

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



**ANALISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE HIDROGEL DE MATRIZ  
EXTRACELULAR DE VEJIGA URINARIA BIOFUNCIONALIZADO CON EL  
PÉPTIDO LL37**

**NO. DE REGISTRO 2023-4**

**TESIS QUE PRESENTA:**

**CD. YOSSELINE HERNÁNDEZ ARELLANO**

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

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DR. JOSÉ GEOVANNI ROMERO QUINTANA**

**DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA**

**ASESOR:**

**MC. JORGE ARMANDO LÓPEZ GUTIERREZ**

**CULIACÁN, ROSALES, SINALOA, DICIEMBRE, 2023**



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\_A2\_012, bajo la dirección del Dr. José Geovanni Romero Quintana.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis padres **Marco Antonio Hernández Morgan y Cecilia Arellano Zazueta** por el apoyo incondicional que me han brindado en cumplir cada uno de mis sueños, incluyendo la decisión de estudiar en un posgrado. Siempre brindándome apoyo incondicional, moral y económico para poder cumplir esta nueva meta en mi vida. Por estar para mí cada que lo necesitaba, ser un ejemplo de superación profesional y persona, esperando algún día regresarles lo mucho que me han dado, muchas gracias por confiar en mí y en lo que puedo lograr.

A mi Abuela **Ma. Dolores Zazueta** quien con sus consejos en mis días mas cansados siempre me animaba y alimentaba siempre a seguir guiándome por el buen camino.

A mis hermanos **Marco Antonio Hernández Arellano y Yazmhin Guadalupe Hernández Arellano** quienes fueron de mis primeros pacientes y confiaron en mí cuando decidí comenzar en la odontología.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, expreso mi agradecimiento a la Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar por permitirme formar parte de la 8ª Generación de la Especialidad en Endodoncia. Agradezco el invaluable regalo que me brindó al cambiar mi vida, impulsándome tanto en mi desarrollo profesional como personal.

Quiero reconocer y agradecer a todos mis maestros por compartir sus conocimientos y por su constante interés en que alcancemos la excelencia. Más allá de su apoyo académico, agradezco la transformación de su rol de maestros a amigos entrañables.

Mi reconocimiento se extiende a aquellos que contribuyeron al avance de este proyecto, especialmente a mis directores de tesis el **Dr. José Giovanni Romero Quintana** y la **Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina** así como a mi asesor de tesis, el **MC. Jorge López gutierrez** por su colaboración y apoyo en la elaboración de este proyecto.

Quiero agradecer a cada uno de mis endohermanos del posgrado, **Rebeca, Crisbel, Kenia, Kevin, Paola, Kathya, Juan Carlos y Alejandro** quienes han sido parte fundamental de mi vida durante estos dos años. Agradezco su compañía, apoyo, amistad y por convertir esta experiencia en una de las más enriquecedoras de mi existencia, por alegrarme los días con sus ocurrencias y por haber convertido esta experiencia en una de las mejores de mi vida.

A mi novio **Jorge Omar Beltran** quien es parte importante de mi vida, por estar conmigo en todo momento, escucharme y motivarme en momentos de estrés y desespero, por impulsarme a seguir siempre adelante y confiar en mí.

A mi amigas **Dominick, Melissa, Alvaren y Liliana** por estar siempre para mí, aligerar mis días cuando sentía no poder con su compañía o ayuda académica, siempre alientandome y creyendo en mí.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT .....	XII
INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 MARCO TEÓRICO .....	16
1.1.1 PULPA DENTAL.....	16
1.1.1.1 Irritantes pulpaes.....	17
1.1.1.1.1 Irritantes mecanicos.....	18
1.1.1.1.2 Irritantes químicos .....	18
1.1.1.1.3 Irritantes microbianos .....	19
1.1.1.2 Inflamación .....	20
1.1.1.2.1 Citocinas .....	23
1.1.2 TERAPIA REGENERATIVA.....	24
1.1.3 Ingenieria de tejidos .....	28
1.1.3.1 ANDAMIOS .....	30
1.1.3.2 HIDROGELES.....	32
1.1.3.2.1 Hidrogeles de origen sintéticos.....	36
1.1.3.2.2 Hidrogeles de origen natural.....	36
1.1.4 MEC.....	37
1.1.4.1 Hidrogel de MEC .....	39
1.1.4.2 hUBM .....	40
1.1.5 Péptidos antimicrobianos .....	42
1.1.5.1 Péptido LL37 .....	44
1.1.6 BIOCMPATIBILIDAD .....	47
1.1.6.1 Macrófagos.....	49
1.2 ANTECEDENTES .....	50
JUSTIFICACIÓN .....	52
HIPÓTESIS .....	53

OBJETIVOS .....	54
1.3    Objetivo general .....	54
1.4    Objetivos específicos .....	54
MATERIALES Y MÉTODOS .....	55
1.5    Lugar de obtención de la muestra.....	55
1.6    Tipo de estudio.....	55
1.7    Material biológico .....	55
1.7.1    Hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina.....	55
1.7.2    Línea celular .....	55
1.8    Metodología .....	56
1.8.1    Biofuncionalización de hUBM.....	56
1.8.2    Evaluación de la morfología celular.....	56
1.8.3    Análisis de citotoxicidad mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) 56	
1.8.4    Análisis de la proliferación celular mediante el ensayo de tetrazolio (MTT) 57	
1.8.5    Evaluación de citocinas proinflamatorias mediante el ensayo de perlas citométricas .....	57
1.8.6    Análisis estadístico .....	58
RESULTADOS .....	59
1.9    EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR.....	59
1.10    Resultados de la prueba de citotoxicidad (ldh) .....	60
1.11    Resultados de la proliferación celular mediante el ensayo de tetrazolio (MTT) 62	
1.12    Resultados de citocinas proinflamatorias mediante el ensayo de perlas citométricas.....	65
DISCUSIÓN.....	67

CONCLUSIÓN.....	69
PERSPECTIVAS .....	70
REFERENCIAS .....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES DEPENDIENDO SU FUENTE DE ORIGEN .....	35
FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL PÉPTIDO LL-37 EN SUS DIFERENTES FRAGMENTOS.....	46
FIGURA 3 ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR TEÑIDAS CON HEMOCOLORANTE RÁPIDO....	59
FIGURA 4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN MACRÓFAGOS .....	61
FIGURA 5. ENSAYO DE PROLIFERACION EN MACRÓFAGOS.....	63
FIGURA 6. MACRÓFAGOS ENSAYO MTT .....	64
FIGURA 7. ENSAYO DE DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS.....	66

## **ABREVIATURAS**

**MEC:** Matriz extracelular

**hUBM:** Hidrogel de matriz extracelular de vejiga urinaria porcina

**HCl:** Ácido Clorhídrico

**ECM:** Extracellular matrix

**MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos

**SP:** Sustancia P (SP)

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

**IL-1:** Interleucina 1

**IL-6:** Interleucina 6

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral

**ICAM-1:** Adhesión intercelular 1

**VCAM-1:** Molécula de adhesión de células vasculares

**ELAM-1:** Molécula de adhesión endotelio-leucocitos

**IL-2:** Interleucina 2

**IL-8:** Interleucina 8

**IL-7:** Interleucina 7

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-13:** Interleucina 13

**TGF- $\beta$ :** Factor transformador de crecimiento  $\beta$

**AAE:** Asociación Americana de Endodoncia

**UBM:** Matriz extracelular de vejiga urinaria

**pUBM:** Matriz extracelular derivada de la vejiga urinaria porcina

**AMP:** Péptidos antimicrobianos

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

**HyE:** Hematoxilina y Eosina

## RESUMEN

**Introducción:** La evaluación de citotoxicidad de biomateriales es de suma importancia para evitar riesgos y reacciones adversas en pacientes. La ingeniería tisular se rige por la necesidad de tres factores para lograr la regeneración tisular: células, andamios y bioseñales. Los andamios más utilizados está el de matriz extracelular (MEC), que consiste en una red tridimensional que promueve la supervivencia y desarrollo celular, estimulando la migración, proliferación, señalización y activación de diferentes tipos celulares.. Dentro de las observaciones que más se han destacado en el ámbito biomédico, es la presencia de péptidos antimicrobianos en MEC en sitios de inflamación y cicatrización de heridas, cómo el péptido LL37, funcionando como señal proliferativa y factor proangiogénico. **Materiales y métodos:** Se realizó un cultivo celular con medios condicionados de un hidrogel de matriz extracelular de vejiga urinaria porcina (hUBM), o biofuncionalizado con el péptido LL37 (pUBMh-LL37) con sus respectivos controles. Para este propósito se utilizó medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM ) suplementado con 10% de FBS y 1% de antibiótico-antimicótico. Se llevaron a cabo pruebas de citotoxicidad a 24 horas con prueba de LDH, evaluación de proliferación a las 24, 48 y 72 mediante el ensayo de MTT, morfología celular con tinción de hemocolorante y evaluación de citocinas proinflamatorias por citometría de flujo. **Resultados:** Al comparar la citotoxicidad no se observaron células muertas en ninguno de los grupos, al contrario, se observaron células viables en todos ellos. Asimismo, la evaluación de citocinas pro inflamatorias mostró una expresión elevada del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1 en pUBMh-LL37, respecto al control. **Conclusiones:** Tanto hUBM como hUBM-LL37 presentaron una buena biocompatibilidad, por lo que podrían tener potencial para ser empleados como material para regeneración en ingeniería de tejidos.

**Palabras claves:** *Biocompatibilidad, Hidrogel de Matriz Extracelular, Péptido LL37 , Vejiga urinaria.*

## ABSTRACT

**Introduction:** The evaluation of cytotoxicity of biomaterials is of utmost importance to avoid risks and adverse reactions in patients. Tissue engineering is governed by the need of three factors to achieve regeneration: cells, scaffolds and biosignals. Among the most used scaffolds is the extracellular matrix (ECM), which is a three-dimensional network that promotes cell survival and development, provides mechanical support to tissues allowing cellular innervation. The ECM stimulates migration, proliferation, signaling and activation of different cell types. Antimicrobial peptides have been found in ECM at sites of inflammation and wound healing, such as the peptide LL37, functioning as a proliferative signal and proangiogenic factor. **Materials and methods:** Cell culture with conditioned media of a porcine urinary bladder extracellular matrix hydrogel (hUBM), or biofunctionalized with the LL37 peptide (hUBMh-LL37) with their respective controls. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic. Cytotoxicity tests at 24 hours with the LDH test. Evaluation of proliferation at 24, 48 and 72 using the MTT assay. Cellular morphology with Hemocolorant staining. Evaluation of pro-inflammatory cytokines by flow cytometry. **Results:** When comparing cytotoxicity using the different methodologies, no dead cells were observed in any of the groups, on the contrary, viable cells were observed in all of them. Likewise, the evaluation of pro-inflammatory cytokines showed a high expression of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and monocyte chemotactic protein (MCP-1) in pUBMh-LL37, compared to the control. **Keywords:** *Bioocompatibility, Extracellular Matrix Hydrogel, LL37 Peptide, Urinary Bladder.*

## INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas a los que se enfrenta hoy en día la población a nivel mundial, es la pérdida de órganos y tejidos en cavidad oral, esto debido a enfermedades, procedimientos quirúrgicos altamente invasivos o traumatismos, este escenario ha impulsado la investigación y desarrollo de biomateriales destinados a reemplazar y regenerar estas estructuras dañadas o perdidas (Righolt et al., 2018). En el área odontológica la terapia regenerativa constituye un desafío ya que las lesiones de caries avanzadas pueden dañar irreversiblemente la pulpa dental al propagar una respuesta inflamatoria sostenida por todo el tejido, y aunque la respuesta inflamatoria inicialmente impulsa la reparación del tejido, la inflamación sostenida tiene un efecto enormemente destructivo sobre la pulpa vital, lo que finalmente conduce a la necrosis total del tejido y requiere su extirpación, terminando en un tratamiento de conductos (Ayala-Ham et al., 2021). El mantenimiento de una pulpa dental vital es de suma importancia porque los dientes desvitalizados por el tratamiento de conducto pueden volverse más quebradizos y propensos a fallas estructurales con el tiempo. Las implicaciones de la desvitalización de los dientes han generado un gran interés en el desarrollo de materiales bioactivos que faciliten la regeneración de los tejidos pulpaes dañados aprovechando la capacidad de la pulpa dental para autorrepararse (Hargreaves et al., 2013). Para lograr esta regeneración es indispensable contar con tres elementos para restaurar las funciones de los tejidos de órganos afectados o enfermos: células, moléculas bioactivas y andamios (Baker et al., 2009). Esta tríada es capaz de modular los procesos para reponer tejidos perdidos o dañados y restaurar la función, ya que impacta en diversos procesos celulares, influyendo positivamente en el comportamiento celular para inducir la restauración completa de la función y morfología de tejidos tan complejos (Ayala-Ham et al., 2021). La regeneración tisular implica mecanismos celulares y moleculares específicos para la reparación del tejido dañado, sustituyéndolo con células completamente idénticas a las pérdidas y lesionadas, para lograrlo es necesario la conjugación armónica de células y tejidos continuos, lo que implica proliferación celular promovida por factores de crecimiento,

estrechamente dependiente de la matriz extracelular y el desarrollo de moléculas específicas, parte del éxito de la terapia regenerativa se basa en tener andamios biofuncionales, los hidrogeles han mostrado ventajas como andamios, ya que son redes tridimensionales blandas y elásticas formadas a partir de homopolímeros, copolímeros o macrómeros hidrofílicos (Athirasala et al., 2018). Estos pueden inducir cambios en los procesos celulares como la quimiotaxis, la proliferación, la angiogénesis, la biomineralización y la expresión de biomarcadores de tejidos específicos, mejorando el proceso de regeneración. Además, algunos de ellos tienen efectos antiinflamatorios y antibacterianos (Baker et al., 2009). Existe una amplia clasificación y variedad de hidrogeles dependiendo del origen de estos, dentro de los naturales se encuentra el hidrogel basado en matriz extracelular, el cual proporciona andamiaje físico a las células y soporte estructural a los tejidos, ofreciendo señales específicas que se necesitan para la regeneración y la homeostasis, a través de sus proteínas, proteoglicanos y sitios de anclaje. Muestra actividades químicas, mecánicas y biológicas como la incorporación de células en sus estructuras, la retención de un alto contenido de agua que mejora el transporte de nutrientes y desechos celulares, y características elásticas y flexibles que emulan la matriz extracelular nativa (MEC). La MEC permite la liberación de citocinas y moléculas de señalización que inducen la migración, proliferación, señalización y activación de diferentes tipos celulares (Faulk et al., 2014). En la actualidad, distintos tipos de MEC pueden solubilizarse y manipularse para formar hidrogeles expandiendo su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, como materiales que rellenan defectos críticos. La MEC se puede obtener de diferentes fuentes ya sea origen porcino o bovino las cuales conservan la estructura bioquímica, la nanoestructura y las propiedades bioinductivas de la matriz nativa, se ha demostrado que la matriz extracelular de vejigas porcinas no solo regula las actividades celulares sino que también posee características inmunorreguladoras (Naahidi et al., 2017). Se han encontrado péptidos antimicrobianos en MEC en sitios de inflamación y cicatrización de heridas, como el péptido LL37. El péptido antimicrobiano LL-37 es el único miembro conocido de la familia de péptidos de catelicidina expresado en humanos. LL-37 es una molécula de defensa del huésped multifuncional esencial para las respuestas inmunitarias normales frente a infecciones

y lesiones tisulares. El péptido LL-37 es un potente asesino de diferentes microorganismos con la capacidad de prevenir los efectos inmunoestimuladores de las moléculas de la pared bacteriana como el lipopolisacárido (Bucki et al., 2010). Otras actividades notificadas de LL-37 incluyen la función quimioatrayente, la inhibición de la apoptosis de neutrófilos y la estimulación de la angiogénesis, la regeneración de tejidos y la liberación de citocinas. La producción celular de LL-37 se ve afectada por múltiples factores, incluidos los productos bacterianos, las citocinas del huésped y la disponibilidad de oxígeno. En los sitios de infección, la función de LL-37 puede inhibirse mediante interacciones impulsadas por carga con el ADN y la actina F liberada de los neutrófilos muertos y otras células lisadas como resultado de la inflamación. lo más importante dentro de nuestra investigación es que pueden cumplir diversas funciones de señalización dentro del andamio siendo capaces de promover la vasculogénesis y permitir la interacción con células de manera controlada (de Oliveira et al., 2011). Por lo tanto creemos que este péptido estaría funcionando como señal proliferativa y factor proangiogénico al estar biofuncionalizado al hidrogel de matriz extracelular de vejiga urinaria porcina (hUBM) siendo un andamio ideal para la regeneración tisular, específicamente en la revascularización pulpar. Sin embargo, la evaluación de la citotoxicidad de biomateriales es de suma importancia para evitar riesgos y reacciones adversas en pacientes. Hasta la fecha no se ha logrado tener una metodología de tratamiento con resultados confiables, ya que estos no logran tener el éxito esperado, debido a que no aplican los principios de la triada en regeneración tisular.

## **1.1 MARCO TEORICO**

### **1.1.1 PULPA DENTAL**

La pulpa dental es un tejido único y complejo que desempeña un papel fundamental al servir como soporte para la dentina, el componente principal de la estructura del diente. Su estructura básica está bien definida y se compone principalmente de colágeno tipo I y tipo III, junto con una variedad de proteínas no colágenas. Entre estas últimas se incluye un componente significativo de proteoglicanos (Yang et al., 2020).

Este tejido único alberga diversas células especializadas, células madre y células inflamatorias o inmunitarias infiltrantes. Todas estas células desempeñan un papel crucial en la estrategia defensiva de la pulpa (Ayala-Ham et al., 2021). Entre las células presentes se encuentran fibroblastos, células progenitoras mesenquimales, células vasculares y células nerviosas (Miura et al., 2003).

Los fibroblastos son las células más abundantes en la pulpa dental y desempeñan un papel crucial al mantener la matriz de colágeno en el tejido pulpar. Además, una población de células inmunitarias, especialmente los macrófagos tisulares, permanece lista para responder ante la posible invasión microbiana (Harris & Griffin, 1969). Adicionalmente, la pulpa dental cuenta con una extensa inervación que facilita no solo la detección de estímulos dolorosos, sino también una respuesta inflamatoria neurogénica (Ayala-Ham et al., 2021). Esto conlleva a la liberación local de neuropéptidos, algunos de los cuales poseen propiedades antimicrobianas directas (El Karim et al., 2008). En conjunto, las células residentes y reclutadas, junto con los nervios presentes en la pulpa dental, contribuyen de manera significativa a la defensa contra las infecciones y a su eliminación cuando se ha traspasado la barrera de defensa (Lundy et al., 2020).

Este tejido especializado cumple funciones específicas, como la formación continua de raíces y la generación de nueva dentina a lo largo de la vida. Este proceso fisiológico se conoce como formación de dentina secundaria. Simultáneamente, la respuesta del tejido a estímulos ambientales que resulta en la formación de una



interfaz entre la pulpa y la dentina dañada o en un proceso de restauración se denomina dentina terciaria (Ayala-Ham et al., 2021), esto se debe a que la cámara pulpar está revestida por una capa de odontoblastos columnares, que poseen proyecciones celulares asociadas con un sistema de túbulos llenos de líquido que atraviesan la dentina hasta la unión amelo dentinaria (Harris & Griffin, 1969). Estas células son directamente responsables del mantenimiento de la dentina mineralizada durante la carga rutinaria del diente (Colombo et al., 2014).

#### **1.1.1.1 Irritantes pulpaes**

Diversos estímulos tienen efectos sobre la pulpa dental, y estos efectos están influenciados por la magnitud, duración y frecuencia del estímulo, así como por la permeabilidad y grosor de la dentina involucrada. Las intervenciones terapéuticas pueden disminuir o mejorar los irritantes siempre y cuando se administren de manera oportuna (Ayala-Ham et al., 2021).

En dientes sanos e intactos, la pulpa dental demuestra una eficacia notable para preservar la estructura del diente durante periodos de tiempo relativamente largos gracias a su habilidad para responder al daño e iniciar procesos de reparación. Sin embargo, es cuando este equilibrio se ve alterado por lesiones en el tejido pulpar, ya sea a causa de un traumatismo o la formación de una lesión cariosa, que se compromete la integridad del diente (Colombo et al., 2014).

Los irritantes pulpaes se han clasificado en mecánicos, térmicos, químicos e infecciosos (LEVIN, 2003).

#### **1.1.1.1.1 Irritantes mecánicos**

Los irritantes mecánicos que afectan la pulpa dental se pueden clasificar en dos categorías: mecánicos y biomecánicos. Los irritantes mecánicos incluyen el movimiento ortodóntico y la preparación dental, mientras que la irritación biomecánica se origina a partir de las fuerzas funcionales y parafuncionales que actúan sobre la dentición durante actividades como la masticación o el bruxismo (LEVIN, 2003).

#### **1.1.1.1.2 Irritantes químicos**

Los diversos mecanismos mediante los cuales los materiales de restauración afectan negativamente a la pulpa dental son diversos, existen pruebas que respaldan la citotoxicidad directa, y en ciertos casos, prolongada, así como la inducción de reacciones de hipersensibilidad o la disminución de la respuesta inmunológica del huésped frente a las bacterias. Algunos de los elementos de las restauraciones de resina se liberan a niveles citotóxicos después de completarse la polimerización, lo que conduce a una estimulación crónica y una respuesta inflamatoria prolongada como consecuencia (Colombo et al., 2014).

Además de los efectos químicos directos de los materiales de restauración, hay factores indirectos que contribuyen a la irritación pulpar. La susceptibilidad de ciertos materiales los hace propensos a formar uniones defectuosas con la estructura dental, lo que puede resultar en hipersensibilidad de la dentina, enfermedad recurrente, inflamación o necrosis pulpar. Se ha prestado especial atención a la interfaz creada entre los materiales adheridos con resina y la dentina. Durante el proceso de grabado, la dentina peritubular más densamente mineralizada se disuelve preferentemente, dejando fibrillas de colágeno expuestas y abriendo ramificaciones tubulares laterales (LEVIN, 2003).

La irritación pulpar se percibe en su mayoría como una consecuencia negativa; no obstante, el potencial irritante de ciertos materiales de restauración es esencial para su eficacia en odontología restaurativa. El hidróxido de calcio, uno de los

medicamentos más antiguos y ampliamente empleados, se utiliza para estimular la formación de puentes dentinarios después de la exposición pulpar, ya sea microscópica o macroscópica. La irritación pulpar de baja intensidad que provoca es crucial para la formación del puente dentinario (U., 1985). El grado de inflamación está vinculado a la preparación específica de hidróxido de calcio utilizada. Las suspensiones acuosas de hidróxido de calcio aplicadas a las pulpas expuestas inducen una necrosis superficial del tejido pulpar, generando una inflamación de baja intensidad que recubre el parénquima pulpar (Cveck, 1978).

