

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



Evaluación de la expresión de MEG3 durante la diferenciación osteogénica de hMSCs-AD en hidrogel de matriz extracelular ósea

No. De registro 2023-1

**TESIS QUE PRESENTA:
REBECA ALVARADO AGUIRRE**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

**DIRECTORES DE TESIS:
DR ALFREDO AYALA HAM
DR ROSALIO RAMOS PAYAN**

18 DE DICIEMBRE 2023, CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma de Sinaloa y el Sistema de Gestión de la Dirección General de Investigaciones y Posgrados PROFAPI 2022 Con Clave PRO_A3_010 bajo la dirección del Dr Alfredo del Rosario Ayala Ham.

Beca para estudios de posgrados CONAHCYT número 1143625.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con especial cariño a mis papás.

A ti mamá, Rebeca Aguirre López, que haces que lo imposible se vuelva posible, valoro todos tus esfuerzos y tu amor incondicional, gracias por hacerme saber que siempre hay una luz al final del tunel cuando todo se pone oscuro.

A ti papá, Miguel Alvarado Lizárraga, por apoyarme en todas mis decisiones, gracias por confiar siempre en mí y por hacerme sentir que puedo lograr todo lo que me propongo.

Sin ustedes este sueño no se habría cumplido. Los amo con todo mi corazón.
Despues de este largo camino: LO LOGRAMOS!.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Yolanda Castro y al Dr. Alfredo Ayala por permitirme formar parte de la 8va generación de endodoncia. Gracias por su esfuerzo y dedicación para poner en alto el nombre de este gran posgrado. A todos mis maestros, por hacerme crecer profesionalmente, por compartir su conocimiento conmigo e incitarme cada día a superarme.

A mi co-director de tesis Dr. Rosalío Ramos por sus consejos y apoyo en la elaboración de este estudio. Gracias a la Dra Mariana Avendaño Felix por asesorarme y ser mi guía durante todo el proceso, sin usted no hubiera llegado a la meta de mi camino.

Gracias a los que compartieron 24/7 por 2 años y medio conmigo, mis compañeros de generación: Kenia, Kevin, Cris, Juan Carlos, Kathya, Paola, Yoss y Alejandro. Me siento afortunada de coincidir y deseo que cumplan todas sus metas, se que llegaran muy lejos. Tienen un lugar especial en mi corazón. Una palabra: hermanos!.

Y por último agradezco a mi novio, David Páez, por todo el cariño, amor y paciencia que recibí de tu parte. Gracias por apoyarme en todo momento y ayudarme a enfrentar mis miedos. Te amo.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUCCIÓN	12
1.1 MARCO TEÓRICO	14
1.1.1 Tejido Oseo	14
1.1.2 Componentes celulares.....	14
1.1.3 Matriz Extracelular (MEC)	16
1.1.4 Regeneración ósea	17
1.2 Ingeniería de tejidos	18
1.2.1 Factores de crecimiento	19
1.2.2 Biomateriales.....	20
1.3 Células troncales mesenquimales	22
1.3.1 Diferenciación osteogénica	25
1.4 RNA Largos no codificantes.....	27
1.4.1 MEG3	29
1.5 Antecedentes	30
1.6 JUSTIFICACIÓN	32
1.7 HIPÓTESIS	33
1.8 OBJETIVOS	34
1.8.1 Objetivo general	34
1.8.2 Objetivo específicos	34
2 METODOLOGÍA	35

2.1	Diseño experimental	35
2.2	Lugar de obtención de la muestra.....	35
2.3	Población de estudio.....	35
2.4	Diseño metodológico.....	35
2.4.1	Cultivo celular	35
2.4.2	Diferenciación osteogénica	36
2.4.3	Tinción de cristales de calcio con Rojo de Alizarina.....	36
2.5	Extracción de RNA.....	36
2.5.1	Cuantificación de RNA total.....	37
2.5.2	RT-qPCR.....	37
2.6	Análisis estadístico.....	37
3	RESULTADOS.....	38
3.1	Evaluación morfológica	38
3.2	Tinción con rojo de alizarina	41
3.3	Expresión génica (qPCR).....	44
3.3.1	Análisis de Expresión relativa de MEG3 en qPCR.....	44
3.3.2	Análisis de Expresión relativa de RUNX2 en qPCR.....	46
3.3.3	Análisis de Expresión relativa de SP7 en qPCR	48
3.3.4	Análisis de Expresión relativa de ALPL en qPCR	50
3.3.5	Análisis de Expresión relativa de BSP en qPCR.....	52
4	DISCUSIÓN	54
5	CONCLUSIONES	56
6	REFERENCIAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografías electrónicas de porciones de hueso alveolar de ratas.	15
Figura 2. Diferenciación multilínea de Células Troncales Mesenquimales.	24
Figura 3. Imágenes representativas tomadas a 10x de hMSCs-AD sobre cultivo 2D y 3D en medio convencional y osteogénico.	40
Figura 4. Comparación de tinción con rojo de alizarina entre el cultivo de células hMSCs-AD en medio convencional en 2D y 3D al día 10 de cultivo.	42
Figura 5. Comparación de tinción con rojo de alizarina entre el cultivo células hMSCs-AD en medio osteogénico en condiciones 2D y 3D al día 10 de cultivo. ...	43
Figura 6. Expresión génica de MEG3.	45
Figura 7. Expresión génica de RUNX2	47
Figura 8. Expresión génica de SP7	49
Figura 9. Expresión génica de ALPL.	51
Figura 10. Expresión génica de BSP	53

ABREVIATURAS

hMSCs-AD: Células mesenquimales de tejido adiposo
MEG3: Gen expresado maternamente
ALPL: Fosfatasa alcalina
BSP: Sialoproteína ósea
SP7: Osterix
RUNX2: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt
ACTB: Actina Beta
MEC: Matriz extracelular
lncRNA: RNA largo no codificante
MSCs: Células madre mesenquimales
NCP: proteínas no colágenas
BMP: proteínas morfogénicas óseas
TGF- β : Factor insulinoide de crecimiento beta
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
DBM : Matriz ósea desmineralizada
MMP13: Colagenasa 3
RNAm: RNA mensajero
PDLSC : Células mesenquimales del ligamento periodontal
hASCs: Células mesenquimales adiposas humanas
BMSC: Células mesenquimales de medula ósea
MN2D: Medio normal 2D
MO2D: Medio osteogénico 2D
MN3D: Medio normal 3D
MO3D: Medio osteogénico 3D
HAp: Hidrogel nanocompuesto bioactivo de hidroxiapatita
CS-GP: Hidrogel termosensible de quitosano-glicerol fosfato

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El uso de biomateriales para mejorar los procesos de curación y regeneración. Estos deben estar diseñados para soportar la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Durante la diferenciación de las células troncales mesenquimales se presenta la expresión de diversos genes y moléculas no codificantes que forman parte del DNA. El gen MEG3 codifica para un RNA largo no codificante el cual ha demostrado que participa en la promoción de diferentes carcinogenesis, pero podría tener también un papel importante durante la diferenciación osteoblástica. **OBJETIVO:** Evaluar la expresión de MEG3 durante la diferenciación osteogénica de hMSCs-AD en hidrogel de matriz extracelular ósea. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se cultivo tridimensionamente hMSCs-AD sobre hidrogeles de matriz ósea en medio convencional y medio osteogénico, se aisló el RNA total de las células, se realizó la qPCR, se emplearon sondas TaqMan específicas para MEG3, ALPL, BSP, OSTX, SP7 y ACTB como gen constitutivo y se realizó la tinción con rojo de alizarina. **RESULTADOS:** MEG3 se expresa en los 3 tiempos de diferenciación de las MSC-AD, en niveles elevados. No se encontraron diferencias significativas en los valores de expresión comparado con ALPL, BSP, OSTX y ACB. **CONCLUSIONES:** En presencia del hidrogel de matriz extracelular ósea, MEG3 se expresa durante la ostediferenciación de las hMSCs-AD en mayor porcentaje en el grupo de medio convencional en comparación con las demás condiciones.

PALABRAS CLAVE: MEG3, osteodiferenciación, hMSCs-AD, hidrogel, osteoblastos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The use of biomaterials to improve healing and regeneration processes. These must be designed to support cell adhesion, proliferation, and differentiation. During the differentiation of mesenchymal stem cells, the expression of various genes and non-coding molecules that are part of the DNA occurs. The MEG3 gene encodes a long non-coding RNA which has been shown to participate in the promotion of different carcinogenesis but could also have an important role during osteoblastic differentiation. **OBJECTIVE:** To evaluate MEG3 expression during osteogenic differentiation of hMSCs-AD in bone extracellular matrix hydrogel. **MATERIALS AND METHODS:** hMSCs-AD was cultured three-dimensionally on bone matrix hydrogels in conventional medium and osteogenic medium, total RNA was isolated from the cells, qPCR was performed, TaqMan probes specific for MEG3, ALPL, BSP, OSTX, SP7 and ACB as constitutive gene and alizarin red staining was performed. **RESULTS:** MEG3 is expressed at high levels at the 3 differentiation times of AD-MSCs. No significant differences were found in expression values compared to ALPL, BSP, OSTX and ACB. **CONCLUSIONS:** In the presence of the bone extracellular matrix hydrogel, MEG3 is expressed during ostedifferentiation of hMSCs-AD in a higher percentage in the conventional medium group compared to the other conditions.

KEY WORDS: MEG3, Osteodifferentiation, hMSCs-AD, hydrogel, osteoblasts.

1 INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular ósea ha surgido como una alternativa prometedora para desarrollar sustitutos que reparen, mantengan o mejoren la función biológica de los tejidos óseos. Se basa en el uso de bioandamios para mejorar los procesos de curación y regeneración (1).

Estos bioandamios deben estar diseñados para soportar la adhesión, proliferación y diferenciación celular, además de soportar las demandas del sitio lesionado durante todo el proceso de regeneración. Podemos clasificar a los bioandamios según su origen en derivados del hospedador, sintéticos, naturales y biocerámicos (2). Los naturales pueden obtenerse a partir de proteínas como fibrina, fibroína, colágeno y matriz extracelular (MEC) o de polisacáridos como quitosano, hialuronano y alginato (3).

A partir de estas fuentes pueden presentarse diferentes presentaciones tales como nanofibras, microesferas, esponjas e hidrogeles. Los hidrogeles se encuentran entre las categorías de bioandamios para guiar el crecimiento óseo más empleados y estudiados gracias a sus ventajas potenciales de biocompatibilidad, degradabilidad controlada por células e interacción celular intrínseca (4).

Los hidrogeles basados en MEC son derivados de tejidos de MEC descelularizados y se han explorado ampliamente para la regeneración tisular *in situ* ya que proporcionan un entorno semejante al del tejido nativo, especialmente al comportamiento celular, permitiendo la diferenciación para la formación de nuevos tejidos (5). Este proceso es llevado a cabo principalmente por las células troncales mesenquimales, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos (6).

Se ha observado en diversas investigaciones, que durante la diferenciación de las células troncales mesenquimales a osteoblastos, se presenta la expresión de diversos genes y moléculas no codificantes que forman parte del DNA (7). Partes

de estas moléculas son los RNAs largos no codificantes (LncRNA) los cuales no generan proteínas tratando de asociarse su expresión con el linaje y función celular (8).

Se ha reportado que la ausencia de MEG3 disminuye la osteodiferenciación (9). Sin embargo no existe suficiente evidencia para utilizarlo como un biomarcador osteogénico por lo que nuestro objetivo es evaluar la expresión de MEG3 durante la diferenciación osteogénica en de hMSCs-AD en presencia del hidrogel de matriz extracelular ósea.

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es una variante especializada del tejido conectivo compuesta por células y una matriz extracelular (MEC). Lo que diferencia al tejido óseo de otros tipos de tejido conectivo es la mineralización de su matriz, lo que resulta en un tejido extremadamente resistente que brinda soporte y protección. Esta mineralización se logra mediante la presencia de fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita. Además de su función de soporte y protección, el tejido óseo también desempeña un papel secundario importante en la regulación homeostática de los niveles de calcio en la sangre, ya que actúa como un depósito de calcio y fosfato que puede liberarse a la sangre según sea necesario para mantener las concentraciones apropiadas en todo el organismo (10).

