflamación gingival, pérdida de inserción, reabsorción ósea y formación de bolsas periodontales. Lo anterior es de gran importancia debido a que la pérdida de inserción provocada por un defecto óseo afecta el pronóstico a largo plazo de un órgano dentario. Por esta razón, el objetivo del tratamiento periodontal es detener la progresión de la enfermedad y regenerar las estructuras dañadas con la finalidad de restaurar su función.

Actualmente existen distintos tratamientos que buscan conseguir una regeneración completa y funcional de los tejidos periodontales, sin embargo, estas técnicas tienen un éxito limitado, por lo que se siguen buscando alternativas más predecibles.

La terapia celular es un tratamiento que utiliza células madre para reemplazar o reparar tejidos que se han dañado, incluyendo los del periodonto. Estas células se pueden diferenciar en células especializadas con las características necesarias para cada tipo de tejido y se pueden obtener de distintas fuentes como por ejemplo el cordón umbilical, médula ósea, pulpa dental, entre otros.

La ingeniería tisular es un campo multidisciplinario con un enfoque prometedor en la restauración y reconstrucción de los tejidos. Lo anterior se debe a que, en una

regeneración, los andamios juegan un papel muy importante en el apoyo a células para acomodar y guiar su crecimiento en un tejido.

El uso de nanofibras de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata en conjunto con las células madre del cordón umbilical, parece ser un tratamiento alternativo prometedor que, al ser colocadas dentro de los defectos óseos, promueve la regeneración que no es posible con las técnicas utilizadas actualmente.

Con base en lo anterior se estableció la siguiente pregunta de investigación: ¿El cultivo de células madre del cordón umbilical en una nanofibra a base de nanopartículas de plata y alcohol polivinílico tiene potencial de proliferación y diferenciación osteogénica?

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de proliferación y diferenciación osteogénica de las células madre del cordón umbilical en una nanofibra a base de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata y alcohol polivinílico por medio de su cultivo *in vitro* en grupos control y experimental con su posterior tinción con rojo alizarina y análisis PCR de la expresión génica de colágeno 1, RUNX2 y fosfatasa alcalina.

Se cultivaron células mesenquimales del cordón umbilical (ATCC PCS-500-100) en presencia de una nanofibra de carboximetilcelulosa y nanopartículas de plata para su posterior análisis de depósitos de calcio con rojo alizarina y PCR para la expresión génica de COL1, RUNX2, ALP, osteocalcina y B-actina y se compararon con una membrana de teflón.

Aquellos cultivos en presencia de la nanofibra de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata y alcohol polivinílico presentaron una mayor expresión génica de ALP, COL1, Osteonectina y RUNX2. Así mismo, es importante señalar que la presencia de la membrana TXT por si sola, no presentó un aumento en la expresión génica de ninguno de los cuatro analizados en este estudio, lo cual demuestra el potencial de osteodiferenciación de la membrana de carboximetilcelulosa.

Por otra parte, y al igual que la expresión de genes, se encontró un mayor depósito de calcio en presencia de la nanofibra y los resultados demuestran que el uso de la membrana TXT no parece tener tanto efecto en los depósitos de calcio en comparación con el uso de las nano fibras de carboximetilcelulosa.

## **2. HIPÓTESIS**

Hi: La nanofibra compuesta de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata-alcohol polivinílico es un eficiente andamio para la proliferación y diferenciación osteogénica de células madre del cordón umbilical, además estimula la deposición de calcio.

Ho: La nanofibra compuesta de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata-alcohol polivinílico no es un eficiente andamio para la proliferación y diferenciación osteogénica de células madre del cordón umbilical y no estimula la deposición de calcio.

Ha: La nanofibra compuesta de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata-alcohol polivinílico es un andamio menos eficiente para la proliferación y diferenciación osteogénica de células madre del cordón umbilical en comparación con la membrana TXT.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el potencial de proliferación y diferenciación osteogénica de las células madre del cordón umbilical en una nanofibra a base de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata y alcohol polivinílico.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Estimular la osteodiferenciación de células madre mesenquimales del cordón umbilical en una nanofibra de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata y alcohol polivinílico.
2. Determinar la presencia de depósitos de calcio mediante una técnica de colorimetría utilizando la tinción de rojo alizarina.
3. Analizar por medio de PCR la expresión de genes como fosfatasa alcalina, colágeno tipo I, RUNX2, osteocalcina y B-actina.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1 Periodontitis**

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica del periodonto causada por la interacción entre la biopelícula y la respuesta inmune del huésped (Loe H et al. 1965; Meyle J y Chapple I, 2015). Esta patología se caracteriza por la inflamación gingival, pérdida de inserción, reabsorción ósea y formación de bolsas periodontales (Flemming 1999; Nazir 2017).

La enfermedad periodontal, incluyendo la gingivitis y periodontitis, es una de las dos enfermedades orales más prevalentes en la cavidad oral. Contribuyendo a la carga mundial de enfermedades crónicas, esta enfermedad tiene una alta prevalencia y representa un importante problema de salud pública para los países (Petersen PE y Ogawa H, 2012). Se estima que la periodontitis grave afecta al 10.8% de la población mundial en edades de entre 15 y 99 años y, junto con la caries y pérdida dentaria, contribuye a los \$442 billones de dólares de costos directos e indirectos mundiales en términos de productividad (Listl et al. 2015; Frencken 2017).

#### **4.1.1 Nueva clasificación periodontal**

Anteriormente, la periodontitis se clasificaba como crónica o agresiva dependiendo de su presentación clínica. Así mismo, basada en la pérdida de inserción clínica, se clasificaba dependiendo de su gravedad en leve, moderada o severa y también se clasificaba dependiendo de su extensión en localizada o generalizada. Actualmente, se determinó que no existe evidencia suficiente para establecer diferencias patobiológicas entre ambas presentaciones de la enfermedad, motivo por el cual se decidió agrupar ambas patologías en solo “periodontitis” (Herrera et al. 2018).

En la nueva clasificación periodontal se estableció la definición de caso de periodontitis. Se diagnosticará a un paciente con periodontitis cuando este tenga pérdida de inserción clínica interdental en 2 o más dientes no adyacentes o que haya una pérdida de inserción clínica en vestibular de 3 mm o más con bolsas de más de 3 mm en dos o más dientes. Hay que considerar que existen casos de pérdida de inserción clínica que no está asociada a periodontitis, como, por ejemplo: recesiones por trauma, caries cervicales, lesiones endodónticas, fracturas radiculares verticales o pérdida de inserción por piezas en mal posición (Herrera et al. 2018; Papapanou et al. 2018).

Así mismo, ahora la periodontitis se clasifica en etapas y grados. La estadificación (etapa I, II, III y IV) depende de la gravedad, la complejidad y la extensión de la enfermedad. La gravedad va a estar determinada por qué tanta destrucción periodontal hay tomando como referencia la pérdida ósea y la pérdida de dientes asociada a periodontitis. La complejidad prevista de su tratamiento considera la profundidad e involucramiento de bolsa, hiper movilidad dental, disfunción masticatoria, entre otros. La extensión se va a clasificar en localizada, generalizada y con patrón molar-incisal. Por otra parte, el grado de la enfermedad informa sobre el riesgo de progresión de esta y la divide en lenta, moderada y rápida al clasificarla como grado A, B y C respectivamente (Papapanou et al. 2018).

#### **4.1.2 Diagnóstico de periodontitis**

El diagnóstico de la enfermedad periodontal se realiza principalmente por la evaluación de los signos y síntomas del paciente y se complementa con radiografías. Clínicamente hay un cambio en el color, contorno y textura de los tejidos gingivales, así mismo, hay presencia de sangrado al sondeo y un aumento en la profundidad del surco gingival, llamado “bolsa periodontal”, resultado de la pérdida de inserción y reabsorción ósea. Esto último se puede confirmar con radiografías midiendo la distancia entre la unión cemento-esmalte y la cresta alveolar la cual usualmente es de 1-3mm. De igual manera, en órganos multiradiculares, puede existir la presencia de aperturas hacia la furca. Como resultado de todo lo anterior, existe la posibilidad de que haya aumento en la movilidad, migración patológica y exfoliación dental (Flemming 1999; Highfield 2009; Nazir 2017).

### **4.1.3 Patogenia de la periodontitis**

Se ha demostrado que la biopelícula es la principal causa de enfermedad periodontal (Theilade et al. 1966; Loe et al.). Sin embargo, la presencia de microorganismos es insuficiente para causar periodontitis debido a que es una enfermedad compleja con múltiples factores causantes y la transición entre salud, gingivitis y periodontitis depende no solo de la biopelícula simbiótica o disbiótica, sino también de la respuesta inmune del huésped (Meyle y Chapple 2015).

Es bien sabido que las especies del complejo rojo (*Tanerella forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*) y del complejo naranja (*Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, entre otros) están altamente asociadas con la enfermedad periodontal (Socransky et al. 1998, 2002; Loozen et al. 2014). Estas células estimulan la secreción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 y PGE2 por parte de las células inmunitarias, promoviendo así la actividad osteoclástica y la consecuente reabsorción ósea (Hienz et al. 2015).

### **4.1.4 Tratamiento de la periodontitis.**

La etiología de la enfermedad periodontal es la presencia de biopelícula, por lo que su remoción es de vital importancia para la resolución de esta patología. El tratamiento consiste en una fase inicial en donde se realiza el raspado y alisado radicular con el objetivo de eliminar el cálculo subgingival por medio de instrumentos manuales, ultrasonido y/o láseres.

Así mismo, cuando no se ha conseguido el cierre de la bolsa debido a la presencia de defectos óseos, involucramiento de furcas, anatomía, falta de visibilidad, entre otros, es posible realizar un abordaje quirúrgico en el que se realiza un colgajo para tener un mejor acceso a la superficie radicular y poder eliminar los depósitos de cálculo remanentes. De igual forma, durante la cirugía, existe la posibilidad de realizar tratamientos resectivos

para la eliminación de la bolsa periodontal, regenerativos de los defectos intraóseos o cirugía ósea para obtener un contorno óseo fisiológico (Caffesse et al. 1986; Carnevale y Kaldahl 2000; Hajishengallis 2014; Sanz et al. 2020).

#### **4.2 Defectos óseos en la bolsa periodontal**

La presencia de bacterias en la enfermedad periodontal estimula la inflamación de los tejidos y, en un paciente susceptible, esto resultará en una destrucción del tejido conectivo y del hueso de soporte que rodea la raíz. Como consecuencia de lo anterior, se forma una bolsa periodontal alrededor del órgano dentario que sirve como reservorio para las bacterias (Needleman et al., 2006). Existen distintos tipos de deformidades óseas que pueden resultar de la enfermedad periodontal, aunque usualmente ocurren en adultos, también se han reportado en cráneos con dientes deciduos (Larato 1970).

La bolsa periodontal se clasifica dependiendo de la localización de su base en relación con la cresta alveolar y, la forma de esta depende del patrón de reabsorción ósea. Estos defectos óseos se clasifican principalmente en tres grupos: defectos supraóseos, infraóseos e interradiculares. Los defectos supraóseos se producen cuando hubo una pérdida vertical de hueso de manera que la base de la bolsa periodontal se encuentra coronal a la cresta alveolar, formando así, una bolsa supraósea. En los infraóseos, la pérdida ósea produce una bolsa infraósea en el que la base de esta se encuentra apical a la cresta ósea y estos defectos, a su vez, se dividen en intraóseos y cráteres. Por último, los defectos óseos se clasifican en interradiculares, dependiendo del tipo de afectación en la furca (fig. 1) (Goldman y Cohen 1958; Papapanou y Tonetti 2000).