#### **1.1.1.1.3 Irritantes microbianos**

La exposición microbiana persistente representa el irritante más perjudicial para la pulpa dental, y la pulpa subyacente es altamente susceptible a la infección. Investigaciones indicaron que la caries puede afectar la pulpa dental incluso antes de que la infección rompa la unión entre la dentina y el esmalte (Brännström & Lind, 1965). A partir de ese punto, la progresión de la infección ejerce un impacto cada vez mayor en la pulpa subyacente, desencadenando mecanismos de defensa y reparación orientados principalmente a disminuir la permeabilidad de la dentina y eliminar los agentes patógenos (LEVIN, 2003)

La estimulación externa de la dentina desencadena la liberación de neuropéptidos proinflamatorios desde los nervios aferentes pulpares (Byers & Närhi, 1999). La sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) son liberados, dando lugar a eventos vasculares como la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular. Esto resulta en un incremento neto de la presión tisular que, en circunstancias extremas y persistentes, puede evolucionar hacia la necrosis. Además, otros elementos de la pulpa, como los fibroblastos, los odontoblastos y las células de Schwann, reaccionan ante los irritantes generando factores de crecimiento y citocinas diseñados para combatir patógenos, aunque secundariamente pueden contribuir a la destrucción de la pulpa (LEVIN, 2003).

Los diversos factores irritantes mencionados anteriormente llevan a una inflamación pulpar cuyo objetivo es proteger la pulpa y el diente de posibles daños. Esta inflamación radica en la respuesta del tejido pulpar (el tejido interno del diente que contiene nervios y vasos sanguíneos) ante ciertos estímulos nocivos. Los irritantes pulpares pueden desencadenar una serie de eventos que resultan en inflamación en la pulpa dental. La detección temprana y el manejo adecuado de los irritantes pulpares pueden prevenir complicaciones más serias y preservar la salud dental.

### **1.1.1.2 Inflamación**

La respuesta de la pulpa implica una reacción inflamatoria normal, que implica vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y la movilización de células inmunológicas. Esta puede ser derivada de la formación de caries dental infectada es un factor que con frecuencia provoca una alteración en el equilibrio dinámico de la pulpa dental. Bacterias de la cavidad bucal se adhieren a la superficie del esmalte y eventualmente forman una biopelícula que puede consistir en todo un ecosistema de organismos de población mixta, incluyendo del género de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Actinomyces* entre otros (Colombo et al., 2014).

El papel de los mediadores inflamatorios en la pulpa dental es singular. La respuesta a cualquier cambio en la fisiología del entorno local de la pulpa incluye procesos fundamentales, como la diferenciación de las células de odontoblastos y otras actividades secretoras (Nireeksha et al., 2021).

El mecanismo predominante para el proceso de reparación y regeneración involucra principalmente vías de señalización molecular, cascadas inflamatorias y efectos inmunomoduladores (Hancock & Sahl, 2006). La presencia de infiltración de células inflamatorias, como los neutrófilos, en la pulpa inflamada sugiere la existencia de quimiotaxis, un proceso mediante el cual las células son atraídas hacia un sitio de inflamación en respuesta a señales químicas. Siendo esto fundamental en la respuesta inflamatoria y la defensa del organismo contra infecciones o lesiones (Nireeksha et al.,

2021). Estas células inflamatorias, liberan enzimas lisosomales que pueden causar la destrucción del tejido, provocando daño permanente e irreversible o necrosis. Este proceso forma parte de la respuesta inflamatoria, y aunque es una estrategia del sistema inmunológico para eliminar patógenos, en algunos casos puede llevar a consecuencias dañinas para el tejido circundante (Zehra, 2020).

Diversos procesos de señalización en la pulpa estimulan la liberación de varios mediadores, los cuales desempeñan papeles cruciales en la progresión de la inflamación o pueden resultar en una regresión abrupta del proceso inflamatorio. La interacción compleja de estos mediadores y las vías de señalización es esencial para la regulación de la respuesta inflamatoria en el tejido pulpar (Paris et al., 2009). Los linfocitos T son componentes esenciales en la pulpa dental. Se observa una acumulación inicial de CD3+, que generalmente son linfocitos T, así como células plasmáticas y neutrófilos alrededor de las células dendríticas pulpares. Este fenómeno refleja la respuesta inmunológica y la interacción entre distintas células del sistema inmunológico en la pulpa dental, especialmente en situaciones inflamatorias o en presencia de estímulos infecciosos (Nireeksha et al., 2021). La interacción entre las células dendríticas y los linfocitos T da como resultado la movilización y activación de diferentes células, provocando así eventos inmunopatológicos. El aumento de la afluencia de células plasmáticas, la producción de inmunoglobulinas y la presencia perivascular de células dendríticas conducen a la respuesta inmunológica (Khurshid et al., 2021). Este aumento se traduce en un mayor patrullaje de los linfocitos T de memoria y en la liberación de citocinas derivadas de macrófagos como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). Además, se observa una regulación positiva de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y la molécula de adhesión endotelio-leucocitos (ELAM-1) en la superficie de las células endoteliales, lo cual contribuye a explicar el proceso inflamatorio en la pulpa dental (Nireeksha et al., 2021)

Esta inflamación puede manifestarse como sensibilidad dental y dolor. Si la irritación persiste, puede provocar daño permanente en la pulpa, requiriendo tratamiento endodóntico como el tratamiento de conducto para preservar la salud del diente".

En situaciones en las que se produce daño permanente o irreversible del tejido pulpar, la necrosis puede requerir tratamiento endodóntico. Este tratamiento, que implica la remoción del tejido pulpar infectado o necrótico del conducto radicular, pudiendo o no incluir la colocación de medicamentos intraconducto para lograr una desinfección completa. Este enfoque busca prevenir el dolor postendodóntico, eliminar la periodontitis apical y promover la salud a largo plazo de la estructura dental comprometida, manteniendo el órgano dental en boca el mayor tiempo posible (Poojar et al., 2017).

### **1.1.1.2.1 Citocinas**

Las citocinas son polipéptidos o glucoproteínas extracelulares, hidrosolubles, con tamaños que varían entre 8 y 30 kDa. Se generan a partir de diversos tipos de células en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico. Estas actúan especialmente a través de mecanismos paracrinos (en células vecinas) y autocrinos (en las propias células productoras (Lin et al., 2000).

Las citocinas tienen un impacto significativo en la actividad, diferenciación, proliferación y supervivencia de las células del sistema inmunológico. También regulan la producción y actividad de otras citocinas, pueden tener acciones proinflamatorias (Th1) o antiinflamatorias (Th2), dependiendo del microambiente en el que se encuentren (de Oliveira et al., 2011).

Entre las consideradas proinflamatorias se encuentran IL-1 se produce principalmente en macrófagos y monocitos, así como en células no inmunológicas como fibroblastos y células endoteliales, cuando estas últimas se activan debido a lesiones celulares, infecciones, invasiones o inflamación (Righolt et al., 2018) interleucina 2 (IL-2), IL-6, interleucina 7, (IL-7) y TNF- $\alpha$  .Por otro lado, las citocinas antiinflamatorias incluyen interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13) y el factor transformador de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), estas acciones y regulaciones son fundamentales para mantener el equilibrio en la respuesta inmunológica y la homeostasis del organismo (Lin et al., 2000).

Las citocinas son sustancias esenciales para la respuesta inflamatoria y desempeñan un papel crucial en la regulación de la cicatrización adecuada de las heridas. No obstante, una producción excesiva de citocinas proinflamatorias como respuesta a una lesión puede tener manifestaciones sistémicas, dando lugar a inestabilidad hemodinámica o disturbios metabólicos. Esta situación, conocida como tormenta de citocinas o síndrome de liberación de citocinas, puede ser perjudicial y contribuir a la

patología en diversas condiciones médicas, incluyendo enfermedades autoinmunes, infecciones graves y otras situaciones inflamatorias (de Oliveira et al., 2011).

### **1.1.2 TERAPIA REGENERATIVA**

La pérdida de dientes es un problema de salud global con repercusiones tanto sociales como económicas, como se ha señalado en estudios como el de. Esta condición afecta funciones vitales como la capacidad de morder, masticar, sonreír y hablar, además de las implicaciones significativas en el aspecto psicosocial (Righolt et al., 2018).

La caries dental y la enfermedad periodontal son las principales causas de pérdida dental, siendo la caries es la enfermedad más común reportada a nivel mundial (LEVIN, 2003).

Las lesiones cariosas progresivas tienen el potencial de causar daño permanente a la pulpa dental al propiciar la propagación de una inflamación sostenida a lo largo del tejido, lo que eventualmente puede resultar en la necrosis pulpar. Esto puede interrumpir el desarrollo de dientes inmaduros (Milhan et al., 2017) En aquellos dientes afectados, la necrosis puede dar lugar a una estructura radicular debilitada con paredes dentinarias delgadas, volviendo al diente susceptible a fracturas y disminuyendo su tasa de supervivencia (Yadlapati et al., 2017). En consecuencia, la regeneración de estos tejidos se vuelve de suma importancia para estos dientes después de la descontaminación del conducto radicular, ya que permitiría mantener la continuidad en el desarrollo dental (Milhan et al., 2017).

La regeneración de la pulpa dental presenta desafíos significativos debido a su naturaleza compleja. El éxito de la terapia pulpar se ve influenciado por factores como la forma y la ubicación de la lesión, la edad del diente, el enfoque terapéutico y el material de recubrimiento utilizado (Ayala-Ham et al., 2021).

La pulpa dental, la papila apical y el tejido periapical inflamado son fuentes potenciales de células madre. Estos tejidos contienen células madre que tienen la capacidad de



diferenciarse en diversos tipos celulares, lo que las hace valiosas para la regeneración y reparación de tejidos en odontología regenerativa. La investigación en este campo ha explorado el potencial terapéutico de las células madre derivadas de estos tejidos para diversas aplicaciones, incluyendo la regeneración pulpar y la reparación de tejidos periapicales (Yang et al., 2020).

El conocimiento sobre la capacidad regenerativa de las células madre mesenquimales y su aplicación se refleja en diversos tratamientos clínicos. Algunos de estos tratamientos incluyen el recubrimiento pulpar indirecto o directo, pulpotomías y revascularización pulpar. Estos procedimientos se diseñan con un énfasis específico en fomentar la formación de dentina, la recuperación de nervios sensoriales y el desarrollo de vasos sanguíneos en dientes afectados, especialmente en aquellos con necrosis pulpar o lesiones en tejidos pulpares. Estas estrategias buscan promover la regeneración y la salud de los tejidos pulpares para mejorar la función y la supervivencia a largo plazo de los dientes (Ayala-Ham et al., 2021).

El sangrado inducido en dientes inmaduros con necrosis pulpar puede promover una afluencia significativa de células madre mesenquimales indiferenciadas al espacio del conducto radicular (Hargreaves et al., 2013). Esta presencia de células madre mesenquimales indiferenciadas es crucial ya que puede contribuir de manera positiva al proceso de regeneración de los tejidos pulpares. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares necesarios para la formación y regeneración de los tejidos dentales. El enfoque de utilizar el sangrado inducido como un método para reclutar células madre mesenquimales es una estrategia prometedora en el campo de la odontología regenerativa. Sin embargo esta técnica todavía presenta limitaciones (Albuquerque et al., 2014).

A medida que el campo de la endodoncia regenerativa se consolida como una realidad emergente en la odontología clínica, se han propuesto diversas formas de enfoques regenerativos. Estos enfoques buscan aprovechar las capacidades regenerativas naturales del organismo para restaurar y mejorar la salud de los tejidos dentales,

especialmente en casos de lesiones pulpares o necrosis. Las investigaciones y avances en este campo continúan contribuyendo a nuevas estrategias y técnicas que pueden aplicarse en entornos clínicos para promover la regeneración pulpar y mejorar los resultados a largo plazo en la terapia endodóntica (Diogenes et al., 2016).