1.1.2 COMPONENTES CELULARES

El hueso está constituido por cuatro tipos de células distintas que mantienen una constante interacción con la matriz extracelular circundante. En primer lugar, las células osteoprogenitoras poseen la capacidad de dividirse y diferenciarse en diversos tipos celulares óseos. Estas células, a menudo denominadas células madre mesenquimales (MSCs), se convierten en osteoblastos en un entorno propicio para la formación ósea.

Los osteoblastos, por su parte, son células encargadas de la creación del tejido óseo, ya que sintetizan y liberan la matriz de colágeno y facilitan la mineralización de la matriz ósea. Una vez que la matriz secretada por los osteoblastos se calcifica, estas células quedan atrapadas en su interior. En consecuencia, experimentan una transformación morfológica y se convierten en osteocitos, que son las células principales en el hueso maduro, responsables de mantener la integridad del tejido óseo.

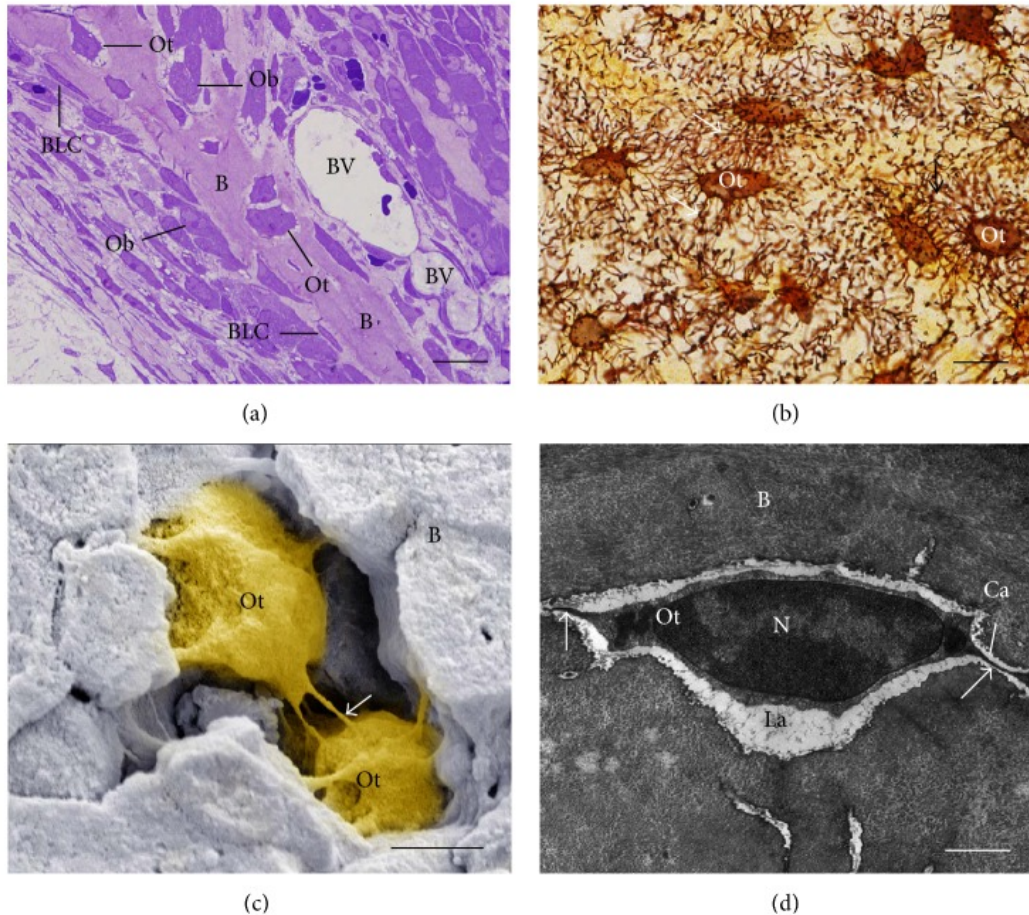


Figura 1. Micrografías electrónicas de porciones de hueso alveolar de ratas. (a) Sección semifina teñida con azul de toluidina que muestra una porción de una trabécula ósea (B). Los osteoblastos (Ob) y las células del revestimiento óseo (BLC) están presente en la superficie del hueso, mientras que los osteocitos (Ot) se observan atrapados en la matriz ósea. BV: vasos sanguíneos. Barra de escala: 15 μ m. (b) Sección sometida al método de impregnación de plata. Obsérvense los procesos citoplasmáticos (flechas) de los osteocitos (Ot) que los conectan entre sí. Barra de escala: 15 μ m. (c) Micrografía electrónica de barrido que muestra dos osteocitos (Ot) rodeados de matriz ósea (B). Nótese que los procesos citoplasmáticos (flechas) se observan entre los osteocitos (Ot) formando una red interconectada. Barra de escala: 2 μ m. (d) Micrografía electrónica de transmisión que muestra un osteocito típico (Ot) dentro de una laguna (La) en la matriz ósea (B), con sus procesos citoplasmáticos (flechas) dentro de los canaliculos (Ca). Barra de escala: 2 μ m. N: núcleo (11).

1.1.3 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

La matriz extracelular (MEC) ósea es una estructura tridimensional no celular secretada por las células al espacio extracelular, que comprende compuestos inorgánicos y orgánicos. Los principales componentes inorgánicos de la MEC son hidroxiapatita y oligoelementos deficientes en calcio, mientras que la MEC orgánica consta de colágeno tipo I y proteínas no colágenas.

La matriz extracelular mineralizada es responsable de la resistencia del hueso a la fractura. Las proteínas que componen la MEC ósea se pueden dividir en colágeno y, en menor medida, otras proteínas no colágenas (NCP). Las células formadoras de hueso (osteoblastos) secretan el compuesto principal de la matriz orgánica: colágeno tipo I, que constituye alrededor del 85-90% del contenido total de proteína ósea. El colágeno tipo I desempeña un papel estructural importante en el hueso, y también contribuye a la organización del tejido y, por lo tanto, a sus propiedades mecánicas (1).

Las proteínas no colágenas que se encuentran en la matriz extracelular son las macromoléculas de proteoglucanos como hialuronano, condroitín sulfato, y querantán sulfato, las cuales contribuyen a que el hueso ofrezca resistencia a la compresión. También son responsables de la fijación de los factores de crecimiento y puede inhibir la mineralización.

Las glucoproteínas multiadhesivas, que intervienen en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la sustancia fundamental mineralizada, osteonectina, podoplanina (E11), Proteína de la matriz de dentina (DMP) y proteínas dependientes de vitamina K osteoespecíficas como la osteocalcina. Estas participan en el ensamblaje del colágeno y la formación de enlaces cruzados afectando las propiedades mecánicas del colágeno. De esta manera, las anomalías en los enlaces cruzados del colágeno se han asociado con un mayor riesgo de fractura (1, 12).

Es por esto que la correcta síntesis y orientación de las fibras de colágeno son imprescindibles para obtener una matriz ósea sana capaz de soportar la resistencia a la tracción ósea.

Otro componente de la MEC ósea son los factores de crecimiento y citocinas que al expresarse participan como guía para que los componentes celulares propios del tejido óseo y células del sistema inmunológico puedan realizar correctamente sus funciones.

La matriz extracelular descelularizada se ha utilizado ampliamente para aplicaciones de ingeniería de tejidos y se está volviendo cada vez más versátil, ya que puede tomar muchas formas, incluidos parches, polvos e hidrogeles. Después de un procesamiento adicional, la MEC descelularizada puede formar un hidrogel inducible que se puede inyectar, lo que brinda nuevas oportunidades de procedimientos mínimamente invasivos. Los hidrogeles de MEC se han derivado de numerosas fuentes de tejido y se han aplicado para tratar muchos modelos de enfermedades, como lesiones isquémicas y regeneración o reemplazo de órganos (13).

Por último, los osteoclastos, células grandes multinucleadas originadas a partir de células progenitoras hematopoyéticas y con una diferenciación terminal, son las encargadas de la degradación del tejido óseo. Poseen una capacidad única para llevar a cabo la reabsorción ósea. Dado que el hueso es un tejido dinámico, la remodelación ósea está rigurosamente regulada por la colaboración entre los osteoblastos, que generan nuevo tejido óseo, y los osteoclastos, que lo reabsorben.

1.1.4 REGENERACIÓN ÓSEA

El tejido óseo tiene la capacidad de reparar continuamente los daños menores que se producen en situaciones cotidianas a través de un proceso llamado osteogénesis, que es la función principal de los osteoblastos. La osteogénesis

involucra una serie de etapas críticas, que incluyen la migración y división de células mesenquimales, la diferenciación de estas células en condroblastos (que forman cartílago) y, finalmente, la reemplazan del cartílago por tejido óseo. En este proceso, el nuevo tejido óseo formado conserva las características y propiedades necesarias para cumplir las funciones requeridas por el organismo (1).

Sin embargo, existen numerosas situaciones en las cuales el proceso de reparación natural no ocurre. Ejemplos de esto son fracturas de gran magnitud, malformaciones congénitas, osteonecrosis, procedimientos quirúrgicos, entre otras afecciones. Los defectos óseos de tamaño crítico resultantes de estos problemas impiden la regeneración natural del hueso y, en estos casos, se necesita apoyo adicional (14).

En la actualidad, se aplican diversas terapias para tratar lesiones óseas que no pueden repararse de manera natural. Una de estas terapias implica el uso de injertos óseos y sustitutos, que son desarrollados a través de la ingeniería de tejidos. Estos injertos y sustitutos ayudan a estimular la regeneración ósea en áreas donde la reparación natural es insuficiente.

1.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinario que fusiona los principios de la ingeniería de materiales con las ciencias biológicas. Su objetivo principal es desarrollar sustitutos que reparen, mantengan o mejoren la función biológica de los tejidos. Este enfoque se basa en una comprensión profunda de la formación y regeneración de los tejidos, y su propósito es inducir la creación de nuevos tejidos funcionales en lugar de simplemente implantar piezas de repuesto.

La ingeniería tisular se enfoca en restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos que presentan defectos o que se han perdido debido a diversas condiciones patológicas. Esto se logra mediante el desarrollo de sustitutos biológicos (15), los cuales se basan en una triada.

Esta triada esta compuesta por los siguientes elementos:

- a) Células: Son cruciales para la formación de nuevo tejido regenerativo. Estas células desempeñan un papel central en el proceso de reparación y regeneración de tejidos dañados.
- b) Factores de crecimiento: Contribuyen a la multiplicación y diferenciación de las células. Estos factores son señales bioquímicas que guían el comportamiento de las células en la regeneración tisular.
- c) Biomateriales: También se denominan andamios y sirven como soporte para las células en las etapas iniciales de la regeneración. Estos biomateriales promueven la proliferación y diferenciación celular y proporcionan la estructura necesaria para el desarrollo del nuevo tejido.

En resumen, la ingeniería tisular se basa en la integración de células, factores de crecimiento y biomateriales para desarrollar soluciones que reparen o regeneren tejidos dañados, con el objetivo de restaurar o mejorar la función biológica de los tejidos en condiciones patológicas (16).

1.2.1 FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son moléculas de señalización con la capacidad de desempeñar dos funciones esenciales en las células: pueden estimular su proliferación, actuando como mitógenos, o inducir cambios en el fenotipo de las células objetivo, funcionando como morfógenos.

En el contexto de la osteogénesis, se destacan factores de crecimiento específicos, como las proteínas morfogénicas óseas (BMP), el factor insulinoide de crecimiento beta (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (17). Estos factores son especialmente relevantes

en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo, ya que desempeñan un papel fundamental en el proceso (18).

Para promover eficazmente la regeneración tisular, es esencial contar con un dispositivo que brinde el apoyo necesario para la proliferación celular, mantenga la función diferenciada de las células y transmita las señales biológicas requeridas para preservar la expresión génica específica. Además, este dispositivo debe definir la arquitectura del tejido. Estos dispositivos se conocen como matrices tridimensionales o biomateriales (19).

1.2.2 BIOMATERIALES

Los biomateriales, también conocidos como andamios o matrices, desempeñan un papel fundamental en la ingeniería de tejidos al funcionar como estructuras artificiales. Estos andamios tienen la función de guiar el crecimiento de las células que están sembradas dentro de la estructura porosa del andamio o de las células que migran desde el tejido circundante (20).