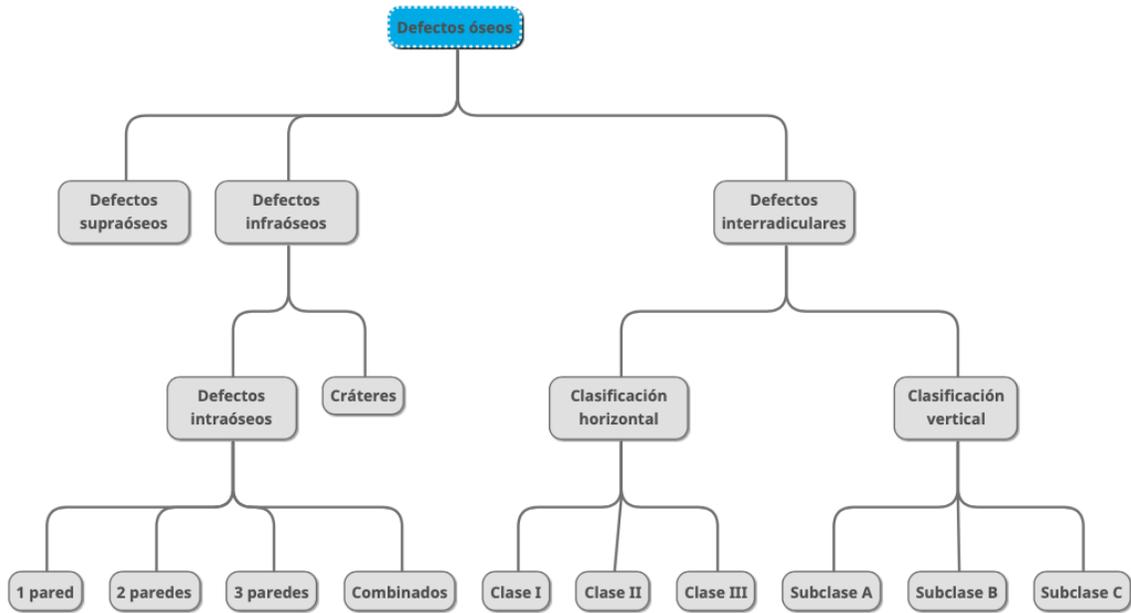


Figura 1. Clasificación de los defectos óseos periodontales según Papapanou y Tonetti.

Fuente: (Papapanou y Tonetti 2000).

El entendimiento en la naturaleza y patogenia de estas alteraciones es de vital importancia para su correcto diagnóstico y tratamiento (Papapanou et al. 1988). Lo anterior se debe a que la pérdida de inserción causada por un defecto óseo, afecta el pronóstico a largo plazo de un órgano dentario (McGuire y Nunn 1996; Lang y Tonetti 2003). La literatura reporta que la obtención del nivel de inserción clínica en combinación con las radiografías, parece tener un alto grado de precisión en el correcto diagnóstico de los defectos óseos de la bolsa periodontal (Tonetti et al. 1993).

#### 4.2.1 Defectos intraóseos

La bolsa periodontal infraósea se produce debido a un defecto óseo vertical o angular que ocurre en dirección oblicua desde la cresta alveolar hacia la superficie radicular en una posición más apical, de manera que la base del defecto se localiza apical al hueso circundante. Goldman y Cohen clasificaron estas lesiones óseas angulares en defectos de

una pared, dos paredes o tres paredes, dependiendo del número de paredes óseas remanentes (fig. 2) (Goldman y Cohen 1958).

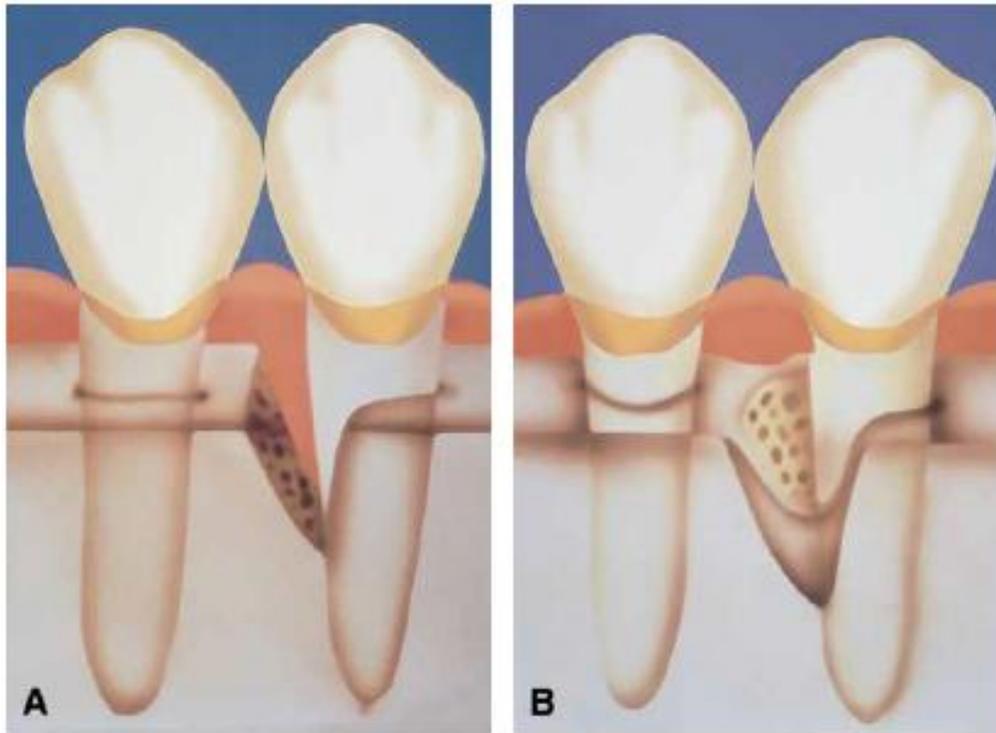


Figura 2. Defectos intraóseos. A. Defecto de una pared. B. Defecto de dos paredes. C. Defecto de tres paredes. Fuente: Papapanou PN y Tonetti MS, 2000.

Existen distintos factores dentales locales relacionados con este tipo de defectos óseos que determinarán su forma, como por ejemplo, localización de los microorganismos en la superficie dentaria, anatomía radicular y del tronco, apiñamiento dentario, proximidad de las raíces, posición del órgano dentario dentro de la arcada, surcos anatómicos y perlas de esmalte (Manson 1976; Papapanou y Tonetti 2000).

Radiográficamente, los defectos verticales se han reportado con una mayor incidencia en las superficie mesial y distal de los órganos dentarios (Nielsen et al. 1980; Papapanou y Tonetti 2000). Así mismo, el número de paredes remanentes determinará la predictibilidad de regeneración, siendo la de 3 paredes la que tiene una mayor

predictibilidad, mientras que la de 1 pared, es la de menor (Reynolds et al. 2015; Bashutski et al.).

#### **4.2.2 Tratamiento de defectos intraóseos**

La principal meta del tratamiento periodontal es mantener una dentición natural saludable y funcional. Es debido a lo anterior que, posterior a una pérdida del aparato de inserción, se busca regenerar el periodonto (Rosen et al. 2000). Se recomienda que los defectos intraóseos con 2 o 3 paredes se traten mediante la regeneración tisular guiada, colocando una membrana y/o injerto óseo. Por otra parte, los defectos verticales de 1 pared al ser menos predecibles, se puede optar también por solo realizar cirugía resectiva removiendo el tejido óseo sin soporte (Bashutski et al.).

#### **4.3 Regeneración en periodoncia**

La regeneración se define como la reproducción o reconstitución de una parte del periodonto perdida o lesionada con la finalidad de reestablecer su arquitectura y función (Rosen et al. 2000; The American Academy of periodontology 2001). La regeneración de los tejidos periodontales depende de la neoformación de cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar (Caton et al. 1987).

##### **4.3.1 Regeneración tisular guiada**

La regeneración tisular guiada (RTG) consiste en la colocación de una barrera física que favorece la repoblación de la superficie radicular con células del ligamento periodontal al prevenir que las células del tejido conectivo y del epitelio gingival alcancen la superficie radicular (Gottlow et al. 1984; Caton et al. 1987).

El proceso de cicatrización natural usualmente resulta en tejido cicatrizal o de reparación. Gracias a la ingeniería tisular es posible manipular ciertos factores de manera que se produzca una regeneración. Lo anterior depende de la manipulación de tres

elementos clave: la señalización molecular; un andamio o matriz de soporte; y las células (Shen et al. 2021; Kao et al.).

#### 4.3.2 Injertos óseos

El hueso es altamente vascularizado y tiene la habilidad de regenerar, sin embargo, tiene ciertas limitaciones por lo que es necesario que se realice una intervención clínica. El uso de biomateriales como los injertos óseos ayuda para obtener mejores resultados (Amini et al. 2013).

Los injertos óseos deben poseer las siguientes características:

- Osteoinducción: estimulación de las células indiferenciadas en células del linaje osteoblástico.
- Osteoconducción: permitir que el hueso proliferen en su superficie, es decir, servir como un andamio para las células óseas y sus productos.
- Osteogénesis: reparación ósea por medio del crecimiento natural del hueso al contener células óseas (Daculsi 2013).

Por otra parte, los injertos óseos se clasifican dependiendo de su origen en:

- Autólogos: es un injerto obtenido del mismo individuo y, aunque no es un biomaterial per se, es considerado un “gold standard” para regeneración
  - Propiedades: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción.
- Aloinjertos: es un injerto obtenido de la misma especie, pero de diferente individuo; se produce en bloque o particulado; y, dependiendo de su procesamiento (liofilizado, liofilizado-desmineralizado o congelado), pueden cambiar sus propiedades biológicas.
  - Propiedades: osteoinductivo y osteoconductor

- Xenoinjertos: es un injerto en donde el donador es de una especie diferente al receptor, se utiliza el DBBM (deproteinized bovine bone mineral por sus siglas en inglés)
  - Propiedades: osteoconductor
- Biocerámicas sintéticas: sulfato de calcio, fosfato de calcio {hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico beta (B-TCP)} vidrio bioactivo y combinaciones.
  - Propiedades: osteoinductor
- Polímeros sintéticos: se utilizan poliésteres alifáticos como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico y policaprolactona.
  - Propiedades: osteoinductor (Sanz et al. 2019; Hoexter).

### 4.3.3 Membrana

La regeneración es un proceso complejo que está influenciado por la estabilidad del coágulo sanguíneo, el cual puede influir en la migración de células, vascularización y osteogénesis. El uso de membranas no solo ayuda a la exclusión celular, si no que también mantiene el espacio para la correcta formación y mantenimiento del coágulo sanguíneo (Omar et al. 2019).

Las membranas se clasifican en:

- No reabsorbibles
  - Politetrafluoroetileno (PTFE): polímero con alta biocompatibilidad que no provoca reacciones inmunológicas.
    - Ventajas: mantiene su forma por más tiempo que la reabsorbible.
    - Desventajas: no reabsorbible (debe ser removida en una segunda cirugía) y mayor probabilidad de exposición e infección de la membrana

- Politetrafluoroetileno expandido reforzado con titanio (ePTFE): doble capa de ePTFE con un marco de titanio, utilizado en defectos óseos verticales o grandes donde es necesario que la membrana sea reforzada para mantener su forma
  - Ventajas: mantiene su forma por más tiempo que la reabsorbible
  - Desventajas: no reabsorbible (debe ser removida en una segunda cirugía) y mayor probabilidad de exposición e infección de la membrana
  
- Titanio:
  - Ventajas: alta biocompatibilidad, alta fuerza y rigidez para mantener espacio, baja densidad y peso
  - Desventajas: dificultad para removerse pues hay una integración de tejido.
  
- Reabsorbibles:
  - Se dividen en sintéticas {ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA)} y naturales (colágeno)
    - Ventajas: No necesitan cirugía para removerlas, menor morbilidad, mayor rango de técnicas quirúrgicas posibles.
    - Desventajas: no se controla el tiempo que durará como barrera, necesita un material de soporte, el proceso de reabsorción puede intervenir con la cicatrización y regeneración del hueso (Hammerle y Jung 2003; Sanz et al. 2019).

Aunque por muchos años se utilizó la membrana de PTFE para la RTG, actualmente se prefiere el uso de una membrana de colágeno reabsorbible debido a que no es necesario realizar una segunda cirugía para retirarla y ha demostrado tener una gran eficacia en la

regeneración de defectos intraóseos (Caffesse et al. 1997; Nemoto et al. 2018; Bashutski et al.).

#### **4.3.4 Agentes bioactivos**

Los agentes bioactivos se definen como los mediadores naturales del tejido que tienen la capacidad de causar una respuesta en una célula, organismo o tejido. Existen distintos agentes bioactivos utilizados en la regeneración de tejidos periodontales, como por ejemplo la proteína morfogénica ósea (BMP), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD), plasma rico en plaquetas (PRP), plasma rico en fibrina (PRF), entre otros (Sanz et al. 2019).