La definición de la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) destaca el término endodoncia regenerativa como "procedimientos de base biológica diseñados para reemplazar fisiológicamente las estructuras dentales dañadas, incluidas la dentina y las estructuras radiculares, así como las células del complejo pulpa-dentinaria". Esta definición subraya la naturaleza biológica de los procedimientos regenerativos en endodoncia, que buscan restaurar no solo la estructura dental, sino también las funciones y células asociadas en el complejo dentino-pupar. La definición de la AAE abarca una variedad de estrategias investigadas en el ámbito de la endodoncia regenerativa. Estas estrategias incluyen la revascularización del conducto radicular (sangrado del ápice invocado), la terapia posnatal (adulto) con células madre, los implantes de armazones, la impresión celular tridimensional (3D), los armazones inyectables y la terapia génica. Estas diferentes aproximaciones reflejan la diversidad de enfoques y técnicas que se exploran para lograr la regeneración eficaz de las estructuras dentales (Murray et al., 2007). Muchas de las estrategias mencionadas se benefician del uso de enfoques de administración basados en células y biomateriales que pueden sustituir los métodos de obturación convencionales que emplean materiales inertes, como la gutapercha. Por lo tanto, existe una alta demanda de estrategias de microingeniería que faciliten y estimulen la formación de un suministro vascular funcional en la pulpa dental. Estos enfoques buscan mejorar la capacidad de regeneración al proporcionar un entorno propicio para el desarrollo de vasos sanguíneos, lo cual es esencial para el éxito de la regeneración de los tejidos dentales (Bertassoni, 2020) La revascularización pulpar implica el desarrollo de un nuevo crecimiento microvascular dentro de la cámara de la raíz del diente después de la extirpación de la pulpa inflamada.

La técnica de revascularización pulpar resulta útil en el tratamiento de pacientes juveniles después de lesiones dentales traumáticas y en algunos casos de infección e inflamación de tejidos blandos. Cuando hay una instrumentación excesiva en el ápice, puede conducir a la formación de tejido vascularizado similar a la pulpa, especialmente si las células papilares apicales residuales son viables, lo cual suele ser el caso en pacientes jóvenes. Sin embargo, en adultos, si estas células no están presentes o no son viables, posiblemente debido a la periodontitis apical, se observa una respuesta regenerativa atenuada. Esto conduce a la formación de tejido osificado avascular intracanal por el ligamento periodontal o las células de la médula ósea (Shimizu et al., 2013). En adultos, la gutapercha sigue siendo ampliamente utilizada como material de obturación radicular de referencia debido a estas consideraciones (Siddiqui et al., 2021).

La revascularización pulpar se refiere al restablecimiento de la vascularidad o angiogénesis en el conducto radicular. Este proceso implica la promoción del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en la zona afectada, lo que contribuye a la regeneración de los tejidos pulpaes en dientes afectados por necrosis pulpar o lesiones pulpaes. La regeneración pulpar no se produce de manera completa en ausencia de revascularización y es incompleta si no hay una repoblación de odontoblastos. La presencia de una capa odontoblástica que recubre la superficie dentinaria es esencial, al igual que la presencia de fibras nerviosas nociceptivas, simpáticas y parasimpáticas, fibroblastos intersticiales, y células madre que contribuyen a reponer las células en el tejido pulpar recién regenerado. La revascularización y la repoblación celular son aspectos clave para lograr una regeneración pulpar exitosa (Poojar et al., 2017).

Para que exista la posibilidad de regeneración de los tejidos pulpaes, es fundamental limpiar la lesión de cualquier presencia microbiana y atenuar eficientemente la pulpitis. Este enfoque ayuda a evitar la destrucción del tejido y facilita el reclutamiento y diferenciación de las células progenitoras mesenquimales hacia fenotipos de reparación. La primera batalla se centra en la eliminación de la presencia microbiana

en una lesión cariosa. Sin embargo, hay una segunda lucha igualmente crítica contra el entorno proinflamatorio en la pulpa creado por estos microbios. Este entorno no solo daña el tejido, sino que también interfiere con su capacidad de autorreparación. Ambos aspectos son esenciales para promover un ambiente propicio para la regeneración pulpar. Además es crucial esclarecer tanto los mecanismos celulares como los comportamientos citocompatibles de los andamios en los macrófagos, destacando la proliferación y morfología celular. Asimismo, resulta fundamental analizar el comportamiento molecular de estas células al evaluar el patrón de síntesis de citocinas en contacto con estos biomateriales. Comprender este comportamiento nos ofrece la posibilidad de integrar los componentes necesarios para el desarrollo de una terapia regenerativa. Esto, a su vez, nos permitiría iniciar ensayos preclínicos de una terapia concreta y efectiva (Colombo et al., 2014).

### **1.1.3 ingeniería de tejidos**

Cada año, millones de pacientes experimentan traumatismos, enfermedades o infecciones que resultan en la pérdida de tejidos, abarcando áreas como piel, huesos, nervios, cartílagos, hígado y vasos sanguíneos, entre otros (Sadler et al., 2017). Una opción para tratar lesiones que involucran la pérdida de tejidos es el uso de injertos que proporcionen soporte mecánico, biológico y químico a las células. Sin embargo, un problema común asociado con estos tratamientos es la colonización microbiana, a pesar del uso de antimicrobianos. El fracaso de estos tratamientos a veces se atribuye a la ineficacia en el control de la infección. El desafío de mantener un entorno libre de microbios es crucial para el éxito de los injertos y la regeneración de tejidos, y la resistencia antimicrobiana puede complicar aún más este aspecto en la práctica clínica (Afaneh et al., 2015).

En respuesta a las necesidades de abordar afecciones que involucran la pérdida de tejidos surge la ingeniería de tejidos. La idea central de la ingeniería de tejidos es desarrollar enfoques para reparar, reemplazar o regenerar tejidos dañados o perdidos.

Esta disciplina fue introducida por primera vez por Robert Langer y Joseph Vacanti en 1993 (Naahidi et al., 2017).

Este campo interdisciplinario tiene como objetivo el crear tejidos y órganos biomiméticos (Bell et al., 2016). Uno de los impactos potenciales más significativos de la ingeniería de tejidos es el reemplazo de tejidos y órganos. La capacidad para crear tejidos funcionales en el laboratorio ofrece la posibilidad de superar las limitaciones asociadas con la escasez de donantes y la posibilidad de rechazo del sistema inmunológico (Valdoz et al., 2021).

La regeneración de tejidos sigue estando guiada por tres factores fundamentales: la presencia de células, la existencia de andamios o estructuras de soporte, y la presencia de señales biológicas. Estos elementos trabajan en conjunto con el objetivo de restaurar las funciones de los tejidos u órganos afectados o enfermos. Las células proporcionan el componente biológico esencial, los andamios ofrecen soporte estructural y los bioseñales regulan el comportamiento y la función celular para lograr una regeneración eficaz. La interacción coordinada de estos tres factores es clave para el éxito de los enfoques de ingeniería de tejidos y regeneración (Valdoz et al., 2021)

Así, en ingeniería de tejidos, la regeneración se logrará si se proporciona un andamio estructural que le confiera propiedades mecánicas pero también, induciendo la migración de poblaciones celulares. Además, los biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos deben degradarse en un intervalo de tiempo comparable al crecimiento del tejido nuevo (Colombo et al., 2014). En consecuencia, los biomateriales dentales han pasado de estructuras bioinertes pasivas a materiales bioactivos que tienen como objetivo final devolver la forma y función a los tejidos orales ( Schmalz y Smith, 2014). A pesar de los avances, la regeneración del tejido oral es un desafío, ya que el órgano dental está formado por diferentes tejidos, al igual que el periodonto ya que hasta el momento no existe un tratamiento exitoso para inducir la regeneración completa del esmalte, la dentina y la pulpa (Ayala-Ham et al., 2021).

En la última década ha habido avances significativos en el campo de la ingeniería de tejidos, especialmente en la comprensión del proceso de neoangiogénesis, que es la formación de nuevos vasos sanguíneos. Este conocimiento se ha aplicado para mejorar la vascularización en tejidos de bioingeniería. La capacidad de suministrar sangre de manera efectiva a los tejidos es esencial para su supervivencia y función, y la neoangiogénesis es un componente crucial en la regeneración de tejidos. Estos avances han llevado a mejoras en la eficacia y la viabilidad de los tejidos creados en el laboratorio, acercando la ingeniería de tejidos a aplicaciones clínicas más efectivas y exitosas. (Ayala-Ham et al., 2021). Clasificándose en tres enfoques principales los cuales son; incorporación de factores de crecimiento, cocultivo de células progenitoras/diana con células endoteliales, este enfoque implica el cultivo simultáneo de células progenitoras, que tienen la capacidad de diferenciarse en células específicas del tejido que se quiere regenerar, junto con células endoteliales, que forman la capa interna de los vasos sanguíneos. Como tercer enfoque se encuentra la microfabricación de vasculatura o matrices descelularizadas (Valdoz et al., 2021).

#### **1.1.3.1 ANDAMIOS**

El diseño cuidadoso de andamios biofuncionales es esencial para crear un entorno óptimo que favorezca la regeneración de tejidos y la formación de estructuras funcionales. Estos andamios, o estructuras de soporte, actúan como entornos tridimensionales que proporcionan un marco físico para el crecimiento celular y guían la formación del tejido regenerado. Algunos aspectos clave del diseño de andamios biofuncionales incluyen:

Composición del Material: La selección del material del andamio es de suma importancia, debiendo ser biocompatible, experimentar una degradación controlada y proporcionar un entorno propicio para el crecimiento y diferenciación celular

**Arquitectura Tridimensional:** La estructura tridimensional del andamio debe imitar en la medida de lo posible la arquitectura del tejido nativo, incluyendo aspectos como porosidad, distribución de fibras y otros detalles estructurales

**Bioseñalización:** Se busca la integración de señales biológicas, tales como factores de crecimiento, péptidos o moléculas de adhesión celular, en el andamio para orientar y potenciar la adhesión, proliferación y diferenciación celular

**Biodegradabilidad:** El andamio debe tener la capacidad de degradarse de manera natural, permitiendo su reemplazo gradual por el tejido regenerado conforme avanza el proceso de regeneración

**Propiedades Mecánicas:** Las características mecánicas del andamio deben ser compatibles con las del tejido nativo, asegurando así la prevención de tensiones inapropiadas en el tejido en desarrollo

**Vascularización:** Es importante considerar la incorporación de estructuras vasculares o facilitar la angiogénesis con el objetivo de garantizar un suministro sanguíneo adecuado para el tejido regenerado (Siddiqui et al., 2021).

La ingeniería de tejidos que utiliza andamios tiene como objetivo principal la creación de una estructura sólida que pueda dirigir el crecimiento celular hacia la formación de órganos similares. Los andamios sólidos presentan diversas ventajas, ya que pueden personalizarse para influir en los patrones celulares y proporcionar señales bioquímicas de manera controlada en términos temporales y espaciales (Roth et al., 2021).

Es ampliamente reconocido que la ingeniería de tejidos basada en andamios contribuye significativamente a la mejora de la supervivencia y diferenciación celular (Valdoz et al., 2021). Numerosos estudios científicos han evidenciado que las propiedades físicas, composicionales y mecánicas de varios andamios de

biomateriales desempeñan un papel crucial al influir en las decisiones relacionadas con el destino de las células madre y la respuesta celular en general (Athirasala et al., 2018).

El andamio sirve como un marco estructural que facilita la adhesión e interacción celular. Incluye ligandos superficiales específicos, libera factores bioactivos a velocidades predeterminadas o reguladas por las células, y presenta propiedades mecánicas y velocidades de degradación ajustadas para respaldar la formación de un tejido particular (Siddiqui et al., 2021).

Estos andamios actúan como una base que respalda la actividad celular adecuada, incluida la facilitación de sistemas de señalización molecular y mecánica, con el objetivo de optimizar la regeneración de tejidos, sin causar efectos locales o sistémicos no deseados en el eventual hospedador (Naahidi et al., 2017).