La clave en el diseño de estos andamios radica en su capacidad para favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular, además de resistir las demandas específicas del sitio lesionado durante todo el proceso de regeneración, lo cual puede variar según la zona a regenerar y las propiedades del material utilizado (15).

1.2.2.1 HIDROGELES

Dentro del campo de la ingeniería tisular, los hidrogeles son uno de los tipos de andamios más utilizados y estudiados para guiar el crecimiento del tejido óseo. Estos hidrogeles son polímeros en red que tienen una fuerte afinidad por el agua y están típicamente compuestos por cadenas entrecruzadas. Tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y otros líquidos. Los hidrogeles pueden estar hechos de macromoléculas de origen natural, lo que les otorga ventajas como la biocompatibilidad, la degradación controlada por las células y la interacción

intrínseca con las células. Además, poseen propiedades que les permiten aumentar su tamaño en medios acuosos y responder a estímulos como cambios en el pH o la temperatura, lo que ha llevado a un interés creciente en su investigación y desarrollo en los últimos años (4).

Estos hidrogeles pueden prepararse a partir de una matriz extracelular solubilizada. Se ha demostrado que pueden administrarse mediante procedimientos mínimamente invasivos y, lo que es más importante, que pueden modificar de manera beneficiosa la respuesta predefinida a las lesiones tisulares, contribuyendo a un resultado constructivo y funcional (21).

Para la formación de estos hidrogeles, se han utilizado diversos tejidos como base, incluyendo la matriz descelularizada de la vejiga urinaria, la submucosa del intestino delgado y, más recientemente, tejido óseo bovino. Esto ha demostrado ser un enfoque prometedor para la ingeniería de tejido óseo basado en matrices extracelulares.

1.2.2.1.1 HIDROGELES DE MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA

El uso de matriz ósea desmineralizada (DBM) como sustituto de injertos óseos osteoconductores se ha estudiado en investigaciones previas, aunque con resultados variables. Estos resultados pueden variar debido a diferencias en la preparación, los métodos de procesamiento y la edad del donante, que influyen en las propiedades y el éxito clínico de la DBM (22).

Para mejorar las propiedades, se somete a un riguroso proceso de descelularización para garantizar la eliminación completa de cualquier resto de células o residuos celulares, ya que se ha comprobado que estos son perjudiciales en los procesos de remodelación tisular. Luego de la descelularización, se lleva a cabo una técnica de digestión y solubilización, para finalmente pasar por un proceso de gelificación,

dando lugar a la formación del hidrogel. Por lo tanto, el material resultante muestra diferentes propiedades estructurales, mecánicas y biológicas (23, 24).

En el ámbito de la ingeniería de tejidos, existen diversas opciones de biomateriales que desempeñan un papel crítico. Estos materiales deben proporcionar un sustrato adecuado para la unión, proliferación, diferenciación y migración celular, además de facilitar el transporte de nutrientes, desechos y factores de señalización biológica para asegurar la supervivencia celular. El andamio ideal para su aplicación en la ingeniería de tejidos óseos debe cumplir con ciertos requisitos (1,25,26).

Los mecanismos por los cuales los hidrogeles de MEC dirigen el comportamiento celular e influyen en los resultados de la remodelación solo se comprenden parcialmente, pero probablemente incluyan señales estructurales y biológicas retenidas del tejido de origen nativo (5).

El requisito principal para cualquier biomaterial es ser biocompatible, ya que entra en contacto directo con los tejidos y debe ser bien tolerado para ayudar a restaurar la función previamente perdida, Se ha demostrado ampliamente que los hidrogeles son muy adecuados para las aplicaciones biomédicas debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, excelente hidrofiliidad, permeabilidad controlable y métodos de fabricación sencillos (27).

1.3 CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (MSCs) desempeñan un papel esencial en diversas aplicaciones de ingeniería de tejidos. Estas células poseen un potencial de autorrenovación y la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos celulares. Son particularmente adecuadas para la regeneración ósea debido a su fácil disponibilidad y métodos de recolección, abundancia, capacidad de diferenciación hacia células óseas y potentes propiedades de inmunomodulación (28). La diferenciación osteogénica de las MSCs es un área de interés en la regeneración

ósea. Un tipo específico de MSC son las células madre derivadas del tejido adiposo (hMSCs-AD), que pueden recolectarse y diferenciarse con facilidad en varios tipos celulares, como condrocitos, adipocitos y osteoblastos. Debido a sus características especiales, las hMSCs-AD se utilizan con frecuencia en la regeneración ósea, tanto en entornos de laboratorio como en estudios *in vivo* (29).

La identificación de los factores involucrados en la diferenciación osteogénica de las hMSCs-AD es crucial para comprender mejor los mecanismos de este proceso. En la literatura se han utilizado diversas metodologías para estimular la osteogénesis de las hMSCs-AD, que incluyen el uso de medios osteogénicos convencionales, factores de crecimiento, hormonas, condiciones de hipoxia, estímulos mecánicos y químicos, modificación genética, así como la aplicación de nanotecnología. Estas estrategias buscan favorecer la diferenciación de las hMSCs-AD hacia el linaje osteogénico, lo que resulta fundamental en la regeneración del tejido óseo (30).

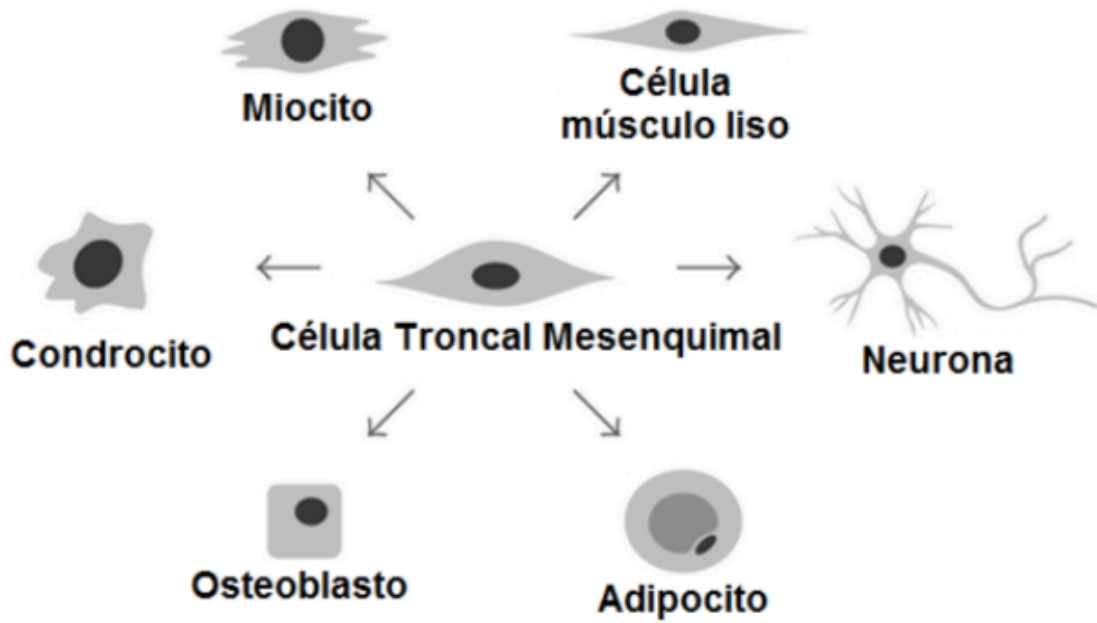


Figura 2. Diferenciación multilínea de Células Troncales Mesenquimales. Las células troncales mesenquimales presentan un potencial de diferenciación múltiple que incluye a linajes como los osteoblastos, condrocitos, miocitos y neuronas (31).

1.3.1 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

El proceso de diferenciación de las células madre en osteoblastos, las cuales son responsables de la formación y mineralización de la matriz ósea, implica varias etapas sucesivas con una capacidad de proliferación que disminuye gradualmente. Estas etapas conducen a la formación de preosteoblastos comprometidos, los cuales posteriormente se diferencian en osteoblastos maduros que desempeñan un papel fundamental en la deposición de los componentes necesarios para la construcción de la matriz ósea, seguida de su mineralización (32).

El crecimiento y la diferenciación de las células mesenquimales hacia osteoblastos en entornos *in vitro* pueden dividirse en tres etapas, cada una de las cuales se caracteriza por la expresión de marcadores específicos de osteoblastos:

- a) Proliferación: Esta primera etapa tiene una duración de aproximadamente cuatro días y se caracteriza por una proliferación de células progenitoras osteoblásticas. Durante esta fase, se inducen diversos marcadores asociados al ciclo celular.
- b) Maduración de la matriz extracelular: En la siguiente etapa, se produce la maduración de la matriz extracelular. Esto se manifiesta mediante la expresión de proteínas extracelulares, como el colágeno, y un aumento en la expresión de la fosfatasa alcalina. Este proceso es de vital importancia para permitir la mineralización de la matriz.
- c) Mineralización: La etapa final implica la mineralización de la matriz ósea. Requiere la inducción de proteínas como la osteocalcina y la osteopontina, así como la deposición de fosfato de calcio en la matriz extracelular.

La progresión de las células mesenquimales hacia osteoblastos está regulada por señales fisiológicas, que incluyen la influencia de proteínas clave en el proceso, como el factor de crecimiento beta, las proteínas morfogénicas óseas, la vitamina D

y los glucocorticoides. Estas señales desempeñan un papel fundamental en la dirección de las células hacia su diferenciación en osteoblastos y en la posterior formación y mineralización de la matriz ósea.

1.3.1.1 MARCADORES OSTEOGÉNICOS

Los marcadores osteogénicos son un conjunto de genes que desempeñan funciones clave en la diferenciación de los osteoblastos y en el proceso de mineralización de la matriz ósea (33). Estos marcadores se dividen en dos categorías: aquellos que reflejan la tasa de formación y aquellos que reflejan la tasa de resorción.

En el contexto de la formación de la matriz extracelular ósea y su posterior mineralización, la fosfatasa alcalina (ALPL) es un marcador esencial. La ALPL desempeña un papel fundamental en el proceso de mineralización de la matriz extracelular. Su expresión se utiliza para describir la progresión de la diferenciación osteogénica. Esta proteína es producida por los osteoblastos y se encuentra anclada en su superficie celular externa, actuando como una "ecto-enzima" que funciona en el espacio extracelular (34).

Otro factor clave en la diferenciación osteoblástica es el factor de transcripción Osterix (SP7), el cual regula la expresión de diversos genes osteoblastos, como OC, ON, OPN, BSP y COL1. Este factor de regulación trabaja en conjunto con otros reguladores conocidos, como PNMP4, AJ18, RUNX2 y COX2 (35).

Un factor de transcripción fundamental en la diferenciación osteoblástica, considerado como el interruptor maestro de este proceso, es el factor relacionado a Runt-2 (RUNX2/CBFA1). RUNX2 es crucial para la generación de tejido mineralizado (36, 37) y su expresión génica se analiza típicamente en las primeras etapas de la diferenciación osteogénica (34).

Se ha demostrado que la expresión del factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2) aumenta en los primeros días de la diferenciación osteoblástica debido a la convergencia de diversas vías de señalización. RUNX2 estimula la expresión de genes como OC, OPN, COL1, colagenasa 3 (MMP13), BSP, ALPL y TGF- β R1, desempeñando un papel fundamental en la regulación de la diferenciación osteogénica.

La regulación positiva de Runx2 en las MSC promueve su potencial de diferenciación en osteoblastos inmaduros, al tiempo que inhibe su compromiso de linaje con los adipocitos. Además, se ha demostrado que Runx2 es necesario para la inducción de genes importantes de la matriz ósea en osteoblastos inmaduros, mientras que son innecesarios para el mantenimiento de estos genes en los osteoblastos maduros. De hecho, un estudio reciente ha demostrado que la regulación directa entre Runx2 y Glut1 (un transportador de glucosa) facilita el inicio de la diferenciación de los osteoblastos (32).