#### **4.3.5 Nanofibras**

La ingeniería tisular es un campo multidisciplinario con un enfoque prometedor en la restauración y reconstrucción de los tejidos. Estos últimos son muy complejos y están organizados en una estructura tridimensional bien definida en nuestro cuerpo. Se cree que esta arquitectura contribuye en las funciones biológicas de los tejidos al proveer un ambiente espacial para el crecimiento celular. Es debido a lo anterior que, en una regeneración, los andamios juegan un papel muy importante en el apoyo a células para acomodar y guiar su crecimiento en un tejido (Murugan y Ramakrishna 2006; Nayl et al. 2022).

Las nanofibras son definidas como aquellas fibras con un diámetro menor a 500 nm (Laredo-Naranjo et al. 2016a). Los nanobiomateriales son ampliamente utilizados en terapias génicas, administración de nanofármacos, terapias fotodinámicas, ingeniería de tejidos, membranas, apósito para heridas, entre otros (Laredo-Naranjo et al. 2016a; Yi et al. 2016).

La estructura fibrilar del colágeno es muy importante para la adhesión, proliferación y diferenciación celular por lo que imitar su estructura puede ayudar a que los materiales utilizados en la ingeniería tisular se parezcan más a los tejidos naturales (Murugan 2006; Venugopal et al. 2008). El desarrollo de las nanofibras ha mejorado el alcance de la fabricación de estos materiales gracias a que su estructura porosa favorece las tres características mencionadas sobre el colágeno. Así mismo, la alta porosidad de los andamios de nanofibras proporciona más espacio estructural para las células y facilita el intercambio de nutrientes y desechos entre el andamio y el medio ambiente (Venugopal et al. 2008; Ding et al. 2021).

Los andamios en la ingeniería tisular se pueden fabricar mediante distintos métodos, como por ejemplo el autoensamblaje, liofilización, fusión, estirado, espumado con gas, entre otros. Así mismo, existen distintos materiales que pueden ser utilizados para su producción y se clasifican en naturales y sintéticos. Los primeros están compuestos por colágeno, gelatina, quitosán, quitina, celulosa y almidón. Los segundos se producen con ácido láctico, glicólico, lactico-glicólico, caprolactonato y láctido-caprolactonato (Murugan 2006).

#### **4.3.6 Nanofibra de carboximetilcelulosa**

Los materiales poliméricos son preferidos en la fabricación de nanofibras debido a sus características mecánicas y de solubilidad, así como su facilidad para producirlos. Existen distintos derivados de las nanofibras de celulosa, como, por ejemplo: acetato-celulosa, metil-celulosa y carboximetilcelulosa (CMC). Este último se ha convertido en el de mayor importancia en la fabricación de nanofibras debido a su naturaleza polielectrolítica y biocompatibilidad (Laredo-Naranjo et al. 2016a).

La carboximetilcelulosa es un polisacárido semi-sintético derivado del polímero de celulosa natural. Este último sufre una sustitución parcial de sus grupos de hidroximetil por unos de carboximetil. Esta sustitución de grupos funcionales le da su comportamiento

polielectrolítico en el que en pH mayores a 4 se convierte en un polianión, mientras que en un pH menor, los aniones carboxílicos están protonados (Laredo-Naranjo et al. 2016a).

#### **4.3.7 Nanopartículas de plata**

Con el aumento en la resistencia bacteriana hacia antibióticos, se han desarrollado agentes antimicrobianos libres de esta resistencia. Los antisépticos a base de plata se han relacionado con una actividad de amplio espectro y con baja propensión a inducir resistencia por parte de los microorganismos (Kim et al. 2007). Tiene propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales y se ha demostrado que los compuestos con plata son altamente tóxicos para microorganismos, incluyendo *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas sp.*, entre otros (Morones et al. 2005; Kim et al. 2007; Rai et al. 2009; Bruna et al. 2021).

A pesar de que su capacidad bactericida es ampliamente reconocida, los mecanismos por medio de los cuales los iones de plata tienen un efecto inhibitorio, son parcialmente conocidos. Se ha reportado que la carga positiva de este ion causa una atracción electrostática entre la carga negativa de la membrana celular del microorganismo y la carga positiva de la nanopartícula. Otros artículos han encontrado que el ion de plata aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana, causando su muerte (Kim et al. 2007; Yin et al. 2020) .

La reducción en el tamaño de las partículas de los materiales se ha convertido en una herramienta eficiente que mejora su biocompatibilidad (Kim et al. 2007). Es debido a lo anterior que las nanopartículas de plata se utilizan ampliamente en la medicina como tratamiento para quemaduras, materiales dentales, cubiertas de materiales de acero inoxidable, bloqueadores, entre otros. (Rai et al. 2009). Sin embargo, ya que su uso es principalmente en la biomedicina, su toxicidad en las células del periodonto, es un factor muy importante que debe ser considerado (Laredo-Naranjo et al. 2016a).

## **4.4 Terapia celular**

El objetivo del tratamiento periodontal es detener la progresión de la enfermedad y conseguir una regeneración de las estructuras dañadas con la finalidad de devolver su función. Tanto el tratamiento quirúrgico y como el no quirúrgico ayudan a controlar la progresión de esta patología, sin embargo, conseguir una regeneración completa y funcional, sigue siendo un desafío para los periodoncistas. De igual manera, la regeneración periodontal por medio de una RTG con el uso de injertos óseos, factores de crecimiento, factores de modulación del huésped y combinación de estos, tiene un éxito limitado, por lo que se siguen buscando técnicas regenerativas más predecibles (Bassir et al. 2016).

La terapia celular es un tratamiento que utiliza células madre para reemplazar o reparar tejidos que se han dañado, incluyendo los del periodonto. Estas células se pueden diferenciar en células especializadas con las características necesarias para cada tipo de tejido y se pueden obtener de distintas fuentes como por ejemplo el cordón umbilical, médula ósea, pulpa dental, entre otros, y son utilizadas en distintos tratamientos médicos (Girija et al. 2014).

En los últimos años, la periodoncia ha aumentado su interés en la regeneración por medio de la terapia celular. Gracias a su plasticidad y habilidad para diferenciarse en diferentes linajes celulares, las células madres parecen tener un futuro prometedor debido a su potencial terapéutico en la regeneración de los tejidos periodontales (cemento, hueso y ligamento periodontal) (Bassir et al. 2016; Fu et al. 2021).

### **4.4.1 Células madre**

Las células madre son células no especializadas que se diferencian en células especializadas para la formación de los diferentes tipos de tejidos en el cuerpo. Son vitales para el desarrollo, reparación y mantenimiento de los diferentes órganos (Saini et al. 2011). Lo anterior es posible gracias a que estas células tienen dos características

principales: autorrenovación y potencial de diferenciación. La primera se refiere a la habilidad que tiene para renovarse a si mismas por medio de la mitosis para dar lugar a más células madre. La segunda consiste en la capacidad para diferenciarse en células especializadas con funciones específicas (Girija et al. 2014; Bassir et al. 2016).

#### 4.4.2 Tipos de células madre

Dependiendo de su potencial de diferenciación, las células madre se pueden clasificar en:

- Totipotenciales: se encuentran en embriones y se pueden diferenciar en células de las tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo) y de tejido extraembrionario, motivo por el cual pueden formar un organismo completo.
- Pluripotenciales: existen en la capa celular interna del blastocito y se pueden diferenciar en células de las tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo) pero no del tejido extraembrionario.
- Multipotentes: se pueden diferenciar en células de uno o dos capas germinativas.
- Unipotentes: se pueden diferenciar en solo un tipo de células (Bassir et al. 2016; Madan et al.).

Según su origen, se clasifican en células madre:

- Embrionario: son células pluripotentes derivadas de la capa celular interna del blastocito y tienen la capacidad de formar derivados de las tres capas germinativas. Debido a lo anterior, estas células tienen un gran potencial regenerativo, sin embargo, existen muchas limitaciones éticas debido a su origen.
- Postnatal: estas células se pueden aislar de distintos tejidos como por ejemplo la médula ósea, epitelio, cordón umbilical, hígado, sistema nervioso, dientes, ligamento periodontal, entre otros y son precursores comprometidos específicos de cada tejido con la capacidad de convertirse en un número limitado de linajes celulares (Girija et al. 2014; Bassir et al. 2016).

#### 4.4.3 Células madre de cordón umbilical

El cordón umbilical contiene dos arterias y una vena que están rodeados por tejido conectivo mucoide llamado “gelatina de Wharton” que está cubierto por un epitelio derivado de la membrana amniótica (Wang et al. 2004). El concepto sobre utilizar la sangre del cordón umbilical como fuente para células madre para trasplante hematopoyético fue propuesto por Edward Boyse en 1983 (Moise, 2005).

Las células madre presentes en el cordón umbilical se pueden obtener de la sangre de este y de la gelatina de Wharton (Weiss y Troyer 2006). Estas se clasifican en dos tipos: hematopoyéticas y mesenquimales. El primer tipo de células se diferencia en los distintos tipos de células de la sangre, mientras que el segundo se diferencia en células del hueso, músculo, cartílago y tejido graso (Erices et al. 2000). Las células mesenquimales tienen forma de fibroblastos y, debido a su plasticidad, tienen una gran aplicación terapéutica en la medicina regenerativa (Erices et al. 2000).

Tabla I. Ventajas y desventajas de células madre del cordón umbilical.

Ventajas	Desventajas
Obtención ilimitada	No se pueden obtener células del “donante” adicionales para un segundo trasplante
Disponibles con poca antelación previo a su uso	Pocas células totales debido al poco volumen
Diversidad étnica	Altos costos de producción
Colección indolora de células madre	
Alta capacidad proliferativa	
Tasa baja de causar rechazo por el huésped	

#### **4.4.4 Osteoblastos**

Las células osteoblásticas generalmente son cuboidales o ligeramente alargadas y son las principales productoras de hueso (Sodek y Mckee 2000). Se encargan de producir proteínas extracelulares como la osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I. Tienen un citoplasma basófilo, con muchas mitocondrias y un gran aparato de Golgi para satisfacer la demanda protéica (Long 2012). Una de las principales funciones de los osteoblastos es la formación del osteoide, una matriz de hueso no mineralizada compuesta 90% por colágeno tipo I y 10% por otro tipo de proteínas no colagenosas, que posteriormente se mineralizará formando así, el hueso maduro. Así mismo, también participa en la regulación de la diferenciación osteoclástica (Horowitz et al. 2005).

#### **4.4.5 Diferenciación celular de los osteoblastos *in vitro***

El proceso de diferenciación celular está controlado por una gran variedad de hormonas, citocinas y factores de crecimiento que regulan la expresión genética y controlan una cascada de eventos (Sodek y Mckee 2000). La diferenciación de osteoblastos está dividida en tres estadios: proliferación activa, maduración de la matriz extracelular y mineralización (fig.3) (Lian y Stein 1995). La diferenciación de esta célula ósea a partir de células mesenquimales progenitoras, requiere de diferentes factores de transcripción (Long 2012).

En la actualidad, se acepta que la célula progenitora de los osteoblastos es una célula mesenquimal pluripotente que aún no se compromete a diferenciarse en un osteoblasto, un condrocito u otro fenotipo celular (Lian y Stein 1995). La presencia del factor de transcripción Wnt y BMP permite la diferenciación inicial de los osteoblastos a partir de una célula mesenquimal y determina su destino en el linaje osteoblástico convirtiéndolo en una célula progenitora (Collins et al. 2017).

Durante los primeros 10 a 12 días del cultivo celular, empieza la proliferación activa. La presencia de RUNX2 y BMP diferencia a la célula progenitora en una osteoprogenitora

y esta etapa está caracterizada por un aumento en la actividad mitótica y genes como c-myc, c-fos y c-jun (Lian y Stein 1995; Collins et al. 2017). Así mismo, durante este periodo existe un aumento en la expresión de genes que codifican para colágeno I, fibronectina y TGF- $\beta$ , proteínas asociadas con la formación de matriz extracelular. La posterior acumulación de colágeno contribuye en parte a la disminución en el crecimiento celular y se detectan proteínas asociadas con el fenotipo de célula ósea como por ejemplo la fosfatasa alcalina (Owen et al. 1990; Lian y Stein 1995).

En el día 12 a 18 comienza la etapa de mineralización de la matriz extracelular. En presencia de RUNX2 y OSX, se inicia la diferenciación de una célula osteoprogenitora a una célula osteoblástica inmadura y, esta etapa se caracteriza por la modificación en la composición y organización de la matriz extracelular que la prepara para su posterior mineralización (Lian y Stein 1995; Collins et al. 2017). Esta célula osteoprogenitora tiene la capacidad de secretar fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea y colágeno tipo I, contribuyendo así en la formación del osteoide (Collins et al. 2017). Conforme las células se acercan a la etapa de mineralización, hay una disminución en la producción de fosfatasa alcalina (Owen et al. 1990).