Los andamios ofrecen adhesión celular y facilitan la proliferación celular, reproduciendo el microambiente presente en tejidos y órganos naturales (Bohl et al., 1998). En el ámbito de la ingeniería de tejido pulpar dental, es crucial que los andamios presenten un tiempo de fraguado rápido y ofrezcan un modelado y adaptación apropiados del conducto radicular (Cavalcanti et al., 2013).

En la actualidad, los hidrogeles se reconocen como los candidatos ideales para funcionar como andamios, gracias a sus características que imitan a la MEC, posibilitando la proliferación, vascularización y supervivencia de las células (Siddiqui et al., 2021).

### **1.1.3.2 HIDROGELES**

Los hidrogeles son una categoría de materiales poliméricos que se encuentran en un estado hidratado, con un contenido de agua igual o superior al 90% en peso (Naahidi



et al., 2017). Pueden originarse a partir de macrómeros poliméricos o de pequeñas moléculas que se auto ensamblan en estructuras más grandes (Jeffrey D. Hartgerink, Elia Beniash, 2001). La unión de estos materiales varía según la química de los precursores, pudiendo estar unidos por enlaces cruzados covalentes, no covalentes o físicos (Rosales & Anseth, 2016).

Estos materiales han sido utilizados desde la década de 1960, siendo los primeros tipos de polímeros desarrollados específicamente para su aplicación en el cuerpo humano. Han sido empleados en aplicaciones como lentes de contacto y lentes intraoculares, principalmente debido a su capacidad para no generar respuestas adversas del cuerpo y a su elevada permeabilidad al oxígeno (Naahidi et al., 2017).

En la actualidad, los hidrogeles se utilizan en aplicaciones clínicas, como por ejemplo, en el proceso de curación de heridas, también se emplean como estructuras para ofrecer un entorno tridimensional biomiméticos que favorece el crecimiento celular. Estos materiales pueden ser diseñados de manera sencilla para regular la adhesión celular, las respuestas moleculares, la integridad estructural, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad (Slaughter et al., 2009).

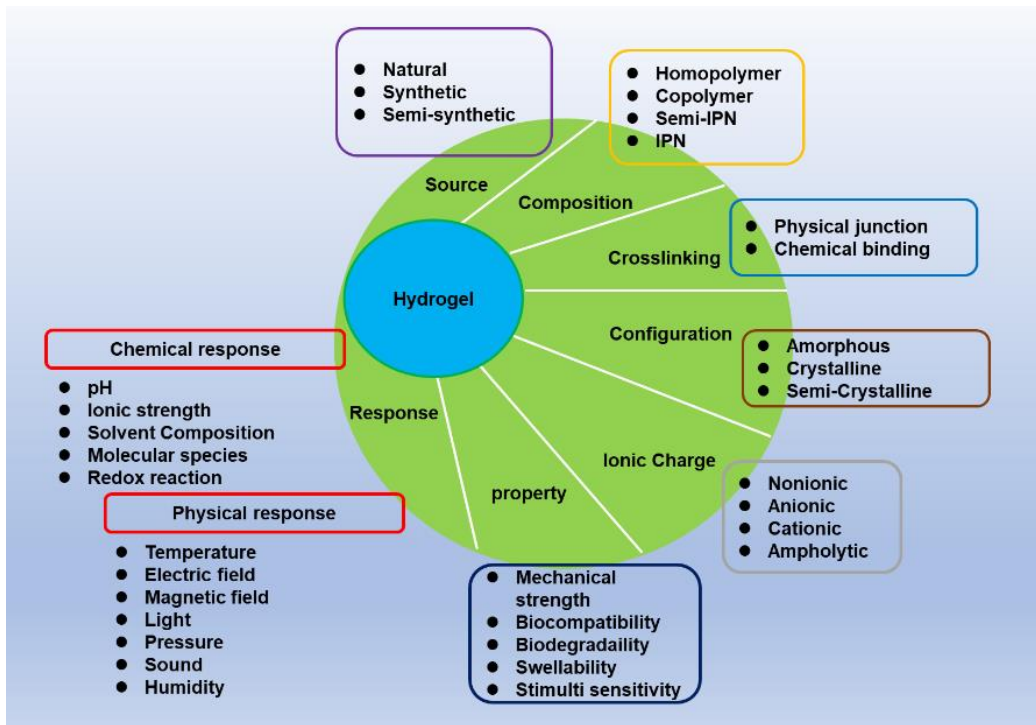
El andamio de hidrogel ideal imitará las propiedades de la matriz extracelular nativa, al mismo tiempo que facilitará la unión y migración de las células, entregará y retendrá células y factores bioquímicos, permitirá la difusión de nutrientes y productos (Slaughter et al., 2009). Además, ejercerá influencias mecánicas y biológicas que modificarán el comportamiento de las células (Naahidi et al., 2017).

Las características como el elevado contenido de agua, la porosidad y la sintonizabilidad mecánica intrínseca hacen que los hidrogeles sean especialmente atractivos como imitadores de la matriz extracelular. Además, existen diversas opciones químicas para funcionalizar los hidrogeles con ligandos bioactivos (Rosales & Anseth, 2016).

El propósito de la ingeniería de tejidos es crear una estructura que emule una matriz extracelular *in vivo* para favorecer la regeneración de tejidos. Los hidrogeles han suscitado un gran interés en la ingeniería de tejidos gracias a su resistencia mecánica, biocompatibilidad, biodegradabilidad y similitud con la matriz extracelular presente *in vivo* (Naahidi et al., 2017).

En comparación con las formas de lámina o polvo, la forma de hidrogel presenta ventajas notables, ya que puede adaptarse a defectos con formas irregulares y aplicarse mediante métodos mínimamente invasivos (Spang & Christman, 2018)

Los hidrogeles se pueden clasificar según el origen del material del cual se elaboraron. Se han propuesto diversas clasificaciones para los hidrogeles, considerando aspectos como su origen, durabilidad, respuesta a estímulos ambientales, carga, estructura o composición (Naahidi et al., 2017) (figura 1).



**Figura 1.** Clasificación de los hidrogeles dependiendo, por ejemplo, de su fuente de origen, composición y carga iónica (Naahidi et al., 2017).

#### **1.1.3.2.1 Hidrogeles de origen sintéticos**

Los polímeros sintéticos proporcionan a los ingenieros de materiales una versatilidad notable, ya que sus propiedades físicas y químicas pueden controlarse y modificarse con facilidad. Una de esas propiedades es la degradabilidad, que puede ser modificada mediante la creación de copolímeros o mezclas de polímeros (Rosales & Anseth, 2016). Estos polímeros y mezclas suelen ser más fáciles de procesar que los polímeros naturales y ofrecen resultados más predecibles. Sin embargo, los polímeros sintéticos tienden a ser menos biocompatibles que sus contrapartes naturales y no poseen la misma capacidad bioactiva (Naahidi et al., 2017).

#### **1.1.3.2.2 Hidrogeles de origen natural**

Los andamios de origen natural, como la matriz extracelular descelularizada, el colágeno, el quitosano, la elastina, los alginatos, el ácido hialurónico, el pululano y la fibrina, son derivados de organismos vivos y presentan excelentes propiedades de biocompatibilidad con baja citotoxicidad. Estos compuestos, según su concentración y pureza, no suelen provocar una respuesta inflamatoria crónica (Sell et al., 2010). A pesar de estas ventajas, estos polímeros enfrentan desafíos como la variabilidad entre lotes, un procesamiento complicado y un control deficiente sobre las propiedades del material (Hutmacher, 2000). Los métodos empleados para controlar la resistencia del material, la tasa de degradación o reducir la respuesta inmune, generalmente pueden llevar a que el material del andamio se vuelva menos biocompatible (Naahidi et al., 2017).

Los hidrogeles han emergido como una plataforma valiosa para replicar aspectos fundamentales de la matriz extracelular nativa y para proporcionar señales espaciotemporalmente precisas que modelan el fenotipo celular (Rosales & Anseth, 2016).

En la categoría de hidrogeles naturales, se encuentran aquellos basados en MEC que pueden obtenerse de diversos tejidos como el páncreas, la piel, el hueso, el intestino

delgado, el hígado y la vejiga urinaria, entre otros (Saldin et al., 2017). En este contexto, los andamios de hidrogel de MEC se consideran una alternativa gracias a su capacidad para adaptarse a espacios de forma irregular y su ventaja de ser inyectables, facilitando así el acceso a áreas con intervenciones quirúrgicas mínimas (Jiménez-Gastélum et al., 2023)

#### **1.1.4 MEC**

La MEC es una estructura tridimensional reticular que se secreta y mantiene por las células. Se considera el componente no celular de tejidos y órganos, y cumple un papel fundamental en proporcionar soporte estructural, regular la señalización celular y facilitar procesos como la adhesión celular, migración y diferenciación, siendo un elemento crucial para la integridad estructural y funcional de los tejidos en el cuerpo (Nguyen et al., 2022).

La MEC se puede dividir en dos categorías principales: la membrana basal (MB) y la matriz Intersticial (MI). La MB constituye una capa de MEC que está en contacto con todo el epitelio y endotelio, sirviendo como separación entre los tejidos dentro del cuerpo (Frantz et al., 2010). Mientras la Matriz Intersticial (MI) engloba todas las demás componentes de la MEC ubicadas entre las células de los tejidos (Nguyen et al., 2022). Esta distinción proporciona una comprensión estructural importante de la MEC y destaca las funciones específicas de estas dos categorías en la regulación de procesos celulares y el mantenimiento de la homeostasis tisular (Valdoz et al., 2021).

La MEC está compuesta por diversas macromoléculas, entre las que se incluyen el colágeno, las glicoproteínas y los glicosaminoglicanos. Estos elementos no solo forman un andamio físico para la adhesión celular, sino que también desempeñan un papel crucial en la regulación de procesos celulares como la proliferación, migración y diferenciación celular (Nguyen et al., 2022).

La MEC desempeña un papel crucial en el anclaje celular, actuando como un andamio sobre el cual las células pueden construirse y funcionar. La microestructura porosa y fibrosa de la MEC facilita que las células obtengan nutrientes en áreas donde, de otra manera, estarían demasiado densamente empaquetadas para permitir el flujo molecular y de fluidos (Henke et al., 2020). Además, la MEC posibilita el anclaje celular a través de estructuras especializadas adherentes a las células. Las proteínas como integrinas, selectinas y cadherinas son utilizadas por las células para unirse a componentes de la MEC, como fibronectina y laminina. La fibronectina, en particular, juega un papel destacado en la regulación de la unión celular a la MEC. Cuando la fibronectina se estira, se exponen varios sitios de unión de integrinas, lo que desencadena una cascada de eventos de adhesión y alineación celular. Las lamininas también contribuyen al anclaje celular, ya que estas proteínas tienen sitios de unión a integrinas y se sabe que se unen a glicanos asociados con el citoesqueleto (Valdoz et al., 2021).

Otra de las funciones cruciales que desempeña la MEC es el control de la supervivencia y muerte celular. De hecho, muchos tipos de células experimentan apoptosis cuando se les priva de su conexión con la MEC, un fenómeno conocido como "anoikis" (Valdoz et al., 2021).

Los hidrogeles bioinertes, por sí solos, ofrecen simplemente un andamiaje celular, cumpliendo claramente solo una función de la MEC. Sin embargo, al incorporar ciertos péptidos en hidrogeles porosos, se puede crear un entorno que permita a las células recibir otros componentes endógenos presentes en la MEC. Por ejemplo, las células necesitan adherirse a un sustrato adhesivo para sobrevivir; la falta de esta unión puede llevar a las células a experimentar anoikis (Valdoz et al., 2021). La ECM representa el andamio de la naturaleza para el desarrollo y la reparación de tejidos (Tanaka, 2002).