Por otro lado la Sialoproteína Osea (BSP) se encuentra exclusivamente en tejidos mineralizados con funciones esenciales en la formación inicial de hidroxapatita (38). La BSP desempeña una gran cantidad de funciones fisiológicas, incluida la mineralización de la matriz, la inducción de la adhesión de osteoblastos y osteoclastos y la inducción de la reabsorción ósea *in vitro* (34).

1.4 RNA LARGOS NO CODIFICANTES

Los RNA largos no codificantes (LncRNA) son una clase de moléculas de RNA que se transcriben a partir del DNA, pero a diferencia de los RNAm (RNA mensajero) que codifican proteínas, los LncRNAs no codifican proteínas y, en su lugar, desempeñan diversas funciones regulatorias en la célula. Aunque en un principio se pensaba que la mayor parte del genoma humano no codificaba proteínas, se ha descubierto que una gran cantidad de este "DNA basura" en realidad produce LncRNAs con funciones biológicas importantes (39).

Se ha informado que los LncRNA participan en numerosos procesos biológicos, como la transcripción, la postranscripción y la regulación traduccional de la expresión genética. Por otro lado, estudios han demostrado que el LncRNA ANCR desempeñaba un papel vital en la regulación de la proliferación y diferenciación osteogénica de las células mesenquimales del ligamento periodontal (PDLSC) (40, 41). Además, se informó que H19, otro LncRNA importante, desempeña un papel importante en la diferenciación osteogénica de PDLSC a través de la vía de señalización wnt/ β -catenina (42). Además, recientemente se ha certificado una nueva regulación en la que los LncRNA pueden interactuar con los mRNA a través de la competencia por elementos de respuesta de miRNA compartidos. En esta circunstancia, los LncRNA funcionan como ceRNA, es decir, esponjas o antagomirs de miRNA, para afectar los niveles de expresión y las actividades de los miRNA, reprimiendo así los objetivos de miRNA y provocando un nivel adicional de regulación postranscripcional

En los últimos años se ha descubierto que el LncRNA está implicado en muchos procesos biológicos, como el mantenimiento de la homeostasis en células y tejidos (43). En el sistema inmunitario, el LncRNA regula la diferenciación, activación, proliferación, apoptosis y expresión de citocinas de los linfocitos T (44). También se ha demostrado que algunas transcripciones que se anotan como LncRNA en realidad codifican proteínas pequeñas (39, 45)

La función y la relevancia biológica de la gran mayoría de los LncRNA siguen siendo enigmáticas. Dado que ahora se sabe que los elementos reguladores de la transcripción, como los potenciadores y los promotores, inician la transcripción de forma bidireccional (8, 46), es probable que muchos LncRNA, si no la mayoría, en realidad representan RNA que se inician en potenciadores o promotores, pero no realizan funciones específicas de secuencia (46). Se ha propuesto que los LncRNA llevan a cabo diversas funciones, incluida la regulación transcripcional en cis o trans,

la organización de dominios nucleares y la regulación de proteínas o moléculas de RNA (43, 47).

1.4.1 MEG3

MEG3 es un gen impreso expresado en la madre que representa un LncRNA, se localiza cromosómicamente en 14q32.3 en humanos (9). MEG3 es expresado en niveles abundantes en muchos tejidos ya que juega un papel vital en el desarrollo y crecimiento (48). MEG3 es ampliamente reconocido como un supresor de tumores que se expresa en niveles bajos en algunos tipos de cáncer y se correlaciona con el pronóstico (49).

1.5 ANTECEDENTES

En 2017, Zhen, Li, *et al.* (50), demostró en su investigación que MEG3 estaba regulado negativamente durante la adipogénesis y aumentado durante la osteogénesis de las células mesenquimales adiposas humanas (hASCs). Mostró que la eliminación de MEG3 promovía la diferenciación adipogénica, mientras que inhibía la diferenciación osteogénica de las hASC. Mecánicamente, MEG3 puede ejecutar su función regulando miR-140-5p. Además, miR-140-5p se reguló positivamente durante la adipogénesis y disminuyó durante la osteogénesis en hASC, lo que se correlacionó negativamente con MEG3. Concluyendo que MEG3 participa en el equilibrio de la diferenciación adipogénica y osteogénica de las hASC, y el mecanismo puede ser mediante la regulación de miR-140-5p (50).

Por otro lado en el estudio de Yiu Li, *et al.* 2019 (51) se encontró que el lncRNA MEG3 esponjaba miR-27a-3p para aumentar la regulación de IGF1 y dar como resultado la activación de la vía de señalización PI3K/Akt. En conjunto, el eje lncRNA MEG3/miR-27a-3p/IGF1 juega un papel en la diferenciación de la osteogénesis de PDLSC mediante la activación de la vía de señalización PI3K/Akt.

Además, se ha resaltado que el lncRNA MEG3 es un inhibidor de la periodontitis debido al nuevo mecanismo subyacente al eje lncRNA MEG3/miR-27a-3p/IGF1 a través de la vía de señalización PI3K/Akt al promover la diferenciación osteogénica en células mesenquimales de ligamento periodontal PDLSC. Además, el resultado mostró que el eje lncRNA MEG3/miR-27a-3p/IGF1 jugó un papel importante en la comprensión de la patogénesis de la periodontitis para un mejor pronóstico (44).

Wenzhuo Zhuang, *et al.* en 2015 (9), confirma en su estudio que la eliminación de MEG3 redujo significativamente la expresión de marcadores osteogénicos clave, incluido Runx2, Osterix y osteocalcina, mientras que la sobreexpresión de MEG3 mejoró su expresión. Además, encontró que la eliminación de MEG3 disminuyó la transcripción de BMP4, demostrando así que MEG3 es fundamental para la represión transcripcional SOX2 de BMP4.

En 2018 Chen *et al.* concluyeron en su investigación, que la inhibición de DEPTOR aumentó notablemente la expresión de MEG3, y mencionan que una investigación adicional indicó que DEPTOR podría unirse directamente a una región del promotor MEG3 para regular su transcripción. Además, la inhibición de MEG3 redujo la mejora de la diferenciación osteogénica provocada por la eliminación de DEPTOR, lo que sugiere que DEPTOR regulaba la osteogénesis de BMSC a través de MEG3 (7).

Wang Qiujun, *et al.*, en 2017 (52), reportaron que obtuvieron como resultado de su investigación que MEG3 se expresaba altamente en células mesenquimales de medula ósea (BMSC) de osteoporosis postmenopausica (PMOP); encontraron también que la mayor expresión de MEG3 reguló negativamente SLC39A1 mediante la elevación de la expresión de miR-133a-3p y, por lo tanto, inhibió la diferenciación osteogénica de BMSC, lo que condujo a PMOP.

1.6 JUSTIFICACIÓN

Durante los procesos quirúrgicos odontológicos amplios tales como la cirugía periapical, se ha buscado utilizar andamios que faciliten la regeneración ósea a través de diferentes materiales. Los andamios de hidrogel de matriz extracelular ósea bovina cuentan con las características necesarias para inducir a la formación de tejido óseo y son biocompatibles. Diversos autores han reportado la presencia de genes específicos que aceleran y participan en este proceso, como es el caso de MEG3. Es por eso que la presente investigación pretende encontrar la relación en la osteodiferenciación de AD-MSK en un andamio de hidrogel de matriz extracelular ósea con la presencia del LncRNA MEG3.

1.7 HIPÓTESIS

El LncRNA MEG3 se expresará durante la osteodiferenciación de ADS-MSC en presencia de un hidrogel de MEC ósea.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de MEG3 durante la diferenciación osteogénica de hMSCs-AD en hidrogel de matriz extracelular ósea.

1.8.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Inducir la diferenciación osteogénica de hMSCs-AD cultivadas de hidrogel de matriz extracelular.
- Determinar la expresión de genes involucrados en el proceso de diferenciación osteogénica como MEG3, ALPL, BSP, RUNX2 y OSX.

2 METODOLOGÍA

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio experimental, transversal y prospectivo.

2.2 LUGAR DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Laboratorio de microbiología e inmunología de la facultad de química de la Universidad Autónoma De Sinaloa.

2.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se trabajó con un cultivo de hMSCs-AD (células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo).

2.4 DISEÑO METODOLÓGICO

2.4.1 CULTIVO CELULAR

Las hMSCs-AD se obtuvieron de ATCC (Cat # PCS-500-011, ATCC). Las células se encontraban almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El proceso consistió en descongelar hMSCs-AD utilizando un baño maría a 37°C. Posteriormente, se sembraron en cajas de 25 cm² que contenían medio de cultivo DMEM enriquecido con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de penicilina y estreptomicina.

Para lograr la expansión celular, se incubaron a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO₂ y un 95% de humedad hasta que el cultivo alcanzara un 70% de confluencia. En este punto, las células se desprendieron del recipiente de cultivo mediante el uso de una solución químico-enzimática que contenía tripsina-EDTA al 0.25%. La viabilidad y la concentración celular se evaluaron mediante la

tinción de vitalidad con azul de tripano (0.4%) y la utilización de una cámara de Neubauer.

2.4.2 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

Se cultivaron tridimensionamente 5×10^4 hMSCs-AD sobre hidrogeles de matriz ósea bovina en medio osteogénico (DMEM, FBS 10%, 50 $\mu\text{g/ml}$ ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato, 10 nM de dexametasona) y medio convencional durante 7 días. Después de ese tiempo, las células fueron cosechadas para realizar extracción de RNA. Como control positivo las células se cultivaron en medio osteogénico. Como control negativo se cultivaron las células en medio convencional.

2.4.3 TINCIÓN DE CRISTALES DE CALCIO CON ROJO DE ALIZARINA

Para la confirmación del fenotipo osteoblástico se procedió a realizar la tinción de los cristales de calcio para visualizar la deposición mineral con rojo de alizarina (Rojo de alizarina 2% a $\text{pH}=4.1-4.3$) a los 10 días post-inducción osteoblástica, para lo cual las células fueron lavadas con PBS 1X, posteriormente se agregó 1 mL de colorante a cada pozo a teñir incubando 15 min a 25°C , transcurrido el tiempo se retiró el colorante y se lavó con PBS 1X. Las tinciones fueron visualizadas en un microscopio óptico con los objetivos de 10X.

2.5 EXTRACCIÓN DE RNA

Para la obtención de RNA total se empleó la metodología de TRIzol. Las células a los 7 días post-inducción osteogénica se lisaron en 1 mL de TRIzol (Invitrogen) y después se añadieron 0.3 mL de cloroformo mezclando por inversión durante 15 s, seguido de esto se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para posteriormente someter a centrifugación la muestra a 12,000 g por 15 min a 4°C .

La fase acuosa superior se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se le añadieron 200 μL de isopropanol para precipitar el RNA incubando en hielo durante 15 min. Luego, se centrifugó a 12,000 g durante 15 min a 4°C . Se desechó el sobrenadante y la pastilla

se lavó con etanol absoluto frío. Seguido de eso se centrifugó a 12,000 g durante 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar durante un lapso de 5 min a temperatura ambiente. El RNA finalmente fue resuspendido en un volumen de 22 µL de agua libre de nucleasas, incubando durante 5 min a 45°C en baño María.

2.5.1 CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL

La concentración y la pureza de RNA se determinó en un Nanodrop One (Thermo Scientific) y se verificó su integridad en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con Gel-Red, mediante una electroforesis a 50 V durante 50 minutos.

2.5.2 RT-QPCR

La transcripción inversa para la síntesis del cDNA se realizó en el (termociclador T100 BioRad) con un templado de 20 µL (2,000ng/ µL de RNA) usando el kit High Capacity y siguiendo las especificaciones del fabricante. Se programará a tres temperaturas a 25°C por 10 minutos; 37°C por 2:00 horas; seguido de un paso de 85°C por 5 minutos y un paso final a 4°C. Una vez obtenido el cDNA, se realizará la qPCR se emplearán sondas TaqMan específicas para MEG3, ALPL, BSP, OSTX y Actina Beta como gen constitutivo. El nivel de expresión relativa se calculó de la siguiente manera:

Expresión relativa = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde:

$$\Delta Ct = Ct (\text{Gen problema}) - Ct (\text{Gen constitutivo}).$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra control}) - \Delta Ct (\text{muestra problema}).$$

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se representarán como promedios \pm desviación estándar. Se utilizó ANOVA para comparar las diferencias entre los grupos. La prueba de Tukey para la comparación de los promedios. Un valor de $p < 0.05$ será considerado como estadísticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 EVALUACION MORFOLÓGICA

Se tomaron imágenes representativas de hMSCs-AD en contacto con hidrogeles y DMEM, usando un microscopio óptico y con objetivo de 10x durante los distintos tiempos de evaluación que fueron día 0, día 4, día 7 y día 10, para posteriormente evaluar y comparar la morfología. Se puede observar en el día 0, en contacto con hidrogel (Figura 3C,D), una morfología alargada de tipo fibroblastoide, con prolongaciones de forma estrellada, con uniones intercelulares, este mismo patrón se observa en el caso de las hMSCs-AD sin hidrogel (Figura 3A, B).