La etapa de mineralización es notable del día 16 al 20 y de nuevo hay un aumento en la fosfatasa alcalina (Lian y Stein 1995). La detección de esta enzima es un marcador del linaje osteoblástico, pues estimulan la diferenciación del osteoblasto inmaduro en un osteoblasto maduro (Collins et al. 2017). Esta es la etapa en la que hay mayor expresión de genes de colagenasa y se relaciona con el remodelado de la matriz extracelular para su posterior mineralización. Así mismo, se encuentra un aumento en la producción de proteínas necesarias para la mineralización ósea como la sialoproteína, osteopontina y osteocalcina que permitirán la incorporación de hidroxapatita (Owen et al. 1990; Lian y Stein 1995). Por último, una vez que se mineralizó el hueso, la célula osteoblástica queda embebida en la matriz ósea, convirtiéndose en un osteocito (Collins et al. 2017).

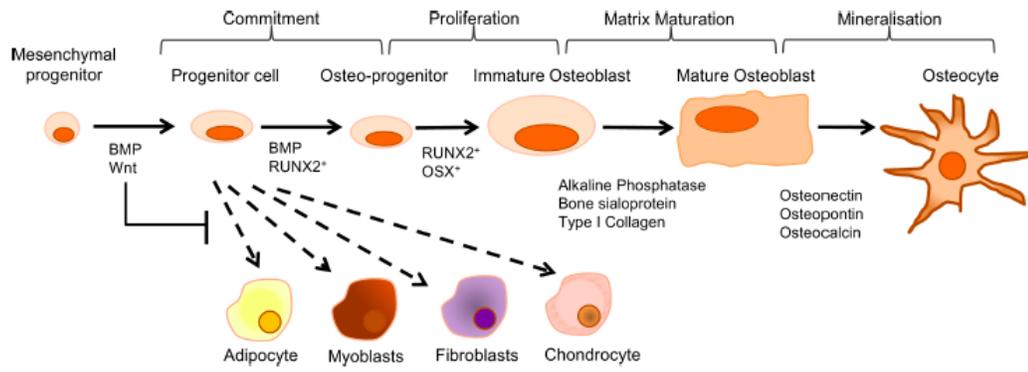


Figura 3. Diferenciación osteoblástica (Collins et al. 2017).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se cultivaron células mesenquimales del cordón umbilical (ATCC PCS-500-100) en presencia de una nanofibra de carboximetilcelulosa y nanopartículas de plata para su posterior análisis de depósitos de calcio con rojo alizarina y PCR para la expresión génica de COL1, RUNX2, ALP, Osteocalcina y B-actina.

### **5.1 Diseño del estudio**

Este estudio se realizó de modo abierto, por medio de grupos experimentales y controles, siendo prospectivo y transversal.

### **5.2 Universo del estudio**

El estudio se centrará en la efectividad del nanoandamio de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata que se obtuvieron del Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México utilizando células humanas del cordón umbilical (ATCC PCS-500-100, American Type Culture Collection, Estados Unidos) para la regeneración tisular periodontal.

### **5.3 Tamaño de la muestra**

Debido a que es un estudio *in vitro*, no se estima un tamaño de muestra del estudio. Sin embargo, para darle significancia estadística, las pruebas se harán por triplicado.

### **5.4 Criterios de selección (inclusión, exclusión y eliminación)**

En este estudio se incluyeron células madre mesenquimales humanas derivadas del cordón umbilical (ATCC PCS-500-010), eliminando los cultivos contaminados.

## 5.5 Descripción del procedimiento

Todos los procedimientos fueron realizados en la Unidad de Odontología Integral y Especialidades en el laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 5.5.1 Descongelación de la línea celular

1. Se sacó un criotubo que contenía la línea celular ATCC® PCS500010 que contenía  $1 \times 10^6$  células/ml del tanque de nitrógeno líquido a  $-130 \text{ }^\circ\text{C}$ .
2. El criotubo fue inmediatamente transferido a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas y posteriormente a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  por otras 24 horas.
3. El criotubo se sumergió  $\frac{3}{4}$  en agua a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su descongelación.
4. Se extrajo un ml del contenido del criotubo y se colocó en un tubo de 15 ml, al cual se le agregaron 3 ml de medio basal de células mesenquimales sin suplementar.
5. Se centrifugó a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  a 100 rcf por 10 minutos sin freno ni aceleración (figura 4)

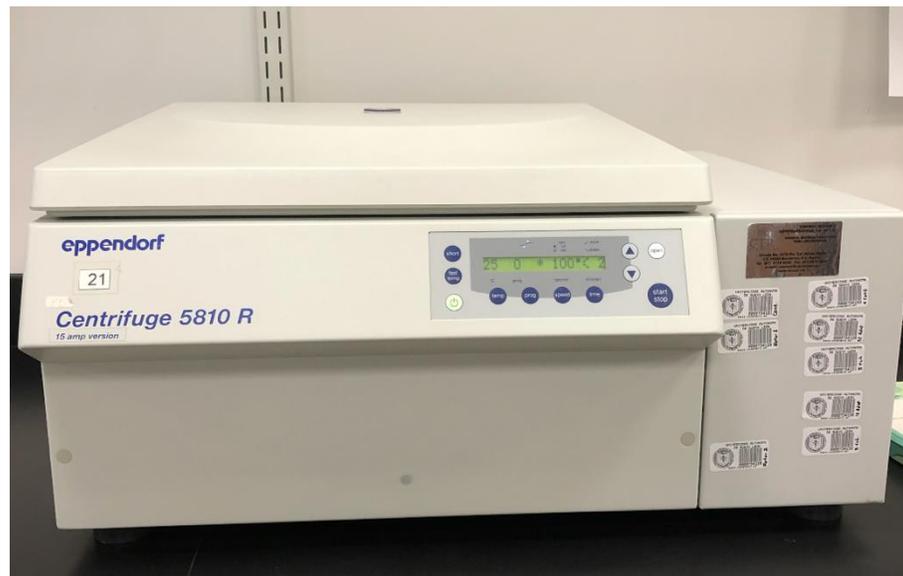


Figura 4. Centrifugadora.

6. Se descartó el sobrenadante en una sola intención, dejando el precipitado de células.
7. Se agregaron 4 ml de medio basal de células mesenquimales con MSC supplement (2% de suero fetal bovino, 5 ng/ml rh FGFb, 5 ng/ml rh FGFa, 5 ng/ml rh EGF),

antibiótico-antimicótico (100 unidades/ml de penicilina G, 125 µg/ml de estreptomicina, 25 ng/ml de anfotericina B) al tubo conteniendo el precipitado celular.

8. Se agitó manualmente suavemente hasta lograr una total suspensión de las células.

### **5.5.2 Cultivo inicial de células madre mesenquimales del cordón umbilical**

1. Las células fueron contadas y colocadas en frascos de cultivo celular T25, hasta un volumen de 4 ml.
2. Los frascos de cultivo celular fueron incubados a 37 °C 5% CO<sub>2</sub> por 8 días, hasta alcanzar la confluencia deseada (90%).

### **5.5.3 Pase de cultivo celular**

Al término de 8 días, se realizó el pase celular.

#### **5.5.3.1 Tripsinización**

1. Se retiró el medio de cultivo del frasco.
2. Se colocó 1 ml de 1X PBS para enjuagar, se hicieron ligeros movimientos circulares y se retiró el ml de 1X PBS.
3. Se agregó 1 ml de tripsina y se incubó por 5 minutos a 37°.
4. Se agregaron 3 ml de medio no preparado a cada caja.
5. Se pusieron 12 ml en un tubo de plástico y se centrifugó a 25°, 100 rcf por 10 minutos sin aceleración ni frenado.
6. Se suspendieron las células tirando el medio y se agregando 10 ml de medio preparado.

#### **5.5.3.2 Conteo celular por medio de la cámara de Neubauer**

La cámara de Neubauer sirve para realizar un recuento celular y consta de un cubreobjetos que se adhiere por tensión superficial y un portaobjetos de un grosor mayor en cuyo fondo se encuentra marcado con una cuadrícula de dimensiones conocidas.

1. Se limpió la cámara de Neubauer con algodón y alcohol.
2. Se colocó el cubreobjetos sobre los canales.
3. De forma manual se agitó el tubo con la dilución celular necesaria.
4. Se tomó 0.1 ml de la suspensión celular y con una pipeta de 100  $\mu$ l se colocó la punta de esta en el borde del cubreobjetos, dejando que la solución ingresara en la cámara.
5. Se visualizó al microscopio con un objetivo de 10x.
6. Se ubicó la cuadrícula de 25 cuadros y se cambió el lente objetivo a 40x para poder realizar el conteo celular.
7. Se contabilizaron las células en la Cámara de Neubauer para determinar cuantos  $\mu$ l eran necesarios para tener una concentración de 10,000 células por pozo.

#### **5.5.4 Montaje del ensayo de osteodiferenciación**

Se determinó que la cantidad necesaria de  $\mu$ l para obtener la concentración de 10,000 células mesenquimales ATCC® PCS500010 por pozo era de 100  $\mu$ l. Por lo que se prosiguió a colocar dicha cantidad en 50 de los 96 pozos de acuerdo con la figura 4. Las células se cultivaron por 24 horas a 37°.

##### 5.5.4.1 Colocación de medio de cultivo y membranas.

Una vez transcurridas 24 horas, se agregaron 100  $\mu$ l de medio basal mesenquinal (MBM) o de Osteodiff® (Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) según el caso, para conseguir un volumen de trabajo de 200  $\mu$ l. La distribución del medio en los pozos fue la siguiente (figura 5 y 6):

- A1-A9: MBM.
- B1-B12: MBM + nanofibras de carboximetilcelulosa.
- C1-C4: MBM + nanofibras TXT cytoplast.
- D1-D9: OsteoDiff.
- E1-E12: OsteoDiff + membranas de carboximetilcelulosa.
- F1-F4: OsteoDiff + membrana TXT cytoplast.

En los pozos que se colocó la nanofibra de carboximetilcelulosa, se utilizaron distintos

grosos de fibras que forman dicha nanofibra: 0.05 nm, 0.55 nm y 0.100 nm. El experimento se realizó por triplicado, motivo por el cual cada una de estas nanofibras está tres veces en la misma fila, las cuales fueron utilizadas para realizar el PCR de la expresión génica de COL1, RUNX2, ALP, Osteocalcina y B-actina. De igual manera, existe un cuarto pozo con cada una de las nanofibras, el cual se utilizó para realizar las pruebas de rojo alizarina para detectar la presencia de los depósitos de calcio. El cambio de medio se realizó cada 4 días y se dejó cultivando a 37° por 21 días antes de realizar el análisis de PCR y de rojo alizarina.

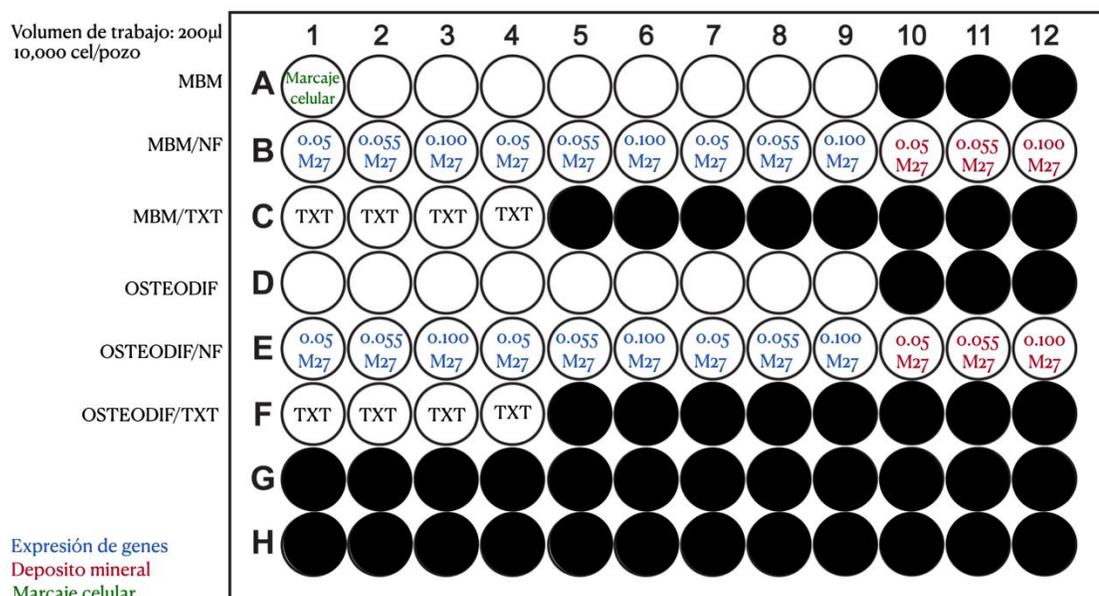


Figura 5. Diseño del ensayo de osteodiferenciación. Los círculos negros representan los pozos vacíos. El resto de los pozos contenían 100 µl de medio con células mesenquimales ATCC® PCS500010 y además se les agregó 100 µl de medio basal (MBM) o de Osteodiff, según el caso, hasta conseguir un volumen de trabajo de 200 µl con una concentración celular de 10,000 células por pozo. MBM: medio basal mesenquimal. NF: nanofibra. TXT: membrana cytoplast TXT-200. M27: membrana 27 a diferentes concentraciones.