#### **1.1.4.1 Hidrogel de MEC**

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa han incorporado la MEC como un instrumento para administrar células y como un agente regenerativo bioactivo. Con este propósito, se ha explorado una diversidad de MEC en el ámbito de la ingeniería de tejidos cardíacos y la medicina regenerativa, con resultados que muestran variabilidad en términos de éxito. Por lo general, el hidrogel a base de MEC naturales se elaboran a partir de órganos o tejidos descelularizados y se procesan en láminas o hidrogeles inyectables (Spinali & Schmuck, 2018).

Los bioandamios derivados de MEC descelularizada son materiales de origen natural que han demostrado con éxito promover la remodelación positiva de tejidos en diversos tejidos y órganos, abarcando tejidos epiteliales, conectivos, musculares y, más recientemente, tejidos del sistema nervioso. La MEC representa el microambiente único compuesto por proteínas y polisacáridos secretados por las células residentes en cada tejido, definiendo la identidad y función celular, y en última instancia, del tejido en sí (Faust et al., 2017).

La principal limitación asociada con la MEC descelularizada radica en el tiempo requerido para su fabricación y en la necesidad de incorporar proteínas agresivas para la digestión. A pesar de estas desventajas, estos andamios son extensamente empleados en diversas aplicaciones dentro del campo de la ingeniería de tejidos (Saldin et al., 2017).

Los bioandamios elaborados a partir de MEC han demostrado un notable éxito al modificar la respuesta de curación natural después de una lesión, fomentando la remodelación positiva del tejido. Este éxito se ha observado tanto en entornos preclínicos como clínicos, abarcando diversos tejidos y órganos en todo el cuerpo (Faust et al., 2017).

#### **1.1.4.2 hUBM**

Las matrices de tejido xenogénico descelularizado son una alternativa al tejido alogénico autólogo o acelular debido a su facilidad de recolección y baja inmunogenicidad. Estos se han utilizado recientemente en aplicaciones quirúrgicas humanas, como aquellas que involucran la submucosa del intestino delgado, las válvulas cardiovasculares y la vejiga urinaria (LeCheminant & Field, 2012). Los hidrogeles derivados de una matriz tisular descelularizada han atraído la atención como biomaterial adecuado debido a las siguientes ventajas asociadas con su alta capacidad de sintonización: inyectabilidad para formar un hidrogel en el lugar, propiedades mecánicas regulables que pueden controlarse cambiando la concentración o reforzarse mediante reticulación; modificación sencilla que puede aumentarse con células, fármacos u otras moléculas bioactivas y buena procesabilidad que permite la fabricación de estructuras personalizadas mediante impresión tridimensional (Lin et al., 2000).

La matriz extracelular de vejiga urinaria (UBM) se obtiene de la capa más interna de la vejiga urinaria. Está compuesta principalmente por colágenos I y III, que son los principales constituyentes de la dermis nativa. Además, contiene proteínas que favorecen la adhesión celular, como laminina, fibronectina y colágeno IV. Estos componentes hacen que la UBM sea valiosa en aplicaciones de ingeniería de tejidos y regeneración, ya que proporciona un entorno biomimético que favorece la adhesión y el desarrollo celular (Allbritton-King et al., 2021).

La UBM se puede fabricar en diversas formas, como láminas para cubrir superficies, partículas para inyección en suspensión y como hidrogel. Estas formas versátiles la convierten en un reactivo prometedor para aplicaciones en el ámbito cardiovascular. La capacidad de adaptar la UBM a diferentes formatos permite su utilización en una variedad de contextos y aplicaciones dentro del campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, especialmente en el ámbito cardiovascular (Spinali & Schmuck, 2018).



La UBM se utiliza clínicamente para el tratamiento de heridas y el refuerzo de la reparación quirúrgica de tejidos blandos, entre otras aplicaciones. La UBM consta de la lámina propia y la lámina basal de la vejiga urinaria porcina y se descelulariza como parte del proceso de fabricación del dispositivo médico. La UBM se compone principalmente de colágeno I, pero también contiene una amplia variedad de colágenos fibrilares y de membrana basal, glicoproteínas, proteoglicanos y factores asociados a la MEC (Sadtler et al., 2017) La MEC derivada de la vejiga urinaria porcina (pUBM) demuestra mejorar la migración de células progenitoras específicas, integrándose completamente en las heridas y fomentando la formación de tejido apropiado para el sitio mediante el modelado constructivo, al tiempo que induce una respuesta antiinflamatoria paralela. Esto la convierte en un sustrato propicio para la unión, diferenciación y proliferación celular (Jiménez-Gastélum et al., 2023).

Se han encontrado diversos péptidos en la MEC los cuales desempeñan funciones importantes en la regulación de diversos procesos biológicos. Al ser la MEC un entorno tridimensional complejo compuesto por proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos la presencia de péptidos en este contexto contribuye a la regulación de diversas funciones celulares y procesos fisiológicos (Bucki et al., 2010). Algunos péptidos en la matriz extracelular actúan como señales celulares que regulan procesos como la diferenciación celular, la migración y la supervivencia celular, además, pueden influir en la respuesta inmunológica, regulando la actividad de células del sistema inmunológico presentes en la matriz extracelular. A su vez pueden participar en procesos de remodelación de la matriz extracelular, como la degradación y síntesis de componentes, lo que es esencial en eventos como la cicatrización de heridas (Lundy et al., 2020). Dentro de estos también tenemos a los péptidos antimicrobianos los cuales tienen propiedades antimicrobianas, ayudando a proteger el entorno extracelular contra patógenos.

### **1.1.5 Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son eficaces antibióticos del sistema inmunológico innato y han sido extensamente investigados como una posible solución al problema global de las enfermedades infecciosas causadas por microbios patógenos. Estas moléculas antimicrobianas tienen diversas aplicaciones terapéuticas, que van desde la curación de heridas hasta el tratamiento de varios tipos de cáncer e infecciones provocadas por virus, bacterias y hongos (Malik et al., 2016).

Los péptidos antimicrobianos inherentes a la pulpa dental juegan un papel fundamental en la erradicación de infecciones, la modulación del sistema inmunológico y el desencadenamiento de procesos reparativos y regenerativos. Por consiguiente, se plantea la posibilidad de aprovechar de manera terapéutica estos péptidos con el objetivo de gestionar infecciones y potenciar las terapias endodónticas regenerativas (Lundy et al., 2020).

Los péptidos antimicrobianos suelen focalizarse en la membrana de microorganismos, y se postula que su acción implica la creación de poros específicos o una modificación más amplia de la membrana, semejante a la acción de un detergente. Esta alteración provoca la fuga de contenido citoplasmático microbiano, resultando en la muerte celular en cuestión de minutos. Además, hay pruebas que sugieren que los péptidos antimicrobianos podrían inducir la muerte celular al inhibir la síntesis de ADN microbiano o de proteínas, o al interactuar con otros objetivos intracelulares (Lundy et al., 2020).

En la cavidad bucal, se identifican tres familias principales de péptidos antimicrobianos: defensinas, histatinas y catelicidinas. Las histatinas, caracterizadas por su abundancia de histidina, son péptidos helicoidales con una potente actividad antifúngica presentes

en la saliva humana, aunque no se detectan en la pulpa dental y no se abordarán en esta discusión. Por otro lado, las defensinas se dividen en dos familias, conocidas como alfa y beta-defensinas. Estas defensinas constan de seis residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro intramoleculares, y su clasificación se determina por la topología de la formación de estos puentes disulfuro (Egorikhina et al., 2023).

Las catelicidinas representan una familia de péptidos antimicrobianos presentes de manera natural en la saliva, el líquido crevicular gingival y la sangre. Estos péptidos exhiben capacidades antimicrobianas y antivirales, lo que los convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de medicamentos. Dada la naturaleza del entorno bucal, propicio para la rápida colonización de microorganismos, la amplia distribución de las catelicidinas se traduce en una eficaz acción contra estos agentes. Es importante señalar que los péptidos antimicrobianos pueden incluir variantes aniónicas, caracterizadas por su pequeño tamaño y contenido elevado de ácidos glutámicos y ácido aspártico. En contraste, los LL-37 en humanos son ejemplos de péptidos  $\alpha$ -helicoidales catiónicos y lineales (Nireeksha et al., 2021).

En el ámbito de la endodoncia, se estudian las catelicidinas debido a su capacidad para favorecer la cicatrización de heridas, su potencial inmunomodulador y su habilidad para estimular la producción de citocinas, así como para reclutar una respuesta inmunoinflamatoria en la pulpa y el periápice. Estos procesos se llevan a cabo mediante la regulación de la formación reparadora de dentina mediante la estimulación de los odontoblastos. Este enfoque destaca la relevancia terapéutica de estos péptidos, que demuestran ser agentes altamente eficaces contra patógenos virales, bacterianos y fúngico (Tokajuk et al., 2022).

Hasta la fecha, se han identificado más de 30 péptidos antimicrobianos (AMP) distintos en diversos compartimentos del cuerpo humano, entre los cuales destaca el péptido catelicidina (LL-37) (Bucki et al., 2010).

#### **1.1.5.1 Péptido LL37**

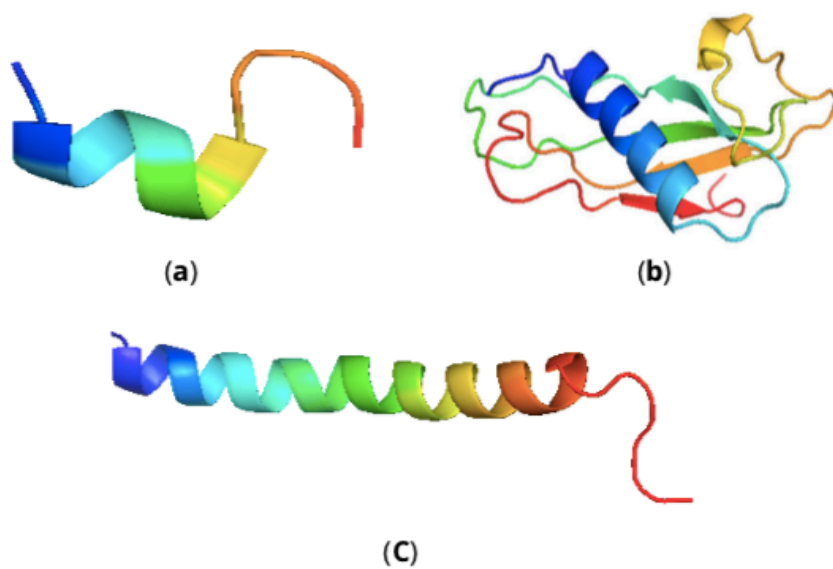
El péptido antimicrobiano LL-37 constituye el único miembro reconocido de la familia de péptidos de catelicidina expresado en humanos. Esta molécula multifuncional desempeña un papel esencial en las respuestas inmunitarias normales frente a infecciones y lesiones tisulares. El péptido LL-37 muestra una notable capacidad para eliminar diversos microorganismos y prevenir los efectos inmunoestimuladores de moléculas presentes en la pared bacteriana, como el lipopolisacárido, ofreciendo así protección contra la endotoxemia letal. Además, se ha observado que LL-37 posee otras actividades, como función quimioatrayente, inhibición de la apoptosis de neutrófilos y estimulación de la angiogénesis, regeneración de tejidos y liberación de citocinas, como por ejemplo la interleucina 8 (IL-8) (Bucki et al., 2010).