En el día 4, en el grupo de medio osteogénico sin hidrogel se pueden observar las hMSCs-AD de forma alargada de tipo fibroblastoide con una organización de forma agrupada, en empalizada, con formación de cumulos celulares (Figura 3F). En el caso del grupo de hidrogel con medio osteogénico se observan hMSCs-AD con prolongaciones de forma estrellada, sin presentar una organización o disposición predilecta, con menor confluencia y crecimiento (Figura 3H) en comparación con el grupo control, se puede ver más espacios intercelulares entre las hMSCs-AD.

Al día 6, encontramos en el grupo control, la aparición de estructuras de forma circular y con tonalidad oscura, las cuales podemos adjudicar como posibles cristales de calcio, también se observan las células hMSCs-AD de forma alargada de tipo fibroblastoide con una gran confluencia. Por otro lado, en el grupo de hidrogel con medio osteogénico se observan las células con prolongaciones y de forma estrellada, con uniones intracelulares (Figura 3J). El grupo de control negativo mantiene a las hMSCs-AD de forma alargada de tipo fibroblastoide y organizadas en empalizada (Figura 3I).

En el día 7 se observa en el grupo de hidrogel con medio osteogénico las hMSCs-AD de forma alargada y tipo fibroblastoide, con espacios intercelulares (Figura 3P). No se observan estructuras de tonalidad oscura en comparación al control positivo,

donde se presentan multiples estructuras amorfas de color oscuro, asi como disminucion en la confluencia celular (Figura 3N).

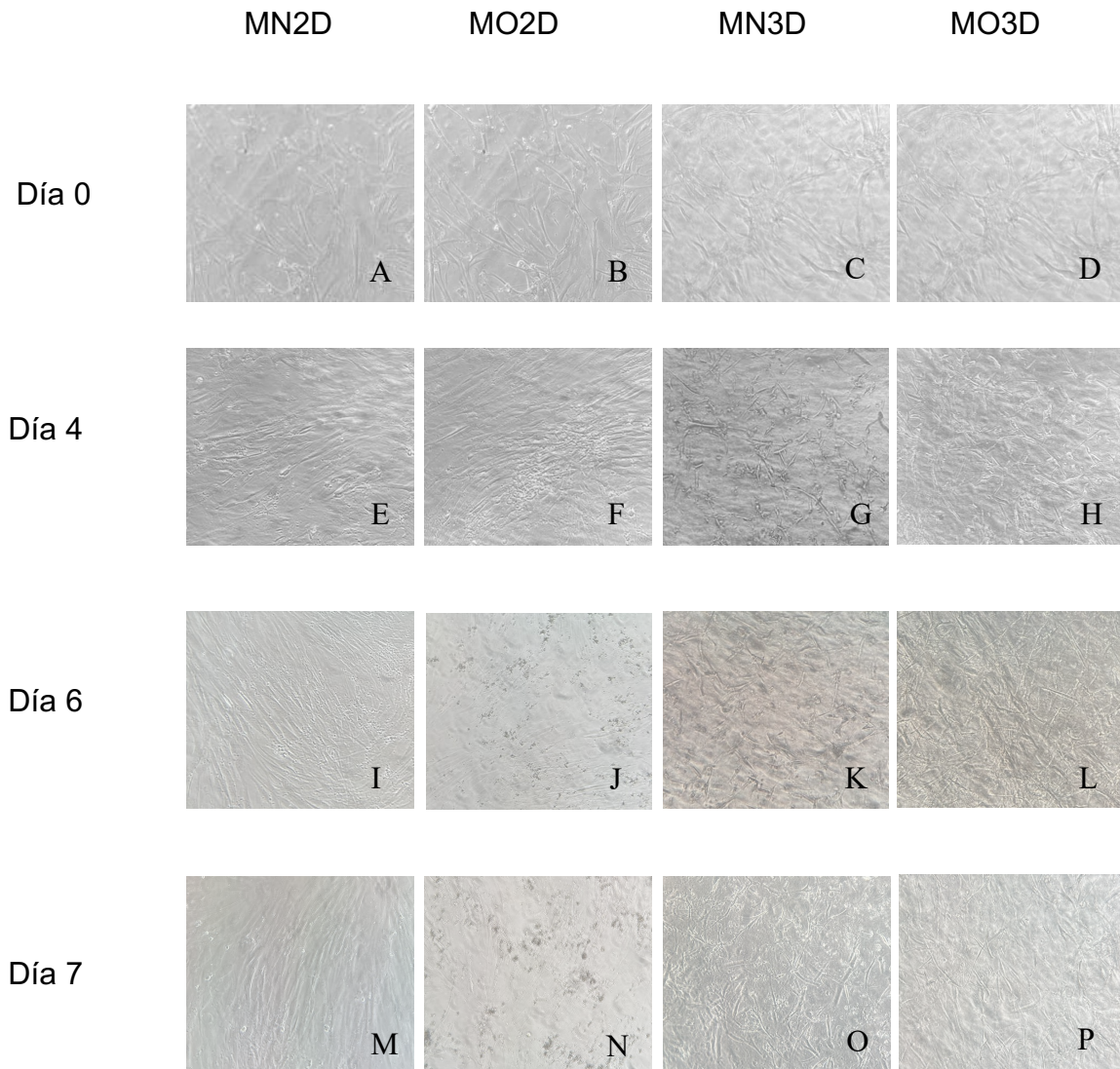


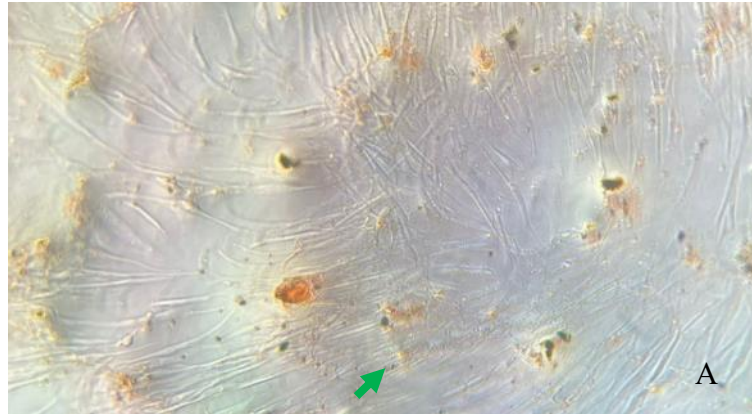
Figura 3. Imágenes representativas tomadas a 10x de hMSCs-AD sobre cultivo 2D y 3D en medio convencional y osteogénico. Se muestran las células hMSCs-AD sin estímulo y medio convencional (A), con medio osteogénico y medio convencional (B), sin estímulo con hidrogel (C) y medio osteogénico con hidrogel (D) en el día 0 de cultivo. De igual manera se muestran las hMSCs-AD sin estímulo y medio convencional (E), con medio osteogénico y medio convencional (F), sin estímulo con hidrogel (G) y medio osteogénico con hidrogel (H) en el día 4 de cultivo. Por otro lado en el día 6 se muestran sin estímulo y medio convencional (I), con medio osteogénico y medio convencional (J), sin estímulo con hidrogel (K) y medio osteogénico con hidrogel (L) Finalmente se pueden analizar las células hMSCs-AD sin estímulo y medio convencional (M), con medio osteogénico y medio convencional (N), sin estímulo con hidrogel (O) y medio osteogénico con hidrogel (P) en el día 7 de cultivo.

3.2 TINCIÓN CON ROJO DE ALIZARINA

Todos los grupos fueron teñidos el día 10 de cultivo, observándose que en el grupo del control negativo hay células alargadas y delgadas de tipo fibroblastoide, así como cúmulos celulares en apoptosis. Además, se observa la ausencia del color rojo, lo cual es indicativo de la falta de los cristales de calcio (Figura 4A). Por otro lado, en el grupo del control positivo se observa una gran cantidad de cristales de calcio teñidos de color rojo en toda la muestra, indicando que el medio osteogénico está promoviendo la diferenciación osteoblástica de las células hMSCs-AD (Figura 5A).

En el grupo de las células hMSCs-AD en contacto con hidrogel cultivadas en medio convencional, al momento de realizar la tinción con rojo de alizarina, se puede detectar una mediana presencia de estos (Figura 4B), sin embargo, al comparar contra el grupo de las células hMSCs-AD en contacto con hidrogel cultivadas en medio osteogénico, estas presentaron una mayor cantidad de cristales de calcio, lo cual es significativo de que tanto el medio como el hidrogel se encuentran promoviendo la diferenciación osteoblástica (Figura 5B).

MN2D



MN3D

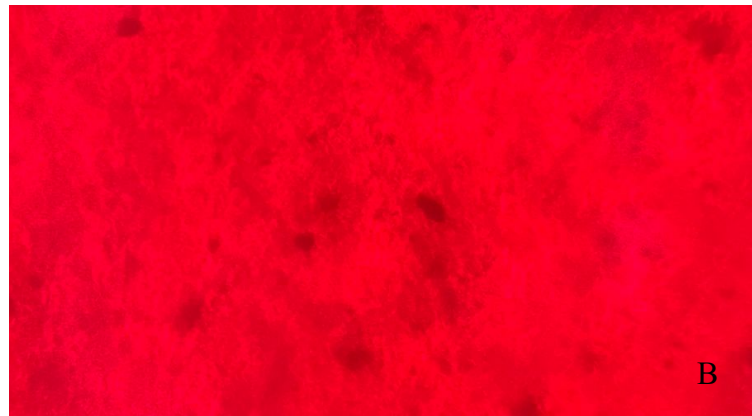
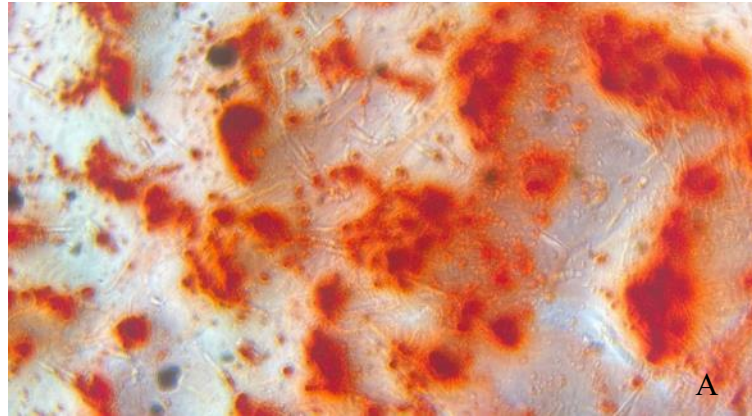


Figura 4. Comparación de tinción con rojo de alizarina entre el cultivo de células hMSCs-AD en medio convencional en 2D y 3D al día 10 de cultivo. Se encuentran señalados con una flecha verde los cristales de calcio, pigmentados de color rojo oscuro.