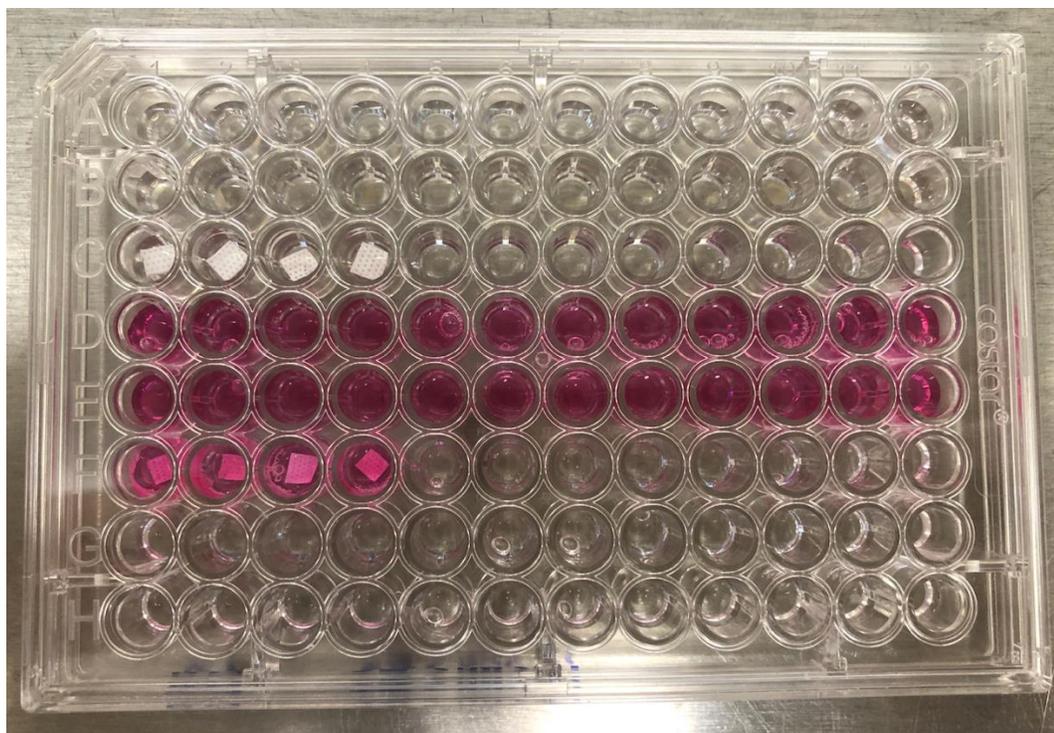


Figura 6. Placa de 96 pozos.

#### 5.5.4.2 Protocolos de tinción con rojo alizarina.

Los pozos B10 – B12, C4, E10 – E12 y F4 fueron destinados para observar, por medio de la tinción rojo alizarina, la presencia de depósitos minerales (figura 7). El día 21 de cultivo se realizó el análisis de depósitos de calcio con rojo alizarina de la siguiente manera:

1. La preparación de la solución de tinción se realizó disolviendo 0.5 gr de rojo alizarina en 25 ml de 1X PBS (2% de solución de rojo alizarina).
2. Se aspiró el medio de los pozos antes mencionados y se lavó con 1X PBS sin tocar la monocapa celular.
3. Se aspiró el 1X PBS y se colocó formalina al 10% hasta cubrir la monocapa celular.
4. Después de 1 hora, se aspiraron las células y se lavó con 1X PBS. Este paso se repitió dos veces más cada 5 minutos.
5. Se colocaron 100  $\mu$ l de rojo alizarina para cubrir la monocapa celular y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos (figura 7A).

6. Transcurrido dicho tiempo, se aspiró la tinción de rojo alizarina y se lavó la monocapa celular durante tres veces con 200  $\mu$ l de agua destilada (figura 7B).
7. Se aspiró el agua destilada y se observaron las células en el microscopio.
8. Dentro del protocolo de tinción del rojo alizarina, las muestras teñidas fueron tratadas con 10% de ácido acético (100  $\mu$ l de ácido acético por cada pozo) y eso fue cuantificado en un lector de microplacas de 96 pozos a 450 nm.



Figura 7. Tinción rojo alizarina. A. 100  $\mu$ l de rojo alizarina en los pocillos seleccionados. B. 200  $\mu$ l de agua destilada en los pocillos seleccionados.

### 5.5.5 Análisis PCR

Los pozos A1- A3, B1-B9, C1-C3, E1-E9 y F1-F3 fueron utilizados para realizar el PCR de la expresión génica de COL1, RUNX2, ALP, Osteocalcina y B-actina.

#### 5.5.5.1 Extracción de ARN para PCR

1. Se tomó la placa de la incubadora.
2. Por cada pozo, se retiró medio y se colocaron 50  $\mu$ l de 1X PBS.
3. Se retiró el 1X PBS y se colocó 50  $\mu$ l de tripsina.
4. Se dejó incubando por 10 minutos a 37°.

5. Se agregaron 150 µl de medio no preparado y se pasó a tubos de plástico para centrifugar a 300 rcf por 10 minutos sin aceleración ni freno.
6. Se agregó 1 ml de trisol y se hizo vortex 15 segundos cada uno y se dejó reposando por 15 minutos.
7. Se agregaron 200 µl de cloroformo, se hizo vortex 15 segundos cada uno y se dejó reposando por 15 minutos.
8. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos.
9. Se tomó la fase acuosa que contiene el ARN a un tubo de 1.5 ml.
10. Se agregaron 500 µl de isopropanol y se incubaron por 10 minutos.
11. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos.
12. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado de ARN durante 10 minutos.
13. El precipitado de ARN se suspendió en 20 ml de agua libre de nucleasas y se incubó durante 15 minutos a 60 °C.

#### 5.5.5.2 Retrotranscripción del ARN

1. Se obtuvieron 4 µl de RNA y se le agregó 1 µl de random primer.
2. Se incubó a 70 °C por 5 minutos y posteriormente se puso en frío a 4°C por otros 5 minutos.
3. Se centrifugó el tubo de 1.5 ml a 12,000 rpm por 5 minutos.
4. Por cada muestra se preparó 4 µl de buffer de reacción, 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de DNTP mix, 1 µl de RT y 6 µl de agua libre de nucleasas.
5. A esa mezcla se le añadieron los 5 µl de la mezcla de RNA + random primer, para llegar a un volumen final de 20 µl.
6. Se incubó a 25 °C por 5 minutos, posteriormente a 42 °C por 60 minutos, después a 70 °C por 15 minutos.

#### 5.5.5.3 Expresión génica

Para el análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real, se diseñaron oligonucleótidos dirigidos a los genes de fosfatasa alcalina, colágeno tipo 1 y Runx2, osteocalcina y beta actina como gen de referencia.

Las secuencias de ARNm se obtuvieron de la base de datos GenBank (NCBI). Runx2

Fwd: 5'-CTTCATTTGCACTGGGTAC-3', Runx2 Rv: 5'-

CTGCAAATCTCAGCCATGTT 3'; Colágeno de tipo I Fwd: 5'-  
 ACCAACTGAACGTGACCAAA-3', colágeno de tipo I Rv: 5'-  
 AGTGGGCAGAAAGGGACTTA-3'; osteocalcina Fwd: 5'-  
 CTGCATTCTGCCTCTCTGAC-3', osteocalcina Rv: 5'-  
 CCGGAGTCTATTACACCACCT-3'; fosfatasa alcalina Fwd: 5'-  
 CGTCAATTAACGGCTGACAC-3', y fosfatasa alcalina Rv: 5'-  
 TCTGGCACAAATGAGTTGGT-3'.

1. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos.
2. Se utilizaron 12,5 µL de mezcla maestra Maxima Sybr Green / qPCR 2 × (Thermo-Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), 3,32 µL de mezcla directa / inversa de cebadores, 2 µL de ADNc y 7,3 µL de agua libre con nucleasas con un volumen final de 25 µL.
3. El procedimiento se realizó en un termociclador LightCycler 480II (Roche, Basilea, Suiza), programado con el sistema de detección Sybr Green I en tres etapas; un ciclo de preincubación, 40 ciclos de amplificación, un ciclo para la curva de fusión y un ciclo de enfriamiento.
4. La preincubación fue a 95 ° C durante 10 min y una disminución de 4 ° C / s.
5. La amplificación se realizó con tres temperaturas: 95 ° C durante 10 s y una disminución de 4 ° C / s, una temperatura de alineación recomendada por cada par de cebadores (52 ° C) durante 15 s y una disminución de 2 ° C / s; finalmente a 72 ° C durante 10 s y una disminución de 4 ° C / s en el modo de adquisición individual.
6. La curva de disociación estuvo a 95 ° C durante 5 s 4 ° C / s, 65 ° C durante 1 min 2,2 ° C / s, y finalmente, a 97 ° C en modo de adquisición continua 5 ° C.
7. La etapa de enfriamiento fue de 40 ° C durante 30 s y 1,5 ° C / s durante 2 s.
8. Utilizando el análisis de expresión relativa, los valores del ciclo umbral (umbral de ciclo Ct) y los radios normalizados se calcularon mediante el método  $\Delta\Delta Ct$  utilizando el software LightCycler 480II (Roche, Basilea, Suiza) y el software Rest2009 (v2.0.13, QIAGEN, Hilden, Alemania); la expresión relativa se basa en la relación de expresión de un gen diana frente a un gen de referencia ( $\beta$ -actina).

9. Los valores de expresión génica de los tratamientos se compararon con células sin tratamiento y tratadas con Osteodiff como control negativo y positivo de osteodiferenciación, respectivamente.

## **5.6 Análisis estadístico**

Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para obtener los valores medios y las desviaciones estándar. Las diferencias entre el grupo control y los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey.

Las medianas y los errores estándar se calcularon para el análisis de expresión génica y se trazaron en un diagrama de caja y bigotes. Las diferencias se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo en todos los tratamientos. Se utilizó el paquete estadístico SPSS (v.22, IBM, North Castle, NY, EE. UU.) Y Excel (2017, Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.).

## **5.7 Consideraciones éticas**

"Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## 6. RESULTADOS

Para confirmar la diferenciación osteogénica se analizaron la expresión de marcadores osteogénicos como colágeno, osteocalcina, RUNX2, fosfatasa alcalina y depósitos de calcio a los 21 días de realizar el cultivo inicial. Los resultados se encuentran resumidos en las tablas III a la VII.