El gen de la catelicidina humana es responsable de codificar el péptido LL-37. Este péptido se forma a partir de los últimos 37 residuos de aminoácidos del péptido antimicrobiano catiónico humano, específicamente del extremo C-terminal 18. LL-37, también conocido como hCAP-18, FALL-39, o péptido antimicrobiano catiónico

humano, exhibe una estructura lineal sin puentes disulfuro. Esta molécula se expresa de manera extensa en células epiteliales y diversos tipos de leucocitos, como los neutrófilos (Tokajuk et al., 2022)

LL-37 presenta una variedad de funciones biológicas, entre las cuales se incluye la inhibición de la actividad de los lipopolisacáridos y el aumento de la producción de citoquinas por parte de las células dendríticas. Además, exhibe actividad antimicrobiana. Este péptido también induce la migración de células humanas desde la pulpa dental hacia sitios específicos donde se encuentra presente LL-37, y estimula la migración de células mesenquimales indiferenciadas de rata, lo cual es crucial para procesos de reparación ósea. Además, LL-37 promueve la angiogénesis a través del aumento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), conduciendo a la formación de estructuras capilares (Milhan et al., 2017).

LL-37 también desempeña un papel importante en la formación de vasos sanguíneos y se ha demostrado que actúa como un valioso adyuvante inmunológico. Su capacidad para contribuir a la angiogénesis, respaldada por el aumento del VEGF, sugiere un papel clave en la promoción de la vascularización, un proceso esencial para el suministro de nutrientes y la reparación tisular (Yang et al., 2020). Además, LL-37 modula las respuestas inmunitarias celulares al estimular la producción de quimioquinas, especialmente de IL-8. Este efecto se observa en células mieloides y epiteliales y potencia las funciones de defensa del huésped de los neutrófilos en sitios inflamados e infectados.(Bucki et al., 2010) .



**Figura 2.** Estructura del péptido LL-37 en sus diferentes fragmentos. a) fragmento N-terminal, b) Cathelin como el dominio de las catelicidinas humanas, c) fragmento C-terminal de LL-37 (Nireeksha et al., 2021)

### 1.1.6 BIOCOMPATIBILIDAD

Entender la biocompatibilidad implica analizar los mecanismos químicos, bioquímicos, fisiológicos, físicos y otros que se activan cuando un biomaterial entra en contacto con las células del cuerpo. Además, es crucial comprender las ramificaciones de estas interacciones. Este conocimiento detallado es esencial para evaluar la idoneidad y la seguridad de los biomateriales en aplicaciones médicas, asegurando que se desarrollen materiales que sean compatibles y no desencadenen respuestas adversas del cuerpo (Naahidi et al., 2017).

En cuanto al uso de andamios acelulares, es crucial considerar que la exhaustividad de la descelularización desempeña un papel determinante en la capacidad de los materiales basados en MEC para inducir una respuesta antiinflamatoria por parte de los macrófagos y células T del huésped (Nguyen et al., 2022).

Dentro de los objetivos del uso de biomateriales en contextos *in vivo*, se incluyen la restauración del tejido con función apropiada y expresión fenotípica celular, la inhibición de las respuestas de macrófagos y células gigantes de cuerpos extraños que puedan degradar el material, la prevención de la formación de cicatrices que podrían afectar la función del biomaterial, y finalmente, la supresión de respuestas inmunes que podrían comprometer la funcionalidad del dispositivo (Naahidi et al., 2017)

Por lo general, tras la implantación de un biomaterial, el cuerpo responde con una serie de reacciones, tanto positivas como negativas. Estas respuestas incluyen interacciones con la sangre, como la hemólisis, formación de matriz provisional, inflamación temporal, cicatrización de heridas, regeneración de tejido de granulación, respuesta a cuerpo extraño y estrés oxidativo. Además, es importante destacar que los dispositivos diseñados con tejidos pueden generar una cápsula fibrosa que rodea el implante o se infiltra en el material poroso (Naahidi et al., 2017).

Una vez que las células han colonizado el andamio y han iniciado la producción de su propia MEC, es crucial que el hidrogel se degrade en subproductos biocompatibles que puedan ser fácilmente eliminados del cuerpo. El proceso de degradación no debe inducir una respuesta inmune o inflamatoria en el cuerpo. En el caso de polímeros sintéticos, los productos de degradación deben consistir en monómeros, oligómeros o fragmentos del polímero. Es importante tener en cuenta que en algunos casos, los fragmentos de polímero pueden afectar el comportamiento de las células y, en situaciones extremas, podrían ser citotóxicos, alterando el metabolismo celular o la respiración (Sadtlter et al., 2017).

Si los productos de degradación resultan ser proinflamatorios, el sistema inmunológico del huésped responderá generando una cantidad significativa de macrófagos y células gigantes de cuerpos extraños, lo cual podría comprometer la función prevista del material (Naahidi et al., 2017). Además, el andamio debe ser bioactivo para fomentar la unión celular e interactuar con las células de manera que regule su actividad de forma similar a como lo haría la MEC nativa. El biomaterial debe incorporar señales biológicas, como ligandos de adhesión y factores de crecimiento, para mejorar la regeneración del tejido. Por ejemplo, muchos materiales se han modificado con secuencias peptídicas RGD con el fin de mejorar la adhesión celular y también pueden contribuir a la selectividad celular, desencadenando respuestas celulares específicas (Hersel et al., 2003).

Las células del sistema inmunológico son las primeras en responder tanto a las lesiones como a la implantación de biomateriales. El microambiente inmunológico generado por un andamio influirá en la presencia de diversas citocinas y factores de crecimiento, los cuales pueden desempeñar un papel crucial en la diferenciación de las células madre y la regeneración de tejidos. Los materiales derivados de UBM se implantan clínicamente en áreas de lesión aguda (Sadtlter et al., 2017).



### **1.1.6.1 Macrófagos**

Los macrófagos son células distribuidas en el cuerpo humano y desempeñan un papel crucial en la inmunidad innata. Cuando se desencadenan reacciones inflamatorias debido a eventos como lesiones e infecciones, los monocitos circulantes abandonan el torrente sanguíneo y migran a los tejidos, donde se diferencian en macrófagos. Existen dos tipos principales de macrófagos: los macrófagos activados clásicamente (M1) y los macrófagos activados alternativamente (M2). Los macrófagos pueden cambiar entre un estado M1 proinflamatorio y un estado M2 remodelador de tejidos, y esta transición desempeña un papel fundamental en la regeneración de tejido (Gordon, 2007).

Cuando se implantan andamios de MEC en el cuerpo, desencadenan una respuesta inmunitaria innata por parte del huésped, especialmente la respuesta de los macrófagos, antes de que se produzcan los resultados de la remodelación constructiva. Después de la implantación, la MEC se degrada, liberando diversos elementos como péptidos quimioatrayentes, antimicrobianos, mitógenos, factores de crecimiento y vesículas extracelulares. Estas sustancias biogénicas ajustan el comportamiento de las células inmunitarias hacia un fenotipo antiinflamatorio regulador (Nguyen et al., 2022) .

Los macrófagos han sido reconocidos durante mucho tiempo como fagocitos con funciones proinflamatorias y citotóxicas. Sin embargo, en la actualidad se comprende que estas células también desempeñan funciones esenciales en la resolución de la inflamación, el desarrollo normal del tejido y en la regeneración epimórfica basada en blastema en especies como el ajolote. La respuesta de los macrófagos a los biomateriales se convierte en un indicador crítico del éxito o fracaso posterior en términos de los resultados clínicos. (Huleihel et al., 2018)

## 1.2 ANTECEDENTES

En 1987, se estableció formalmente la definición de biocompatibilidad como "la capacidad de un biomaterial para funcionar con una respuesta adecuada del huésped en la aplicación específica". Posteriormente, en 2010, Kohane y Langer proporcionaron una nueva perspectiva y redefinieron la biocompatibilidad como "una expresión de la benignidad de la relación entre un material y su entorno biológico" (Naahidi et al., 2017).

Un estudio de Badylak et al., indicaron que, en comparación con los autoinjertos celulares, los aloinjertos UBM promovieron la polarización de macrófagos antiinflamatorios y redujeron la respuesta fibrótica a los implantes de pared abdominal en ratas.(Allbritton-King et al., 2021).

Grönberg et al., realizaron ensayos clínicos donde un hidrogel de quitosano suplementado con el péptido LL-37 promovía la cicatrización de lesiones de tejidos profundos en un modelo de ratón ya que esta era segura y bien tolerada cuando se aplicaba a las úlceras venosas de la pierna (que no cicatrizaban). El principal desafío asociado con la administración de LL-37 es su rápida degradación en el entorno de la herida; por lo tanto, los tratamientos requieren dosis y frecuencias de dosificación mas altas para lograr el efecto terapéutico deseado (Yang et al., 2020).

Investigaciones como las de Boateng et al., han demostrado que los apósitos de hidrogel son una opción atractiva para su uso como sistemas de administración de fármacos de molécula pequeña. Los apósitos de hidrogel no solo proporcionan un entorno de curación húmedo para los tejidos lesionados locales *in vivo*, sino que también funcionan como un andamio similar a una matriz extracelular para el soporte celular mientras mantienen la actividad biológica de los polipéptidos de molécula pequeña cargados (Boateng & Catanzano, 2015).

Jiménez et al., analizaron la biocompatibilidad de hUBM el cual constaba demostró buena consistencia y ausencia de restos celulares. Los resultados de esos ensayos *in vitro* revelaron que hUBM promovía la proliferación celular y no era citotóxico en tres líneas celulares analizadas las cuales consistían en fibroblastos, macrófagos y células mesenquimales, además inducía la producción de citocinas proinflamatorias, por otro lado hUBM exhibía reclutamiento de células similares a fibroblastos, sin daño tisular ni inflamación (Jiménez-Gastélum et al., 2023).

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que la terapia de conducto conduce a la desvitalización permanente del diente haciéndolo más propenso a fallas estructurales, hay un creciente interés en proporcionar opciones superiores para la terapia endodóntica. Este interés busca ampliar de manera efectiva las herramientas disponibles en la odontología clínica. La búsqueda de impulsar la regeneración de la pulpa dental ha motivado la investigación de materiales bioactivos con el propósito de utilizarlos en la regeneración de la pulpa dental.

La regeneración tisular actualmente se basa en una variedad de materiales de origen biológico, siendo los hidrogeles, en particular los derivados de la matriz extracelular, los más ampliamente utilizados. Estos hidrogeles exhiben una capacidad mejorada de regeneración cuando se modifican con materiales inertes como nanopartículas y minerales, o cuando se les incorpora disfuncionalidad mediante la adición de células o productos derivados de las mismas, como citocinas, factores de crecimiento o péptidos específicos, entre ellos el péptido LL37.

Aunque estas características ofrecen un gran potencial, hay una propiedad esencial que debe estar presente en los hidrogeles para considerarlos como biomateriales ideales la cual es la biocompatibilidad, ya que el éxito de un biomaterial dependerá principalmente de la reacción del cuerpo humano al material, este no deberá desencadenar una respuesta inmunológica para considerarse biocompatible.

El objetivo de evaluar la biocompatibilidad de hUBM es para determinar que el biomaterial no presenta citotoxicidad y permite la proliferación celular *in vitro*.

## **HIPOTESIS**

El andamio de hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina biofuncionalizado con el péptido LL37 es biocompatible.

## **OBJETIVOS**

### **1.3 Objetivo general**

Analizar la biocompatibilidad del hidrogel de matriz extracelular de vejiga urinaria biofuncionalizado con el péptido LL37

### **1.4 Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto del hUBM-LL37 sobre la viabilidad celular *in vitro*.
2. Medir el efecto del hUBM-LL37 sobre la proliferación celular *in vitro*.
3. Determinar el efecto del hUBM-LL37 sobre la respuesta inflamatoria *in vitro*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.5 Lugar de obtención de la muestra**

Las muestras fueron recopiladas en el laboratorio de microbiología molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

### **1.6 Tipo de estudio**

*In vitro*, experimental, longitudinal, prospectivo.