MO2D



MO3D

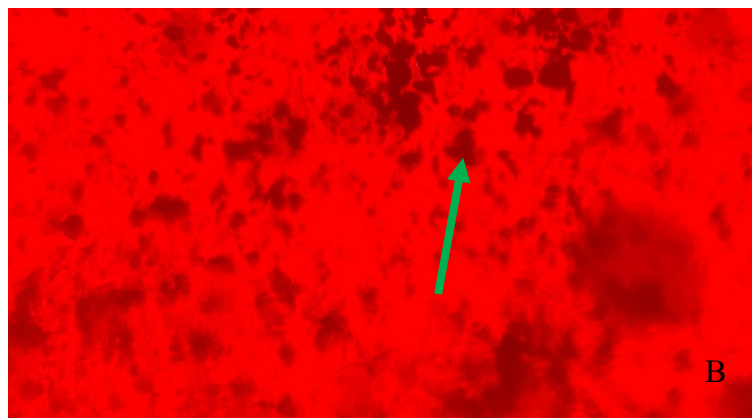


Figura 5. Comparación de tinción con rojo de alizarina entre el cultivo células hMSCs-AD en medio osteogénico en condiciones 2D y 3D al día 10 de cultivo. Se encuentran señalados con una flecha verde los cristales de calcio, pigmentados de color rojo oscuro.

3.3 EXPRESIÓN GÉNICA

3.3.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE MEG3

Para determinar la presencia del LncRNA MEG3 y su asociación con la diferenciación osteoblástica promovida por el medio osteogénico así como el hidrogel, este fue cuantificado en las diferentes condiciones anteriormente mencionadas a los 10 días de cultivo, haciendo comparaciones contra las células hMSCs-AD al día 0, tomando como gen constitutivo a la ACTB (Figura 6). Los resultados de niveles de expresión relativa de MEG3 mostraron que en medio convencional en cultivo 3D se obtuvo un $FC=1.28\pm 0.04$, dicho aumento fue estadísticamente significativo en comparación al medio convencional en cultivo 2D al día 0 ($p=0.0019$). Por otro lado la expresión de MEG3 en medio osteogénico en cultivo 3D en hidrogel al día 10 se obtuvo un $FC=0.44\pm 0.08$, dicha disminución de la expresión fue estadísticamente significativa en comparación al medio convencional en cultivo 2D al tiempo 0 ($p=0.0019$). Además, se determinó que MEG3 se expresa 0.26 ± 0.07 en medio osteogénico, estando en una menor proporción en comparación al grupo de 2D con medio convencional al día 0 ($p=0.0006$). Y en el cultivo 2D con medio convencional al día 10 se obtuvo un $FC=0.33\pm 0.05$, dicho valor fue estadísticamente significativo ($p=0.0004$), observándose una disminución de la expresión de este conforme transcurre el tiempo. Concluyendo que este LncRNA se encuentra en mayor presencia en grupo de medio convencional en presencia del hidrogel a comparación de las demás condiciones, donde se muestra una tendencia a la baja expresión de MEG3.

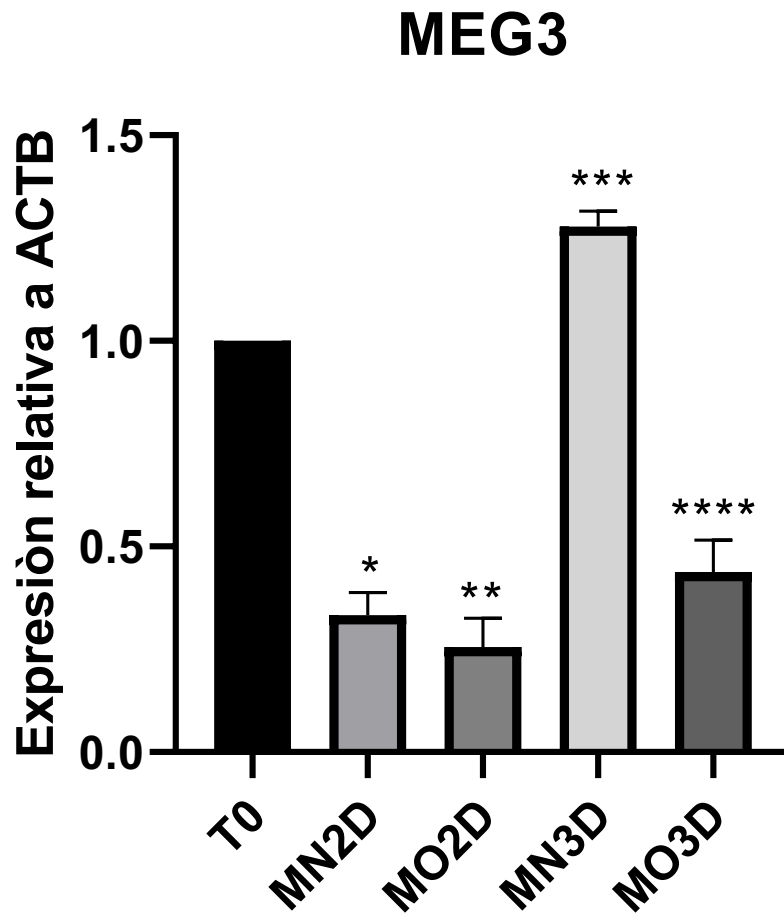


Figura 6. Expresión génica de MEG3. Se compara el cultivo de hMSCs-AD en condiciones 2D y 3D, en medio convencional y osteogénico.

3.3.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE RUNX2

Al analizar la expresión del gen RUNX2 con la diferenciación osteoblástica estimulada por el medio osteogénico así como el hidrogel, este fue cuantificado en las diferentes condiciones anteriormente mencionadas a los 10 días de cultivo, haciendo comparaciones contra las células hMSC-ADs al día 0, tomando como gen constitutivo a la ACTB (Figura 7). Los resultados de niveles de expresión relativa de RUNX2 mostraron que en medio convencional en cultivo 3D se obtuvo un $FC=0.43\pm 0.04$, dicho aumento fue estadísticamente significativo en comparación al medio convencional en cultivo 2D al día 0 ($p=0.0003$). Por otro lado la expresión de RUNX2 en medio osteogénico en cultivo 3D en hidrogel al día 10 se obtuvo un $FC=0.31\pm 0.05$, dicha disminución de la expresión fue estadísticamente significativa en comparación al medio convencional en cultivo 2D al tiempo 0 ($p=0.0002$). Además, se determinó que RUNX2 se expresa $FC=0.15\pm 0.02$ en medio osteogénico, estando en una menor proporción en comparación al grupo de 2D con medio convencional al día 0 ($p<0.0001$). Y en el cultivo 2D con medio convencional al día 10 se obtuvo un $FC=0.24\pm 0.07$, dicho valor fue estadísticamente significativo ($p=0.0005$), observándose una disminución de la expresión de este conforme transcurre el tiempo. Concluyendo que este gen se encuentra en mayor presencia en el tiempo 0 en el grupo de medio convencional comparado con las demás condiciones, donde se muestra una tendencia a la baja expresión de RUNX2. No obstante en fue en el grupo de cultivo de hMSCs-AD en medio convencional en condiciones 3D donde presento la mayor expresión relativa de los 4 grupos comparados.

RUNX2

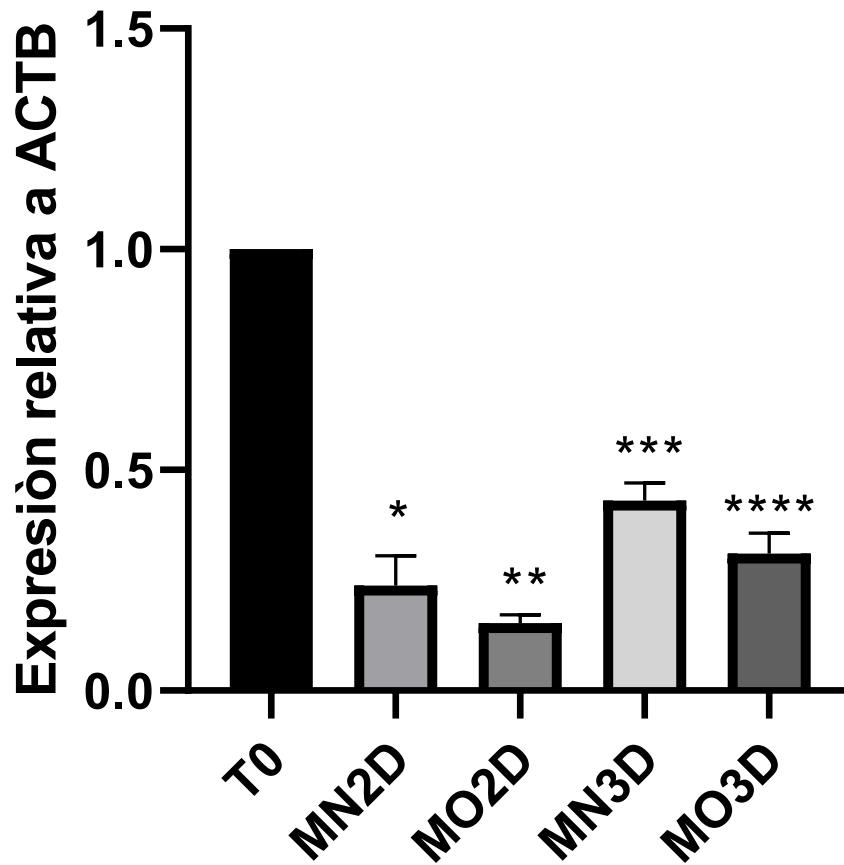


Figura 7. Expresión génica de RUNX2. Se compara el cultivo de hMSCs-AD en condiciones 2D y 3D, en medio convencional y osteogénico.

3.3.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE SP7

El gen Osterix fue cuantificado en las diferentes condiciones anteriormente mencionadas a los 10 días de cultivo, haciendo comparaciones contra las células hMSCs-AD al día 0, tomando como gen constitutivo a la ACTB para determinar la presencia del microRNA SP7 y su asociación con la diferenciación osteoblástica promovida por el medio osteogénico así como el hidrogel. (Figura 8). Los resultados de niveles de expresión relativa de SP7 mostraron que en medio convencional en cultivo 3D se obtuvo un $FC=0.31\pm 0.01$, dicha disminución fue estadísticamente significativa en comparación al medio convencional en cultivo 2D al día 0 ($p<0.0001$). De la misma manera la expresión de SP7 en medio osteogénico en cultivo 3D en hidrogel al día 10 disminuyó, se obtuvo un $FC=0.27\pm 0.06$, esta expresión fue estadísticamente significativa en comparación al medio convencional en cultivo 2D al tiempo 0 ($p=0.0005$). Por otro lado, la expresión de SP7 se encontró aumentada con un $FC=1.44\pm 0.42$ en medio osteogénico, estando en una mayor proporción en comparación al grupo de 2D con medio convencional al día 0 ($p=0.0006$). Y en el cultivo 2D con medio convencional al día 10 SP7 se expresó 2.27 ± 0.88 veces más, comparado con el mismo cultivo al día 0, dicho valor fue estadísticamente significativo ($p=0.1516$). Fue entonces en el grupo de cultivo de hMSCs-AD en medio convencional a los 10 días, donde el gen se encontró con mayor presencia a comparación de las demás condiciones. En ambos grupos de cultivo de hMSCs-AD en contacto con hidrogel, la expresión de SP7 se muestra con una tendencia a la baja.

SP7

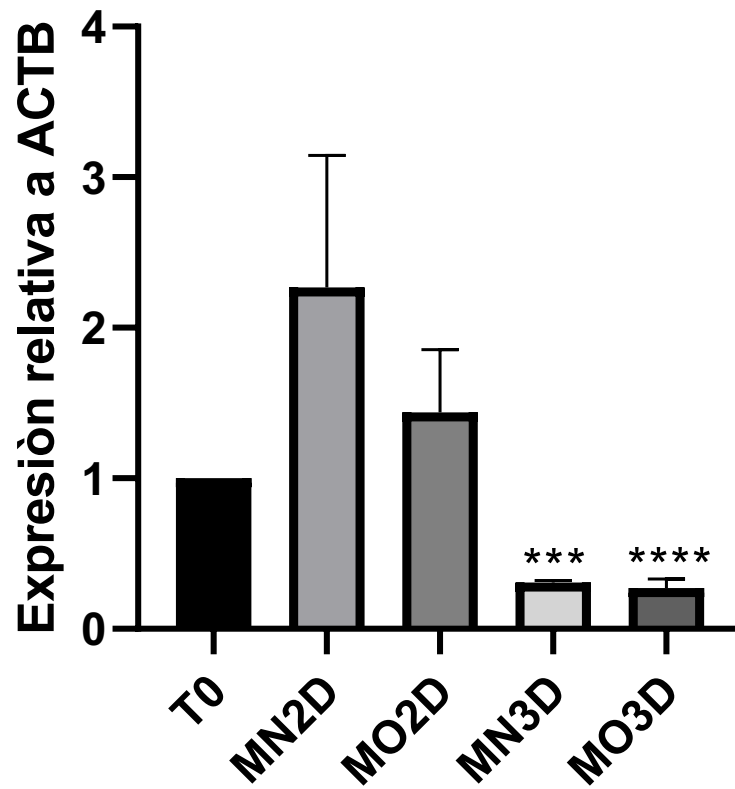


Figura 8. Expresión génica de SP7. Se compara el cultivo de hMSCs-AD en condiciones 2D y 3D, en medio convencional y osteogénico.