### 6.1 Expresión génica

#### 6.1.1 Colágeno

La expresión (R) génica de colágeno en presencia de la nano fibra de CMC a una concentración de 0.05 (NF1), de 0.55 (NF2) y de 0.100 (NF3) fue de R=1.157, R=1.104 y R=2.169 respectivamente, mientras que la expresión en presencia de la membrana de TXT fue de R=0.92. Por otra parte, en presencia de solo OsteoDiff fue de R=1.871. En cambio, en la presencia de OsteoDiff con la nano fibra fue de R=1.269, R=2.331 y R=2.417 para las concentraciones de CMC de 0.05 (Osteodiff + NF1), 0.55 (Osteodiff + NF2), y 0.100 (Osteodiff + NF3) respectivamente. Por último, el OsteoDiff en presencia de la membrana de TXT (Osteodiff + TXT), fue de R=1.114. Al realizar el análisis con el valor p se encontró una diferencia significativa en la expresión del gen de colágeno en la NF3, OsteoDiff, OsteoDiff + NF1, OsteoDiff + NF2, OsteoDiff + NF3, las cuales presentaron una sobreexpresión de este. Con base en lo anterior es posible determinar que, la presencia de la nano fibra con una concentración de 0.100 nm permite aumentar la expresión génica del colágeno (R=2.169) y, a pesar de que el OsteoDiff por si solo también permite una mayor expresión génica (R = 1.871), esta se potencializa cuando se combina este medio de diferenciación con la nano fibra con la concentración de 0.100 nm, realizando un sinergismo (R = 2.417) (ver tabla II).

Tabla II. Resultados del análisis estadístico del PCR de colágeno.

	Colágeno				Interpretación
	Expresión (R)	Error Estándar	IC 95%	Valor p	
Calibrador normalizado	1				
NF1	1.157	1.062 - 1.285	0.977 - 1.338	0.173	Sin cambio
NF2	1.104	0.047 - 9.889	0.043 - 10.829	0.965	Sin cambio
NF3	2.169	0.001 - 2.220	0.001 - 2.754	0.042	Sobreexpresión
TXT	0.92	0.835 - 0.999	0.797 - 1.077	0.22	Sin cambio
OsteoDiff	1.871	0.427 - 1.877	0.389 - 1.910	0.008	Sobreexpresión
OsteoDiff + NF1	1.269	0.904 - 1.301	0.822 - 1.287	0.043	Sobreexpresión
OsteoDiff + NF2	2.331	1.136 - 2.331	1.077 - 2.407	0.0066	Sobreexpresión
OsteoDiff + NF3	2.417	1.259 - 2.598	1.154 - 2.725	0.042	Sobreexpresión
OsteoDiff + TXT	1.114	0.502 - 1.287	0.464 - 1.242	0.46	Sin cambio

NF1: nano fibra de CMC a una concentración de 0.05. NF2: nano fibra de CMC a una concentración de 0.55. NF3: nano fibra de CMC a una concentración de 0.100. TXT: membrana cytoplast TXT-200.

### 6.1.2 Osteocalcina

La expresión génica de osteocalcina en presencia de la nanofibra de CMC a una concentración de 0.05, de 0.55 y de 0.100 fue de  $R=1.263$ ,  $R=1.315$  y  $R=0.871$  respectivamente, mientras que la expresión en presencia de la membrana de TXT fue de  $R=1.016$ . En presencia de OsteoDiff,  $R=1.94$ , mientras que en la combinación de OsteoDiff con la nanofibra a una concentración de 0.05 fue de  $R=1.555$ , 0.55 fue de  $R=3.555$  y 0.100 fue de  $R=1.655$ . Por último, el OsteoDiff con membrana de TXT fue de  $R=1.64$ . Al analizar estos resultados encontramos que existe una diferencia significativa en la sobreexpresión del gen osteocalcina en presencia de la NF2, OsteoDiff, OsteoDiff + NF1, OsteoDiff + NF2, OsteoDiff + NF3 y en OsteoDiff + TXT. Con base en lo anterior es posible determinar que, la presencia de la nanofibra con una concentración de 0.055 nm permite aumentar la expresión génica de la osteocalcina ( $R=1.315$ ) y, a pesar de que el OsteoDiff por si solo también permite una mayor expresión génica ( $R = 1.94$ ), esta se potencializa cuando se combina este medio de diferenciación con la nanofibra con la concentración de 0.55 nm, realizando un sinergismo ( $R = 3.555$ ) (ver tabla III).

Tabla III. Resultados del análisis estadístico del PCR de osteocalcina.

	Osteocalcina			Valor p	Interpretación
	Expresión (R)	Error Estándar	IC 95%		
Calibrador normalizado	1				
NF1	1.263	1.216 - 1.333	1.155 - 1.345	0.087	Sin cambio
NF2	1.315	0.928 - 1.289	0.882 - 1.318	0.039	Sobreexpresión
NF3	0.871	0.237 - 2.339	0.225 - 2.392	0.898	Sin cambio
TXT	1.016	0.909 - 1.170	0.864 - 1.196	0.765	Sin cambio
OsteoDiff	1.94	0.388 - 1.513	0.368 - 1.524	0.029	Sobreexpresión
OsteoDiff + NF1	1.555	1.477 - 1.677	1.411 - 1.715	0.047	Sobreexpresión
OsteoDiff + NF2	3.555	1.407 - 1.690	1.336 - 1.703	0.0066	Sobreexpresión
OsteoDiff + NF3	1.655	1.589 - 1.746	1.529 - 1.775	0.048	Sobreexpresión
OsteoDiff + TXT	1.64	1.540 - 1.761	1.463 - 1.788	0.021	Sobreexpresión

NF1: nanofibra de CMC a una concentración de 0.05. NF2: nanofibra de CMC a una concentración de 0.55. NF3: nanofibra de CMC a una concentración de 0.100. TXT: membrana cytoplast TXT-200.

### 6.1.3 RUNX2

La expresión génica de RUNX2 en presencia de la nanofibra de CMC a una concentración de: 0.05 fue de  $R=0.199$ ; 0.55 fue de  $R=2.041$ ; y de 0.100 fue de  $R=0.028$ . Por otra parte, la expresión génica en presencia de solo la membrana de TXT fue de  $R=0.873$ . En presencia de OsteoDiff,  $R=1.877$ , mientras que en la combinación de OsteoDiff con la nanofibra a una concentración de 0.05 fue de  $R=1.299$ , 0.55 fue de  $R=3.255$  y 0.100 fue de  $R=1.231$ . Por último, el OsteoDiff con membrana de TXT fue de  $R=1.558$ . Con base en el valor p, se determinó que hubo una diferencia significativa en la presencia de la nanofibra de 0.55 nm, OsteoDiff solo, OsteoDiff con nanofibra de 0.05 nm, OsteoDiff con nanofibra de 0.100 nm y OsteoDiff con membrana de TXT, en los cuales hubo una sobreexpresión del gen de RUNX2. Por otra parte, la nanofibra a una concentración de 0.05 nm presentó una disminución de la expresión de este gen. A pesar de que la presencia de solo la nanofibra de 0.55 nm y de solo el OsteoDiff aumentó la expresión génica de RUNX2 ( $R=2.041$  y  $R=1.877$  respectivamente), hubo una mayor expresión del gen al utilizarlos juntos, creando un sinergismo ( $R=3.255$ ) (ver tabla IV).

Tabla IV. Resultados del análisis estadístico del PCR de RUNX2.

	RUNX2				Interpretación
	Expresión (R)	Error Estándar	IC 95%	Valor p	
Calibrador normalizado	1				
NF1	0.199	0.183 - 0.214	0.177 - 0.217	0.012	Disminución de la expresión
NF2	2.041	0.000 - 7.460	0.000 - 7.815	0.004	Sobrexpresión
NF3	0.028	0.000 - 7.009	0.000 - 7.342	0.641	Sin cambio
TXT	0.873	0.692 - 1.003	0.668 - 1.047	0.27	Sin cambio
OsteoDiff	1.877	0.463 - 1.835	0.447 - 1.975	0.038	Sobrexpresión
OsteoDiff + NF1	1.299	0.952 - 1.239	0.919 - 1.298	0.043	Sobrexpresión
OsteoDiff + NF2	3.255	0.812 - 3.237	0.784 - 3.262	0.002	Sobrexpresión
OsteoDiff + NF3	1.231	1.197 - 1.285	1.178 - 1.292	0.043	Sobrexpresión
OsteoDiff + TXT	1.558	1.125 - 2.674	1.085 - 2.802	0.048	Sobrexpresión

NF1: nanofibra de CMC a una concentración de 0.05. NF2: nanofibra de CMC a una concentración de 0.55. NF3: nanofibra de CMC a una concentración de 0.100. TXT: membrana cytoplast TXT-200.

#### 6.1.4 Fosfatasa alcalina

La expresión génica de fosfatasa alcalina en presencia de la nanofibra de CMC a una concentración de 0.05, de 0.55 y de 0.100 fue de R=1.24, R=2.214 y R=0.895 respectivamente, mientras que la expresión en presencia de la membrana de TXT fue de R=1.079. En presencia de OsteoDiff, R=1.984, mientras que en la combinación de OsteoDiff con la nanofibra a una concentración de 0.05 fue de R=1.498, 0.55 fue de R=3.447 y 0.100 fue de R=1.598. Por último, el OsteoDiff con membrana de TXT fue de R=1.968. Al realizar el análisis con el valor p se encontró una diferencia significativa en la expresión del gen de fosfatasa alcalina en la NF2, OsteoDiff, OsteoDiff + NF1, OsteoDiff + NF2, OsteoDiff + NF3 y Osteodiff + TXT, las cuales presentaron una sobrexpresión de este. Con base en lo anterior es posible determinar que, la presencia de la nanofibra de 0.55 nm permite aumentar la expresión génica de la fosfatasa alcalina

(R=2.214) y, a pesar de que el OsteoDiff por si solo también permite una mayor expresión génica (R=1.984), esta se potencializa cuando se combina este medio de diferenciación con la nanofibra, especialmente con la concentración de 0.055 nm, realizando un sinergismo (R=3.447) (ver tabla V).

Tabla V. Resultados del análisis estadístico del PCR de fosfatasa alcalina.

	Fosfatasa alcalina				Interpretación
	Expresión (R)	Error Estándar	IC 95%	Valor p	
Calibrador normalizado	1				
NF1	1.24	1.191 - 1.317	1.119 - 1.334	0.089	Sin cambio
NF2	2.214	1.143 - 2.278	1.119 - 2.307	0.0067	Sobrexpresión
NF3	0.895	0.247 - 1.376	0.231 - 1.456	0.899	Sin cambio
TXT	1.079	0.970 - 1.264	0.928 - 1.307	0.524	Sin cambio
OsteoDiff	1.984	0.437 - 1.545	0.407 - 1.556	0.00915	Sobrexpresión
OsteoDiff + NF1	1.498	1.428 - 1.590	1.361 - 1.620	0.0079	Sobrexpresión
OsteoDiff + NF2	3.447	1.390 - 3.526	1.318 - 3.543	0.0065	Sobrexpresión
OsteoDiff + NF3	1.598	1.490 - 1.735	1.390 - 1.761	0.0065	Sobrexpresión
OsteoDiff + TXT	1.968	1.511 - 2.201	1.409 - 2.308	0.0083	Sobrexpresión

NF1: nanofibra de CMC a una concentración de 0.05. NF2: nanofibra de CMC a una concentración de 0.55. NF3: nanofibra de CMC a una concentración de 0.100. TXT: membrana cytoplast TXT-200.

Así mismo, es importante señalar que la presencia de la membrana TXT por si sola, no presentó un aumento en la expresión génica de ninguno de los cuatro genes analizados en este estudio, lo cual demuestra el potencial de osteodiferenciación de la membrana de carboximetilcelulosa.

## 6.2 Depósitos de calcio

La densidad óptica 595 nm de los depósitos de calcio por medio de rojo alizarina se presentan en la figura 8. Los resultados se compararon por medio de la prueba de Tukey's HSD con un valor F ANOVA de  $1.2220880816499562e+32$  y un valor  $P = 0$ .

Se observó una producción de depósitos de calcio en el medio basal mesenquimal con un valor de OD 595 nm = 0.011 y se observó un valor estadísticamente significativo mayor ( $p < 0.05$ ) al usar el MBM con la nanofibra de 0.05 nm, 0.55 nm y 0.1 nm con un OD 595 nm = 0.131, OD 595 nm = 0.126 y OD 595 nm = 0.192, respectivamente. De igual manera, se encontró una diferencia estadísticamente significativa mayor ( $P < 0.05$ ) al usar una de las tres nanofibras en presencia de OsteoDiff (NF1: OD 595 nm = 0.192; NF2: OD 595 nm = 0.16; NF3 OD 595 nm = 0.215) en comparación con el uso de estas, pero en MBM. Así mismo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa mayor en el uso de las nanofibras en el MBM y en el OsteoDiff en comparación de la presencia de la membrana TXT en cualquiera de estos dos medios (MBM +TXT: OD 595 nm = .064 y OsteoDiff + TXT: OD 595 nm = 0.021).

Al igual que la expresión de genes, los resultados demuestran que el uso de la membrana TXT no parece tener tanto efecto en los depósitos de calcio en comparación con el uso de las nanofibras de carboximetilcelulosa.

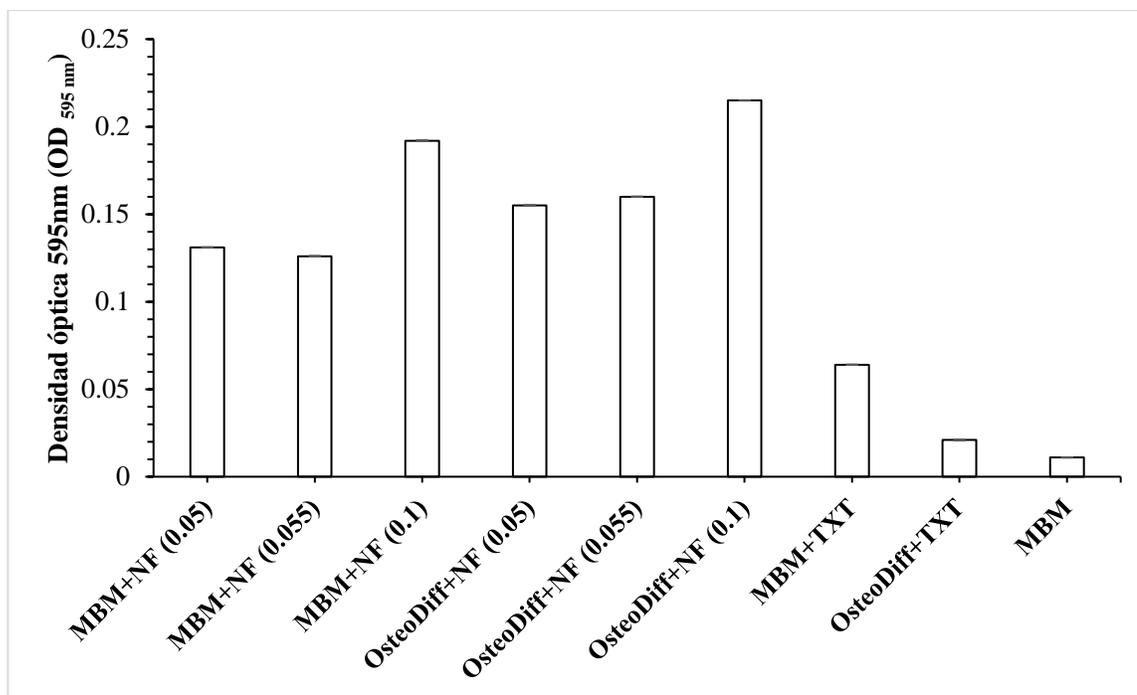


Figura 8. Densidad óptica 595 nm de los depósitos de calcio por medio de rojo alizarina. NF: nanofibra. TXT: membrana cytoplasmática TXT-200. MBM: medio basal mesenquimal.

Tabla VI. Análisis de la prueba de Tukey sobre la cuantificación de rojo alizarina

Tratamiento	Tukey's HSD	Valor P
MBM + NF (0.05) vs MBM + NF (0.55)	0.005	0
MBM + NF (0.05) vs MBM + NF (0.100)	0.061	0
MBM + NF (0.05) vs OsteoDiff + NF (0.05)	0.024	0
MBM + NF (0.05) vs OsteoDiff + NF (0.055)	0.029	0
MBM + NF (0.05) vs OsteoDiff + NF (0.1)	0.084	0
MBM + NF (0.05) vs MBM+ TXT	0.067	0
MBM + NF (0.05) vs OsteoDiff + TXT	0.11	0
MBM + NF (0.05) vs MBM	0.12	0
MBM + NF (0.55) vs MBM + NF (0.1)	0.066	0
MBM + NF (0.55) vs OsteoDiff + NF (0.05)	0.029	0
MBM + NF (0.55) vs OsteoDiff + NF (0.055)	0.034	0
MBM + NF (0.55) vs OsteoDiff + NF (0.1)	0.089	0
MBM + NF (0.55) vs MBM+ TXT	0.062	0
MBM + NF (0.55) vs OsteoDiff + TXT	0.105	0
MBM + NF (0.55) vs MBM	0.115	0
MBM + NF (0.1) vs OsteoDiff + NF (0.05)	0.037	0

MBM + NF (0.1) vs OsteoDiff + NF (0.055)	0.032	0
MBM + NF (0.1) vs OsteoDiff + NF (0.1)	0.023	0
MBM + NF (0.1) vs MBM+ TXT	0.128	0
MBM + NF (0.1) vs OsteoDiff + TXT	0.171	0
MBM + NF (0.1) vs MBM	0.181	0
OsteoDiff + NF (0.05) vs OsteoDiff + NF (0.55)	0.005	0
OsteoDiff + NF (0.05) vs OsteoDiff + NF (0.1)	0.06	0
OsteoDiff + NF (0.05) vs MBM + TXT	0.091	0
OsteoDiff + NF (0.05) vs OsteoDiff + TXT	0.134	0
OsteoDiff + NF (0.05) vs MBM	0.144	0
OsteoDiff + NF (0.55) vs OsteoDiff + NF (0.1)	0.055	0
OsteoDiff + NF (0.55) vs MBM + TXT	0.096	0
OsteoDiff + NF (0.55) vs OsteoDiff + TXT	0.139	0
OsteoDiff + NF (0.55) vs MBM	0.149	0
OsteoDiff + NF (0.1) vs MBM + TXT	0.151	0
OsteoDiff + NF (0.1) vs OsteoDiff + TXT	0.194	0
OsteoDiff + NF (0.1) vs MBM	0.204	0
MBM + TXT vs OsteoDiff + TXT	0.043	0
MBM + TXT vs MBM	0.053	0
Osteodiff + TXT vs MBM	0.01	0

---

NF: nanofibra. TXT: membrana cytoplasmática TXT-200. MBM: medio basal mesenquimal.

## 7. DISCUSIÓN

En el 2016, Martínez-Rodríguez y cols. desarrollaron una nanofibra de carboximetilcelulosa (CMC) con nanopartículas de placa (NPAG) y alcohol polivinílico (APV) a partir del electrohilado de mezclas de soluciones acuosas de compuesto CMC-NPAG y APV, que se prepararon en diferentes proporciones en peso de CMC/APV. Los autores mencionan que esta es la nanofibra más delgada reportada en la literatura y tiene una aplicación potencial en la fabricación de andamios antibacterianos para la ingeniería de tejidos, las cuales pueden aplicarse en áreas como la médica y la odontológica (Martínez-Rodríguez et al. 2016). Esta nanofibra es la utilizada en este estudio siendo evidente la biocompatibilidad celular al permitir la osteodiferenciación de las células madre y su cultivo por 21 días, confirmando su potencial uso en materiales regenerativos en la periodoncia.

De igual manera, en el 2016, Laredo-Naranjo y cols. determinaron el efecto antibacteriano de nanopartículas de plata en una matriz de carboximetilcelulosa sobre placas de titanio en concentraciones de 16%, 50% y 100%. A estos cultivos se les agregó *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* y utilizaron clorhexidina al 0.12% como control. Los autores encontraron que las nanopartículas de plata en todas las concentraciones fueron antimicrobianas, siendo las concentraciones de 50% y 100% más citotóxicas con 4% de viabilidad celular. Por otra parte, las nanopartículas de plata al 16% tuvieron una viabilidad celular del 95%, siendo menos citotóxicas que la clorhexidina al 0.12% (Laredo-Naranjo et al. 2016b). El presente estudio confirmó que las nanopartículas de plata en un nanoandamio de carboximetilcelulosa son útiles como andamio antibacteriano al permitir la osteodiferenciación de las células madre del cordón umbilical sin cambios morfogénicos, ni indicios citotóxicos o de contaminación bacteriana o fúngica en los cultivos celulares.

En el 2016, Vimalraj y cols. sintetizaron un andamio que contenía carboximetilcelulosa, nanohidroxiapatita y ácido ascórbico para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo. La capacidad del andamio junto con una molécula bioactiva, microARN-15b (que actúa como regulador génico postranscripcional y regula la diferenciación de osteoblastos) para la osteodiferenciación a nivel celular y molecular se determinó utilizando células madre mesenquimales de ratón. Los autores encontraron que efectivamente este andamio promovió la diferenciación de osteoblastos lo cual comprobaron por medio de un aumento en los depósitos de calcio, expresión de Runx2, ALP y colágeno tipo I en aquellos cultivos en los que solo había medio DMEM y el nanoandamio, sin el micro-ARN (Vimalraj et al. 2016). Lo comparable con esta investigación es la capacidad de diferenciación celular en presencia de la carboximetilcelulosa, con la subsecuente mineralización y aumento en la expresión de genes osteodiferenciadores, siendo este componente biocompatible y con potencial elección para su uso en materiales regenerativos.

Así mismo, en el 2015 Teti y colaboradores publicaron un estudio en el cual verificaron la diferenciación osteogénica y odontogénica de células madre de pulpa dental cultivadas en un hidrogel híbrido de carboximetilcelulosa-hidroxiapatita. Lo anterior fue realizado por medio del cultivo de células madre en un hidrogel híbrido de carboximetilcelulosa-hidroxiapatita y en hidrogel de carboximetilcelulosa durante 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días, realizando ensayos viabilidad celular y análisis ultramorfológicos para evaluar la biocompatibilidad y la adhesión celular. Por medio de un PCR en tiempo real, los autores encontraron un aumento en la expresión génica de RUNX2 y de colágeno tipo 1 (Teti et al. 2015). De igual manera, nuestros resultados demuestran un aumento en la expresión génica de ambos genes en presencia del nanoandamio de carboximetilcelulosa en comparación con la membrana control (TXT), por lo cual puede considerarse como candidato prometedor para la ingeniería del tejido periodontal.

Gorgieva y colaboradores fabricaron andamios de gelatina enriquecida con nanofibrillas de celulosa para evaluar el crecimiento de las células madre mesenquimales. Los autores observaron que en todos los andamios que contenían este nanofibrilla

resultaron en una deposición de  $\text{Ca}^{2+}$  más extensa en comparación con el control positivo o el andamio gel puro (Gorgieva et al. 2017). Al igual que ellos, los resultados en esta investigación demuestran que el uso de las nanofibras de carboximetilcelulosa tiene mayor efecto en los depósitos de calcio en comparación con el grupo control, en este caso la membrana de TXT.

Qi y colaboradores fabricaron láminas no tejidas de carboximetilcelulosa cargadas con fosfato de calcio (CaP) e investigaron su potencial para inducir la diferenciación de células mesenquimales humanas (hMSC) en osteoblastos *in vitro* e *in vivo* en ratones. Los autores encontraron que en ausencia de CaP, las hMSC en la lámina de CMC tenían una expresión mejorada de fosfatasa alcalina (ALP) únicamente, lo que indica una diferenciación temprana de osteoblastos. Así mismo, *in vivo* encontraron hueso nuevo con células que expresaban el factor de transcripción Sp7/Osterix, que es esencial para la diferenciación de los osteoblastos (Qi et al. 2018). Al igual que en el presente estudio, de nuevo se demuestra el potencial de las membranas de carboximetilcelulosa en su uso como andamios para la regeneración ósea por medio del aumento de la expresión génica de marcadores ostogénicos.

Sakamoto y colaboradores estudiaron las capacidades de regeneración ósea una lámina no tejida de carboximetilcelulosa cargada con fosfato de calcio (CaP) (CMC/CaP) utilizando un modelo de defecto del cóndilo femoral lateral de perro. Los autores encontraron que la tasa de formación de hueso nuevo en el grupo de CMC/CaP fue significativamente más alta que en los grupos de control y CMC según la microtomografía computarizada y la evaluación histológica. Por lo tanto, se concluyó que estas láminas promueven la formación de hueso nuevo y es útil como sustituto de injerto óseo (Sakamoto et al. 2019). En este caso, nuestro experimento realizado *in vivo* comprueba el uso de la CMC para la regeneración ósea, por lo cual sería importante dar continuidad al presente estudio y ver si el nanoandamio de carboximetilcelulosa en presencia de nanopartículas de plata y alcohol polivinílico sería efectivo en la osteodiferenciación y regeneración de defectos óseos *in vivo*.