3.3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE ALPL

Para establecer la presencia del gen ALPL y su relación con la diferenciación osteoblástica promovida por el medio osteogénico así como el hidrogel, este fue cuantificado en las diferentes condiciones anteriormente mencionadas a los 10 días de cultivo, haciendo comparaciones contra las células hMSCs-AD al día 0, tomando como gen constitutivo a la ACTB (Figura 9). Los resultados de niveles de expresión relativa de ALPL mostraron que en medio convencional en cultivo 3D se obtuvo un $FC=0.63\pm 0.05$, disminuyendo al ser comparado con la expresión de ALPL en medio convencional en cultivo 2D al día 0 ($p=0.0015$). Por otro lado la expresión de ALPL en medio osteogénico en cultivo 3D en hidrogel al día 10 se obtuvo un $FC=0.16\pm 0.03$, disminución estadísticamente significativa en comparación al medio convencional en cultivo 2D al tiempo 0 ($p < 0.0001$). Por otro lado, se determinó que ALPL se expresa $FC=0.38\pm 0.17$ en medio osteogénico, estando en una menor proporción en comparación al grupo de 2D con medio convencional al día 0 ($p=0.0129$). Y en el cultivo 2D con medio convencional al día 10 se obtuvo un $FC=0.59\pm 0.17$, dicho valor fue estadísticamente significativo ($p=0.04$), observándose una disminución de la expresión de este conforme transcurre el tiempo. Concluyendo que la expresión de ALPL disminuye en todos los grupos analizados, comparados con el grupo de cultivo de hMSCs-AD en medio convencional al día 0.

ALPL

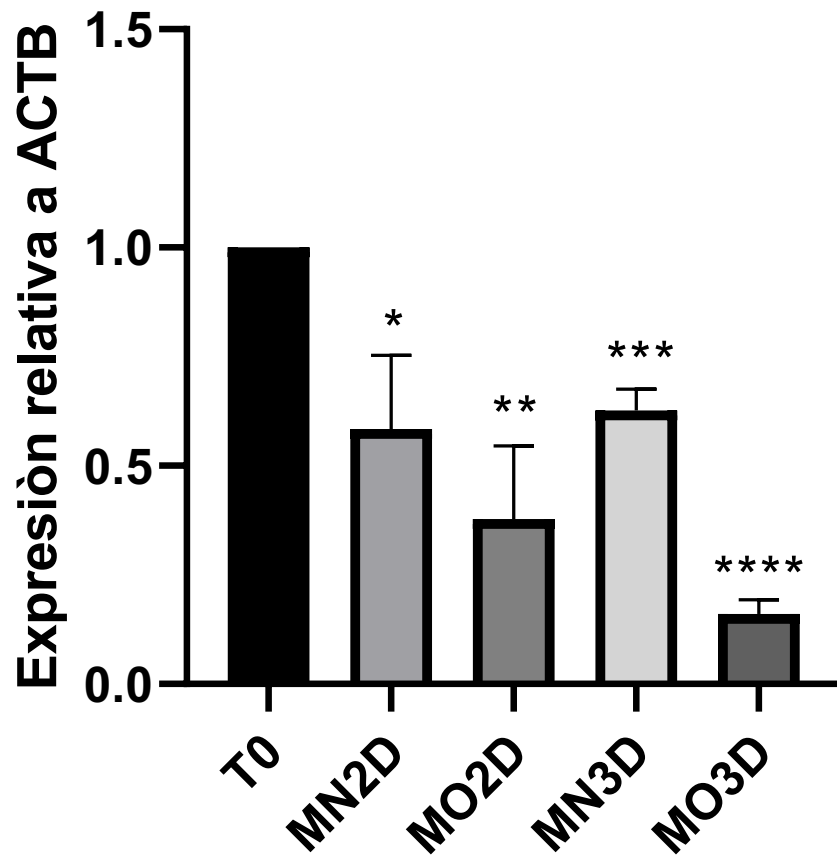


Figura 9. Expresión génica de ALPL. Se compara el cultivo de hMSCs-AD en condiciones 2D y 3D, en medio convencional y osteogénico.

3.3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE BSP

Para encontrar la expresión relativa de la sialoproteína osea en relación con la diferenciación osteoblástica estimulada por el medio osteogénico así como el hidrogel, este fue cuantificado en las diferentes condiciones anteriormente mencionadas a los 10 días de cultivo, haciendo comparaciones contra las células hMSC-ADs al día 0, tomando como gen constitutivo a la ACTB (Figura 10). Los resultados de niveles de expresión relativa de BSP mostraron que en medio convencional en cultivo 3D se obtuvo un $FC=0.01\pm 0.01$, resultado que es estadísticamente significativo en comparación al medio convencional en cultivo 2D al día 0 ($p < 0.0001$). De la misma forma la expresión de BSP en medio osteogénico en cultivo 3D en hidrogel al día 10 se obtuvo un $FC=0.01\pm 0.01$, expresión que fue estadísticamente significativa en comparación al medio convencional en cultivo 2D al tiempo 0 ($p < 0.0001$). No obstante, se determinó que BSP se expresa 1.13 ± 0.40 veces más en medio osteogénico, estando en una mayor proporción en comparación al grupo de 2D con medio convencional al día 0 ($p = 0.9158$), sin presentar diferencias significativas. Por otro lado en el cultivo 2D con medio convencional la expresión de hMSCs-AD al día 10 disminuyó un 0.28 ± 0.11 , dicho valor fue estadísticamente significativo ($p = 0.0024$), observándose una disminución de la expresión de este conforme transcurre el tiempo. Concluyendo que este microRNA se encuentra en mayor presencia en el grupo de cultivo de hMSCs-AD en medio osteogénico comparado con las demás condiciones, donde se muestra una tendencia a la baja.

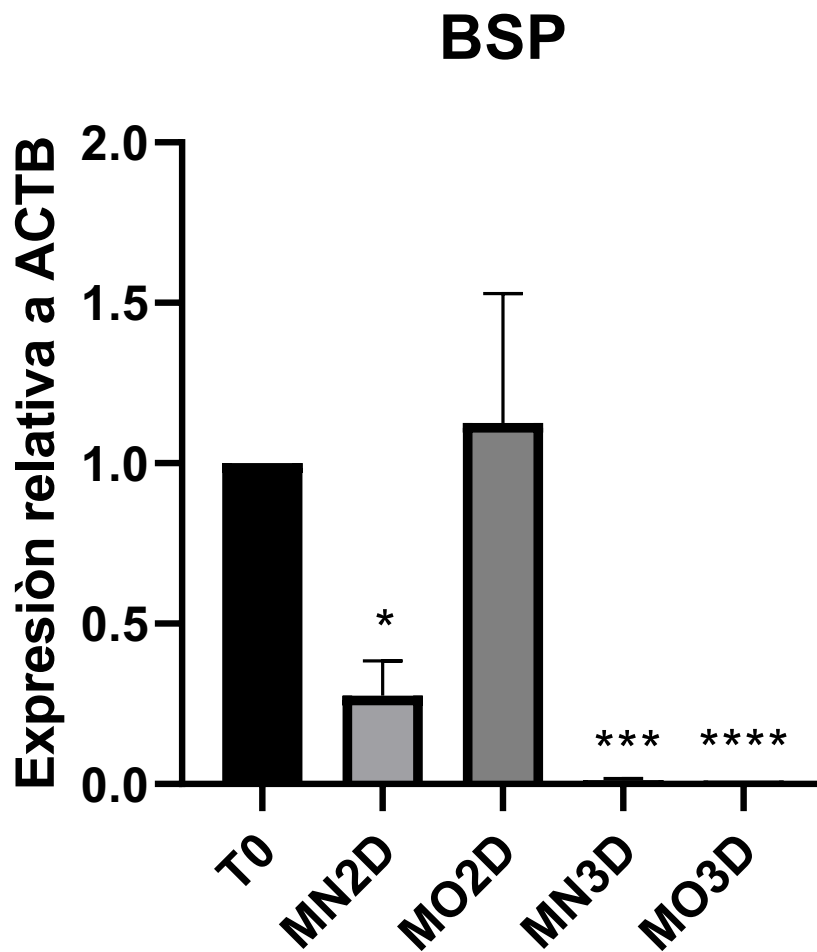


Figura 10. Expresión génica de BSP. Se compara el cultivo de hMSCs-AD en condiciones 2D y 3D, en medio convencional y osteogénico.

4 DISCUSIÓN

En un estudio realizado *in vitro* para analizar la promoción osteogénica por parte del hidrogel nanocompuesto bioactivo de hidroxiapatita (HAp) sustituida con estroncio (Sr) y/o hierro (Fe) cargados con ciprofloxacino y dexametasona precipitados en colágeno, se observó una bioactividad mejorada cuando se empleó la línea celular osteoblástica MC3T3-E1, con alta liberación de fosfatasa alcalina, y depósito de calcio inorgánico similar al hueso, así como una mayor expresión génica de marcadores de diferenciación relacionados con la osteogénesis, incluidos Osteopontina, Osteocalcina y RUNX2, esto concuerda con nuestros resultados donde obtuvimos alta expresión de RUNX2 en el cultivo de hMSCs-AD en hidrogel con medio convencional (53).

Recientemente, Nabil en 2022 desarrolló un Hidrogel termosensible de quitosano-glicerol fosfato (CS-GP) y evaluó diversos marcadores osteogénicos para observar la regeneración ósea, demostrando la elevación significativa de la actividad de ALPL en presencia de dicho hidrogel en la línea celular Saos-2. Sus resultados coinciden con los nuestros donde se observó una mayor expresión relativa de las hMSCs-AD en presencia de un hidrogel para la evaluación de la diferenciación osteoblástica (54).

Schoonraad en 2023 evaluó un Hidrogel recombinante de proteína morfogénica ósea-2 humana en células madre mesenquimales humanas encapsuladas, y se encontró que la expresión de osterix, osteopontina, la sialoproteína ósea y la proteína I de la matriz dentinaria, marcadores de osteoblastos maduros, aumentaron con concentraciones crecientes de dicho hidrogel. Estos resultados difieren con los obtenidos en el presente estudio, donde la expresión relativa de BSP y SP7 se mostró a la baja en presencia de hidrogel (55).

Jianchao, *et. al.*, diseñaron y fabricaron un hidrogel multifuncional a base de alginato que contiene cannabidiol (CBD), hidrogel SA@Cu/CBD, para reparar defectos óseos. Los resultados de la PCR indicaron los niveles de expresión de RNAm de

marcadores osteogénicos (genes ALPL, Col1 α 1, OCN y RUNX2) en el hidrogel SA@Cu/CBD se regularon significativamente en comparación con el grupo de control. Además el ensayo de actividad de ALPL mostró que el nivel de expresión de ALPL de las células MC3T3-E1 en el hidrogel SA@Cu/CBD fue aproximadamente 2 veces mayor que el del grupo de control en los días 7 y 14. Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente estudio, donde la ALPL disminuyó su expresión en todos los grupos al día 10 (56).

En el estudio de Mohiuddin *et al.* en 2019, se evaluó mediante qRT-PCR y tinción de von Kossa la diferenciación osteogénica de células madre/estromales derivadas del tejido adiposo (ASC) en cultivos de hidrogel de tejido adiposo descelularizado. Como resultados menciona que encontró que las muestras de diferenciación a los 14 días mostraron una regulación positiva significativa de COL1A1 y RUNX2, Por otro lado la ALPL no tuvo una regulación positiva significativa esto concuerda con la expresión de RUNX2 que se reporta en el presente estudio en las hMSCs-AD cultivadas en hidrogel de matriz extracelular ósea bovina (57).