## 8. CONCLUSIONES

Fue posible estimular la diferenciación de células madre del cordón umbilical en células osteoblásticas en presencia de un nanoandamio de carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata y alcohol polivinílico así como en el grupo control con una membrana de TXT.

Así mismo, fue posible comprobar que esta nanofibra promueve la expresión de genes osteogénicos como colágeno tipo I, ALP, osteocalcina, B-actina y RUNX2, así como la estimulación de la deposición de calcio, comprobando la hipótesis de investigación propuesta. En todos los casos, la membrana de CMC indujo una mayor expresión y deposición que la membrana de TXT.

El presente estudio demuestra el potencial uso de la nanofibra como un nanoandamio para la regeneración de defectos óseos, sin embargo, es necesario realizar estudios *in vivo* para confirmar su efecto en la diferenciación celular.

## 9. LITERATURA CITADA

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Review in Biomedical Engineering*. 2012;40(5): 363–408.

Bashutski J, Oh TJ, Chan HL, Wang HL, Arbor A. Guided Tissue Regeneration: A Decision-Making Model. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2011;13(2):48-57.

Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung J, Freire M, et al. Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy: *Journal of cellular physiology*. 2016;231(1):50-61.

Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(13):7202

Caffesse RG, Mota LF, Quiñones CR, Morrison EC. Clinical comparison of resorbable and non-resorbable barriers for guided periodontal tissue regeneration. *Journal of clinical periodontology*. 1997;24(10):747-752.

Caffesse RG, Sweeney PL, Smith BA. Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. *Journal of clinical periodontology*. 1986;13(3):205-210.

Carnevale G, Kaldahl WB. Osseous resective surgery: Osseous resective surgery. *Periodontology 2000*. 2000;22:59-87.

Caton JG, DeFuria EL, Polson AM, Nyman S. Periodontal Regeneration via Selective Cell Repopulation. *Journal of periodontology*. 1987;58(8):546-552.

Collins F, Naiomy RA, Schepper J, Parameswaran N, McCabe L. The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis. *Microbiology spectrum*. 2017;5(4):10

Daculsi G. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes. *Innovation and Research in BioMedical engineering*. 2013;34 (4):346-348.

Ding H, Cheng Y, Niu X, Hu Y. Application of electrospun nanofibers in bone, cartilage and osteochondral tissue engineering. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*. 2021;32(4):536-561.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology*. 2000;109(1):235-242.

- Flemming T. Periodontitis. *Annals of periodontology*. 1999;4(1):32-38.
- Frencken J. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44 Suppl 18:S94-S105.
- Fu J, Wang Y, Jiang Y, Du J, Xu J, Liu Y. Systemic therapy of MSCs in bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *Stem cell research & therapy*. 2021;12(1):377.
- Girija J, Cg D, Ashish Y, Swati S. Stem cells: newer approach for periodontal regeneration. *Unique Journal of Medical and Dental Sciences*. 2014;2(2):13-19.
- Goldman HM, Cohen DW. The infrabony Pocket: Classification and Treatment. *Journal of Periodontology*. 1958;29(4):272-291.
- Gorgieva S, Girandon L, Kokol V. Mineralization potential of cellulose-nanofibrils reinforced gelatine scaffolds for promoted calcium deposition by mesenchymal stem cells. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2017;73:478-489.
- Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *Journal of clinical periodontology*. 1984;11(8):494-503.
- Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in immunology*. 2014;35(1):3-11.
- Hammerle C, Jung R. Bone augmentations by means of barrier membranes.pdf. *Periodontology 2000*. 2003;33:36-53
- Herrera D, Figuero E, Shapira L, Jin L, Saenz M. La nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Periodoncia clínica*. 2018;11(11)
- Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of immunology research*. 2015;2015:1-10.
- Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal*. 2009;54 Suppl 1:S11-S26.
- Hoexter DL. Bone regeneration graft materials. *The Journal of oral implantology*. 2002;28(6):290-294.
- Horowitz MC, Bothwell ALM, Hesslein DGT, Pflugh DL, Schatz DG. B cells and osteoblast and osteoclast development. *Immunological reviews*. 2005;208:141-153.
- Kao RT, Murakami S, Beirne OR. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. *Periodontology 2000*. 2009;50:127-153.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2007;3(1):95-101.

Lang N, Tonetti M. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral health & preventive dentistry*. 2003;1(1):7-16.

Larato DC. Intrabony Defects in the Dry Human Skull. *Journal of periodontology*. 1970;41(9):496-498.

Laredo-Naranjo MA, Carrillo-Gonzalez R, De La Garza-Ramos MA, Garza-Navarro MA, Torre-Martinez HHH, Del Angel-Mosqueda C, et al. Antimicrobial properties and dental pulp stem cell cytotoxicity using carboxymethyl cellulose-silver nanoparticles deposited on titanium plates. *Acta Biomater Odontol Scand*. 19 de diciembre de 2016a;2(1):60-7.

Laredo-Naranjo MA, Carrillo-Gonzalez R, De La Garza-Ramos MA, Garza-Navarro MA, Torre-Martinez HHH, Del Angel-Mosqueda C, et al. Antimicrobial properties and dental pulp stem cell cytotoxicity using carboxymethyl cellulose-silver nanoparticles deposited on titanium plates. *Acta biomaterialia odontologica Scandinavica*. 2016;2(1):60-67.

Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *The Iowa orthopaedic journal*. 1995;15:118-40.

Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. Global Economic Impact of Dental Diseases. *Journal of dental research*. 2015;94(10):1355-1361.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *The Journal of periodontology*. 1965;36:177-187.

Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2011;13(1):27-38.

Loozen G, Ozcelik O, Boon N, De Mol A, Schoen C, Quirynen M, et al. Inter-bacterial correlations in subgingival biofilms: a large-scale survey. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41(1):1-10.

Madan N, Madan N, Bajaj P, Gupta N, Yadav S. Stem Cells – A Scope For Regenerative Medicine. *The Internet Journal of Bioengineering*. 2008;4(2):9.

Manson JD. Bone morphology and bone loss in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 1976;3(1):14-22.

Martínez-Rodríguez MA, Garza-Navarro MA, Moreno-Cortez IE, Lucio-Porto R, González-González VA. Silver/polysaccharide-based nanofibrous materials synthesized from green chemistry approach. *Carbohydrate polymers*. 2016;136:46-53.

McGuire MK, Nunn ME. Prognosis Versus Actual Outcome. II. The Effectiveness of Clinical Parameters in Developing an Accurate Prognosis. *J Periodontol.* julio de 1996;67(7):658-65.

Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000.* 2015;69(1):7-17.

Moise KJ Jr. Umbilical Cord Stem Cells. *Obstetrics and gynecology.* 2005;106(6):1393-1407.

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 1 de octubre de 2005;16(10):2346-2353.

Murugan R, Ramakrishna S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue engineering.* 2006;12(3):435-447.

Nayl AA, Abd-Elhamid AI, Awwad NS, Abdelgawad MA, Wu J, Mo X, et al. Recent Progress and Potential Biomedical Applications of Electrospun Nanofibers in Regeneration of Tissues and Organs. *Polymers.* 2022;14(8):1508.

Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences.* 2017;11(2):72-80.

Needleman I, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker R. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2006;(2):CD001724.

Nemoto Y, Kubota T, Nohno K, Nezu A, Morozumi T, Yoshie H. Clinical and CBCT Evaluation of Combined Periodontal Regenerative Therapies Using Enamel Matrix Derivative and Deproteinized Bovine Bone Mineral With or Without Collagen Membrane. *The International journal of periodontics & restorative dentistry.* 2018;38(3):373-381.

Nielsen IM, Glavind L, Karring T. Interproximal periodontal intrabony defects. Prevalence, localization and etiological factors. *Journal of clinical periodontology.* 1980;7(3):187-198.

Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen P. Barrier membranes: More than the barrier effect?. *Journal of clinical periodontology.* 2019;46 Suppl 21(Suppl Suppl 21):103-123.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of cellular physiology.* 1990;143(3):420-430.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions: Classification and case definitions for periodontitis. *Journal of periodontology*. 2018;89 Suppl 1:S173-S182.

Papapanou PN, Tonetti MS. Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions: Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions. *Periodontology* 2000. 2000;22:8-21.

Papapanou PN, Wennstrom JL, Grondahl K. Periodontal status in relation to age and tooth type. A cross-sectional radiographic study. *Journal of clinical periodontology*. 1988;15(7):469-478.

Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology* 2000. 2012;60(1):15-39.

Qi P, Ohba S, Hara Y, Fuke M, Ogawa T, Ohta S, et al. Fabrication of calcium phosphate-loaded carboxymethyl cellulose non-woven sheets for bone regeneration. *Carbohydrate polymers*. 2018;189:322-330.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*. 2009;27(1):76-83.

Reynolds MA, Kao RT, Nares S, Camargo PM, Caton JG, Clem DS, et al. Periodontal Regeneration — Intrabony Defects: Practical Applications From the AAP Regeneration Workshop: Enhancing Periodontal Health Through Regenerative Approaches. *Clinical advances in periodontics*. 2015;5(1):21-29.

Rosen PS, Reynolds MA, Bowers GM. The treatment of intrabony defects with bone grafts: The treatment of intrabony defects with bone grafts. *Periodontology* 2000. 2000;22:88-103.

Saini R, Saini S, Sharma S. Therapeutics of stem cells in periodontal regeneration. *Journal of natural science, biology, and medicine*. 2011;2(1):38-42.

Sakamoto A, Qi P, Ohba S, Ohta S, Hara Y, Ogawa T, et al. Bone regeneration by calcium phosphate-loaded carboxymethyl cellulose nonwoven sheets in canine femoral condyle defects. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2019;107(5):1516-1521.

Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *Journal of clinical periodontology*. 2019;46 Suppl 21:82-91.

Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T, et al. Treatment of stage I–III periodontitis—The EFP S3 level clinical practice guideline. *Journal of clinical periodontology*. 2020;47 Suppl 22(Suppl 22):4-60.

Shen S, Zhang Y, Zhang S, Wang B, Shang L, Shao J, et al. 6-Bromoindirubin-3'-oxime Promotes Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells and Facilitates Bone Regeneration in a Mouse Periodontitis Model. *ACS biomaterials science & engineering*. 2021;7(1):232-241.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-144.

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease: Refractory microbial profiles. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(3):260-268.

Sodek J, Mckee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone: Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology 2000*. 2000;24:99-126.

Teti G, Salvatore V, Focaroli S, Durante S, Mazzotti A, Dicarolo M, et al. In vitro osteogenic and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells seeded on carboxymethyl cellulose-hydroxyapatite hybrid hydrogel. *Frontiers in physiology*. 2015;6:297.

The American Academy of periodontology. *Glossary of Periodontal Terms*. 4.<sup>a</sup> ed. 2001.

Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man.: II. A Longitudinal Clinical and Bacteriological Investigation. *Journal of periodontal research*. 1966;1:1-13.

Tonetti MS, Prato GP, Williams RC, Cortellini P. Periodontal Regeneration of Human Infrabony Defects. III. Diagnostic Strategies to Detect Bone Gain. *Journal of periodontology*. 1993;64(4):269-277.

Venugopal J, Low S, Choon AT, Ramakrishna S. Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2008;84(1):34-48.

Vimalraj S, Saravanan S, Vairamani M, Gopalakrishnan C, Sastry TP, Selvamurugan N. A Combinatorial effect of carboxymethyl cellulose based scaffold and microRNA-15b on osteoblast differentiation. *International journal of biological macromolecules*. 2016;93(Pt B):1457-1464.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-1337.

Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. *Stem cell reviews*. 2006;2(2):155-162.

Yi H, Ur Rehman F, Zhao C, Liu B, He N. Recent advances in nano scaffolds for bone repair. *Bone research*. 2016;4:16050

Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International journal of nanomedicine*. 2020;15:2555-2562.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Karen Lissette Villarreal Arizpe

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el área de Periodoncia con Implantología Oral

**Tesis:** PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL *IN VITRO* UTILIZANDO UN NANOANDAMIO DE CARBOXIMETILCELULOSA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA.

**Campo de Estudio:** Ciencias de la Salud.

**Datos Personales:** Nacida en Monterrey, Nuevo León el 6 de enero de 1996, hija de Héctor Javier Villarreal Reyes y Adelfa Arizpe Elizondo.

**Educación:** Egresada del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, grado obtenido Médico Cirujano Odontólogo en el 2020 con mención honorífica de excelencia, primer lugar de la generación.