Teti *et al.* en 2015, estudiaron la diferenciación osteogénica de células madre de pulpa dental humana cultivadas en un hidrogel de carboximetilcelulosa. Encontrando que RUNX2 aumentó su expresión justo después de 7 días de cultivo, transcripción de ALPL y SPARC también fue significativamente mayor después de 14 y 21 días de diferenciación. Esto concuerda con nuestros resultados donde obtuvimos alta expresión de RUNX2 en el cultivo de hMSCs-AD en hidrogel con medio convencional (58).

5 CONCLUSIONES

- Las células hMSCs-AD en contacto con hidrogel cultivadas en medio osteogénico presentan una mayor cantidad de cristales de calcio y se encuentran promoviendo la diferenciación osteoblástica.
- MEG3 se expresó en presencia del hidrogel de matriz extracelular ósea bovina.
- RUNX2 se encontró en mayor presencia al día 0 en el grupo de medio convencional comparado con las demás condiciones, observándose una tendencia a la baja expresión de RUNX2. No obstante en fue en el grupo de cultivo de hMSCs-AD en medio convencional en condiciones 3D donde presentó la mayor expresión relativa de los 4 grupos comparados.
- En ambos grupos de cultivo de hMSCs-AD en contacto con hidrogel, la expresión de SP7 mostró una tendencia a la baja.
- La expresión de ALPL disminuyó en todos los grupos analizados, comparados con el grupo de cultivo de hMSCs-AD en medio convencional al día 0.
- BSP se encontró en mayor presencia en el grupo de cultivo de hMSCs-AD en medio osteogénico comparado con el resto de las condiciones empleadas, las cuales mostraron una tendencia a la baja.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcorta-Sevillano N, Macías I, Infante A, Rodríguez CI. Deciphering the Relevance of Bone ECM Signaling. *Cells*. 2020 Dec;9(12).
2. Raddall G, Mello I, Leung BM. Biomaterials and Scaffold Design Strategies for Regenerative Endodontic Therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7(November):1–13.
3. Xu W, Klumbys E, Ang EL, Zhao H. Emerging molecular biology tools and strategies for engineering natural product biosynthesis. *Metab Eng Commun* [Internet]. 2020;10(September 2019):e00108. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00108>
4. Mahinroosta M, Jomeh Farsangi Z, Allahverdi A, Shakoobi Z. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Mater Today Chem* [Internet]. 2018;8:42–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.004>
5. Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater*. 2017 Feb;49:1–15.
6. Yan J, Yang L, Wang G, Xiao Y, Zhang B, Qi N. Biocompatibility evaluation of chitosan-based injectable hydrogels for the culturing mice mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Biomater Appl*. 2010;24(7):625–37.
7. Chen S, Jia L, Zhang S, Zheng Y, Zhou Y. DEPTOR regulates osteogenic differentiation via inhibiting MEG3-mediated activation of BMP4 signaling and is involved in osteoporosis. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Jul;9(1):185.
8. Yang Q, Jia L, Li X, Guo R, Huang Y, Zheng Y, *et al*. n the Osteogenic DiffeLong Noncoding RNAs: New Players irectiation of Bone Marrow- and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cell Rev reports*. 2018 Jun;14(3):297–308.
9. Zhuang W, Ge X, Yang S, Huang M, Zhuang W, Chen P, *et al*. Upregulation of LncRNA MEG3 Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Multiple Myeloma Patients By Targeting BMP4 Transcription. *Stem*

- Cells. 2015 Jun;33(6):1985–97.
10. Gutiérrez-Fernández M, Otero-Ortega L, Ramos-Cejudo J, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Díez-Tejedor E. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a strategy to improve recovery after stroke. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Jun;15(6):873–81.
 11. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
 12. Shang F, Yu Y, Liu S, Ming L, Zhang Y, Zhou Z, *et al.* Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioact Mater.* 2021 Mar;6(3):666–83.
 13. Spang MT, Christman KL. Extracellular matrix hydrogel therapies: *In vivo* applications and development. *Acta Biomater.* 2018 Mar;68:1–14.
 14. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: Material and matrix considerations. *J Bone Jt Surg.* 2008;90(SUPPL. 1):36–42.
 15. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):743–65.
 16. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int J Polym Sci.* 2011;2011(ii).
 17. Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31(5):469–84.
 18. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine. *Growth (Lakeland)* [Internet]. 2010;324(5935):1673–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1171643>
 19. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol.* 2000 Feb;18(1):2–9.
 20. Balagangadharan K, Dhivya S, Selvamurugan N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;104:1372–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.046>
 21. Hussey GS, Cramer MC, Badylak SF. Extracellular Matrix Bioscaffolds for

- Building Gastrointestinal Tissue. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;5(1):1–13.
22. Verreck G, Chun I, Rosenblatt J, Peeters J, Dijck A Van, Mensch J, *et al*. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2003 Oct;92(3):349–60.
 23. Singh M, Sandhu B, Scurto A, Berkland C, Detamore MS. Microsphere-based scaffolds for cartilage tissue engineering: using subcritical CO₂ as a sintering agent. *Acta Biomater*. 2010 Jan;6(1):137–43.
 24. Choe JA, Jana S, Tefft BJ, Hennessy RS, Go J, Morse D, *et al*. Biomaterial characterization of off-the-shelf decellularized porcine pericardial tissue for use in prosthetic valvular applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Jul;12(7):1608–20.
 25. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*. 2015 May;24(10):1150–63.
 26. Park JW, Fu S, Huang B, Xu R-H. Alternative splicing in mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2020 Oct;38(10):1229–40.
 27. Li N, Guo R, Zhang ZJ. Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:630488.
 28. Shafaei H, Kalarestaghi H. Adipose-derived stem cells: An appropriate selection for osteogenic differentiation. *J Cell Physiol*. 2020 Nov;235(11):8371–86.
 29. Laloze J, Fiévet L, Desmoulière A. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Medicine: State of Play, Current Clinical Trials, and Future Prospects. *Adv wound care*. 2021 Jan;10(1):24–48.
 30. Jalali P, Tahmasbi M, Augsburg RA, Khalilkhani NK, Daghighi K. Dynamics of Bone Loss in Cases with Acute or Chronic Apical Abscess. *J Endod*. 2019;45(9):1114–8.
 31. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:684736.

32. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, *et al.* Fate decision of mesenchymal stem cells : adipocytes or osteoblasts ? 2016;1128–39.
33. Alves RDAM, Eijken M, Swagemakers S, Chiba H, Titulaer MK, Burgers PC, *et al.* Proteomic analysis of human osteoblastic cells: Relevant proteins and functional categories for differentiation. *J Proteome Res.* 2010;9(9):4688–700.
34. Granéli C, Thorfve A, Ruetschi U, Brisby H, Thomsen P, Lindahl A, *et al.* Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res* [Internet]. 2014;12(1):153–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.009>
35. Kirkham GR, Elliot KJ, Keramane A, Salter DM, Dobson JP, El Haj AJ, *et al.* Hyperpolarization of human mesenchymal stem cells in response to magnetic force. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2010 Mar;9(1):71–4.
36. Chen G, Deng C, Li Y-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272–88.
37. Vaes BLT, Ducy P, Sijbers AM, Hendriks JMA, van Someren EP, de Jong NG, *et al.* Microarray analysis on Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone.* 2006 Oct;39(4):724–38.
38. Vijaykumar A, Dyrkacz P, Vidovic-Zdrilic I, Maye P, Mina M. Expression of BSP-GFPtpz Transgene during Osteogenesis and Reparative Dentinogenesis. *J Dent Res.* 2020;99(1):89–97.
39. Bayarmaa B, Wu Z, Peng J, Wang Y, Xu S, Yan T, *et al.* Association of LncRNA MEG3 polymorphisms with efficacy of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *BMC Cancer.* 2019;19(1):877.
40. Zhu L, Xu P-C. Downregulated LncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Mar;432(4):612–7.
41. Li Q, Zhang Z, Guo S, Tang G, Lu W, Qi X. LncRNA ANCR is positively correlated with transforming growth factor- β 1 in patients with osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2019 Sep;120(9):14226–32.

42. Guo R, Huang Y, Liu H, Zheng Y, Jia L, Li W. Long Non-Coding RNA H19 Participates in Periodontal Inflammation via Activation of Autophagy. *J Inflamm Res.* 2020;13:635–46.
43. Choi SW, Kim HW, Nam JW. The small peptide world in long noncoding RNAs. Vol. 20, *Briefings in Bioinformatics.* 2019. p. 1853–64.
44. Wang S, Xiong G, Ning R, Pan Z, Xu M, Zha Z, *et al.* LncRNA MEG3 promotes osteogenesis of hBMSCs by regulating miR-21-5p/SOD3 axis. *Acta Biochim Pol.* 2022;69(1):71–7.
45. Wang S, Xiong G, Ning R, Pan Z, Xu M, Zha Z, *et al.* LncRNA MEG3 promotes osteogenesis of hBMSCs by regulating miR-21-5p / SOD3 axis. *Acta Biochim Pol.* 2022 Mar;69(1):71–7.
46. Kopp Florian M and JTM. Functional classification of human lncRNAs. *Physiol Behav.* 2016;176(1):100–106.
47. Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, Carpenter S, Chang HY, Chen L-L, *et al.* Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023 Jun;24(6):430–47.
48. Al-Rugeebah A, Alanazi M, Parine NR. MEG3: an Oncogenic Long Non-coding RNA in Different Cancers. *Pathol Oncol Res.* 2019 Jul;25(3):859–74.
49. Sun H, Peng G, Wu H, Liu M, Mao G, Ning X, *et al.* Long non-coding RNA MEG3 is involved in osteogenic differentiation and bone diseases (Review). *Biomed reports.* 2020 Jul;13(1):15–21.
50. Li Z, Jin C, Chen S, Zheng Y, Huang Y, Jia L, *et al.* Long non-coding RNA MEG3 inhibits adipogenesis and promotes osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-140-5p. *Mol Cell Biochem.* 2017 Sep;433(1–2):51–60.
51. Liu Y, Liu C, Zhang A, Yin S, Wang T, Wang Y, *et al.* Down-regulation of long non-coding RNA MEG3 suppresses osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells (PDLSCs) through miR-27a-3p/IGF1 axis in periodontitis. *Aging (Albany NY).* 2019;11(15):5334–50.
52. Wang Q, Li Y, Zhang Y, Ma L, Lin L, Meng J, *et al.* LncRNA MEG3 inhibited osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from

- postmenopausal osteoporosis by targeting miR-133a-3p. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;89:1178–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.090>
53. Ullah I, Hussain Z, Ullah S, Zahra QUA, Zhang Y, Mehmood S, *et al.* An osteogenic, antibacterial, and anti-inflammatory nanocomposite hydrogel platform to accelerate bone reconstruction. *J Mater Chem B*. 2023 Jun;11(25):5830–45.
 54. Morsi NM, Nabil Shamma R, Osama Eladawy N, Abdelkhalek AA. Bioactive injectable triple acting thermosensitive hydrogel enriched with nano-hydroxyapatite for bone regeneration: in-vitro characterization, Saos-2 cell line cell viability and osteogenic markers evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2019;45(5):787–804. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2019.1572184>
 55. Schoonraad SA, Jaimes AA, Singh AJX, Croland KJ, Bryant SJ. Osteogenic effects of covalently tethered rhBMP-2 and rhBMP-9 in an MMP-sensitive PEG hydrogel nanocomposite. *Acta Biomater*. 2023 Oct;170:53–67.
 56. Qi J, Zheng Z, Hu L, Wang H, Tang B, Lin L. Development and characterization of cannabidiol-loaded alginate copper hydrogel for repairing open bone defects *in vitro*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022 Apr;212:112339.
 57. Mohiuddin OA, O'Donnell BT, Poche JN, Iftikhar R, Wise RM, Motherwell JM, *et al.* Human Adipose-Derived Hydrogel Characterization Based on *In Vitro* ASC Biocompatibility and Differentiation. *Stem Cells Int*. 2019;2019:9276398.
 58. 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. *Front Physiol*. 2015;6:297.