### **1.7 Material biológico**

#### **1.7.1 Hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina**

El hidrogel utilizado fue suministrado por el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

#### **1.7.2 Línea celular**

Se emplearon cultivos celulares derivados de la colección ATCC (American Type Culture Collection), específicamente macrófagos RAW 264.7 (TIB-71™), para llevar a cabo las pruebas de biocompatibilidad incluyendo análisis de viabilidad celular, evaluación de la proliferación y evaluación de la inducción de procesos inflamatorios.. Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado (10% suero bovino fetal, 1% antibiótico-antimicótico) para su expansión, manteniéndolas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5% a 37 °C.

## **1.8 Metodología**

### **1.8.1 Biofuncionalización de hUBM**

Se sintetizó el hidrogel a partir de un pregel proporcionado por el laboratorio de microbiología molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, el cual fue biofuncionalizado con el péptido LL37 (tocris, 10 mg/ml), donde posteriormente, se realizó el ajuste de pH a 7.2 y se incubó a 37°C por 60 minutos para su gelificación. Se obtuvieron dos grupos experimentales hUBM, hUBM-LL37, un grupo de muerte máxima (ácido Clorhídrico y LPS) y como control negativo DMEM sin ningún estímulo para las pruebas de biocompatibilidad realizadas.

### **1.8.2 Evaluación de la morfología celular**

Se evaluó la morfología celular mediante el uso de hemocolorante rápido y tinción de Hematoxilina y Eosina (HyE). Se cultivaron macrófagos raw 264.7 en caja de 24 pocillos las cuales contienen cubreobjetos redondos de 22 mm de diámetro para posteriormente evaluar la morfología celular a 24, 48 y 72 horas siguiendo la metodología de la tinción de hemocolorante rápido HYCEL® cat. 548 siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **1.8.3 Análisis de citotoxicidad mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH)**

Se sembraron  $20 \times 10^3$  células RAW 264.7 en placas de 96 pocillos para realizar ensayos independientes. Después de un período de 24 horas de adherencia, se aplicaron los estímulos utilizando medios condicionados de hUBM (15mg/mL), el hUBM-LL37 (10ng/mL), DMEM (control negativo) y ácido Clorhídrico (control positivo).



Se llevó a cabo el ensayo de lactato deshidrogenasa a 24 horas de exposición utilizando el kit comercial CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (PROMEGA G1780), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las absorbancias fueron medidas en un lector de placas (Elisa Microplate Reader MCL-2100C) en un rango de fondo a 690 nm, restando la medida de la longitud de onda primaria (490 nm)

El porcentaje de muerte celular (% de citotoxicidad) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = \frac{\text{Liberacion experimental de LDH (OD 490)}}{\text{Liberacion maxima de LDH (OD 490)}}$$

#### **1.8.4 Análisis de la proliferación celular mediante el ensayo de tetrazolio (MTT)**

En placas de 96 pocillos, se cultivaron  $15 \times 10^3$  células RAW 264.7 en ensayos independientes. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa para permitir una adherencia firme. Posteriormente, se aplicaron estímulos mediante medios condicionados de hUBM (15mg/mL) y del hidrogel biofuncionalizado con LL-37 (10ng/mL) DMEM (control negativo). Se utilizó el kit comercial Cell Proliferation Kit I (Sigma Aldrich 11465007001), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, las lecturas se realizaron en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm, con sustracción de 630 nm.

#### **1.8.5 Evaluación de citocinas proinflamatorias mediante el ensayo de perlas citométricas**

Se cultivaron macrófagos RAW 264.7 en placas de cultivo de 24 pocillos, con una concentración celular de  $10 \times 10^4$  por pocillo. Cuando alcanzaron el 80% de confluencia, se aplicó un estímulo durante 24 horas utilizando los medios condicionados de los siguientes grupos: hUBM, hUBM-LL37, DMEM como control positivo y LPS (*salmonella typhimurium*). Después de este período, se recuperaron los

sobrenadantes de los cultivos y se evaluó la expresión de citocinas en los sobrenadantes midiendo en estos las concentraciones de IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1 y TNF- $\alpha$ , utilizando una microesfera. se procesaron las muestras utilizando el Kit BD Cytometric Bead Array CBA Mouse Inflammation (Biosciences 552364), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

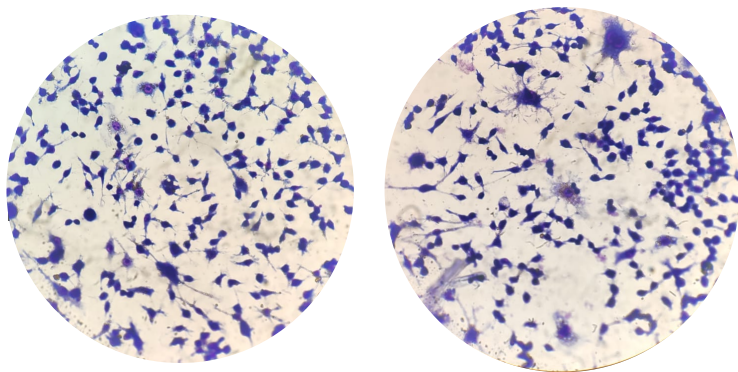
Las muestras de los sobrenadantes de los cultivos fueron adquiridas en un citómetro de flujo (Accuri C6 BD Biosystem). Para PE se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm, y se recolectó la emisión a una longitud de onda de 585 nm. Para PerCP se empleó una longitud de onda de excitación de 600 nm, y se recolectó la emisión a una longitud de onda de 675 nm. El análisis de las muestras se llevó a cabo utilizando el software FlowJo™ v10.

#### **1.8.6 Análisis estadístico**

Se llevaron a cabo los experimentos por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  desviación estándar (SD). Se empleó la prueba de T de Student para comparar las diferencias entre los promedios de dos grupos, y ANOVA se utilizó para comparar las diferencias entre los promedios de más de dos grupos, seguida de la prueba de Dunnet para comparar los resultados con respecto al grupo control. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

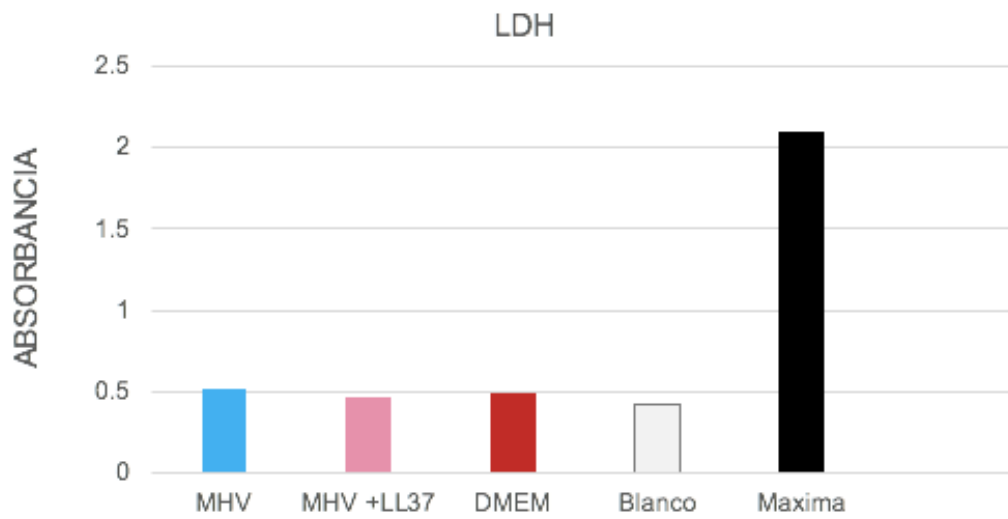
### 1.9 EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR



**Figura 3** . Análisis de la morfología celular teñidas con hemocolorante rápido. Imágenes capturadas a 10x en campo claro, se aplicó la tinción de hemocolorante rápido después de la estimulación con medios condicionados. Se observó una buena adherencia en el grupo de DMEM, similar al grupo experimental de hUBM-LL37.

### **1.10 Resultados de la prueba de citotoxicidad (ldh)**

La evaluación de la citotoxicidad se llevó a cabo mediante la prueba de lactato deshidrogenasa, en la cual se midió la liberación de esta enzima presente en el citosol de las células, se libera al medio extracelular en mayor medida cuando se produce daño en la membrana celular, sugiriendo posiblemente la muerte o lisis celular. La prueba se llevó a cabo en un único intervalo de exposición, siendo este a las 24 horas. Al finalizar la prueba observamos valores de absorbancia para el grupo experimental y control sin diferencias estadísticamente significativas ( $0.4706 \pm 0.05$  vs  $0.496 \pm 0.04$ ,  $p=0.702$ ), La exposición de los macrófagos ( $M\phi$ ) a los extractos de hUBM y hUBM-LL37 no resultó en una liberación de LDH significativamente diferente en comparación con el grupo de control (DMEM). Sin embargo, al realizar el análisis de control de muerte máxima, se observaron diferencias estadísticas significativas, por lo cual podemos asumir que tanto el hUBM y el hUBM-LL37 presentan poca citotoxicidad sobre macrófagos, siendo biocompatibles. (figura 4)

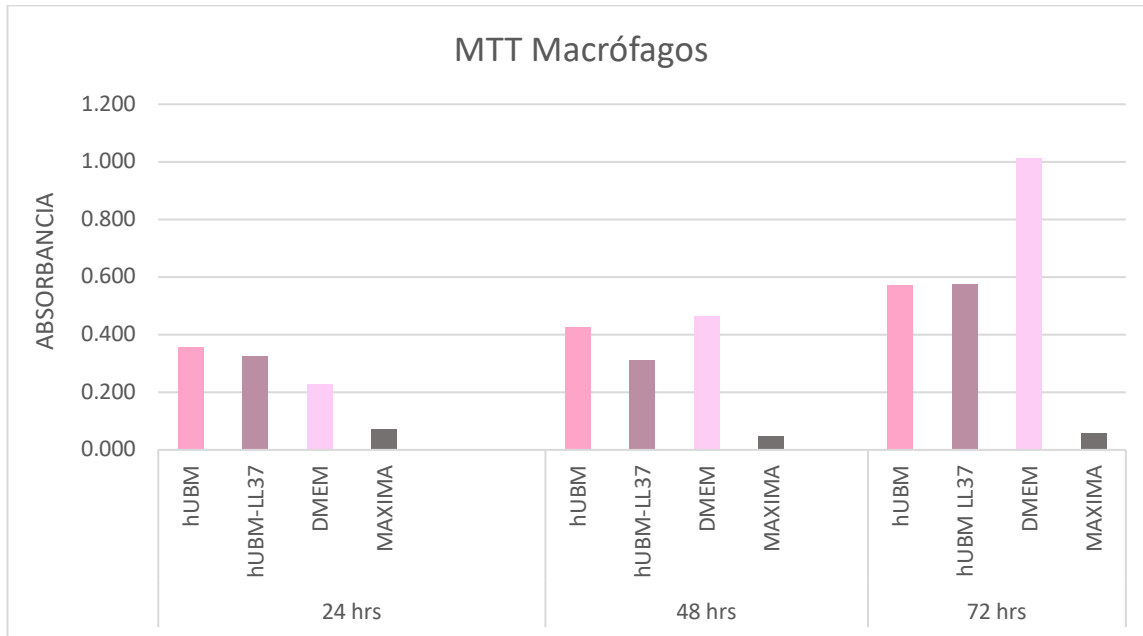


**Figura 4.** Ensayo de citotoxicidad en macrófagos. Mortalidad celular expresada en liberación de lactato deshidrogenasa en los diferentes hidrogeles con sus respectivos controles. La lectura de extracción se hizo a 690 nm de longitud de onda, mostrando resultados estadísticamente no significativos de nuestros grupos experimentales respecto al control ( $0.4706 \pm 0.05$  vs  $0.496 \pm 0.04$ ,  $p=0.702$ ).

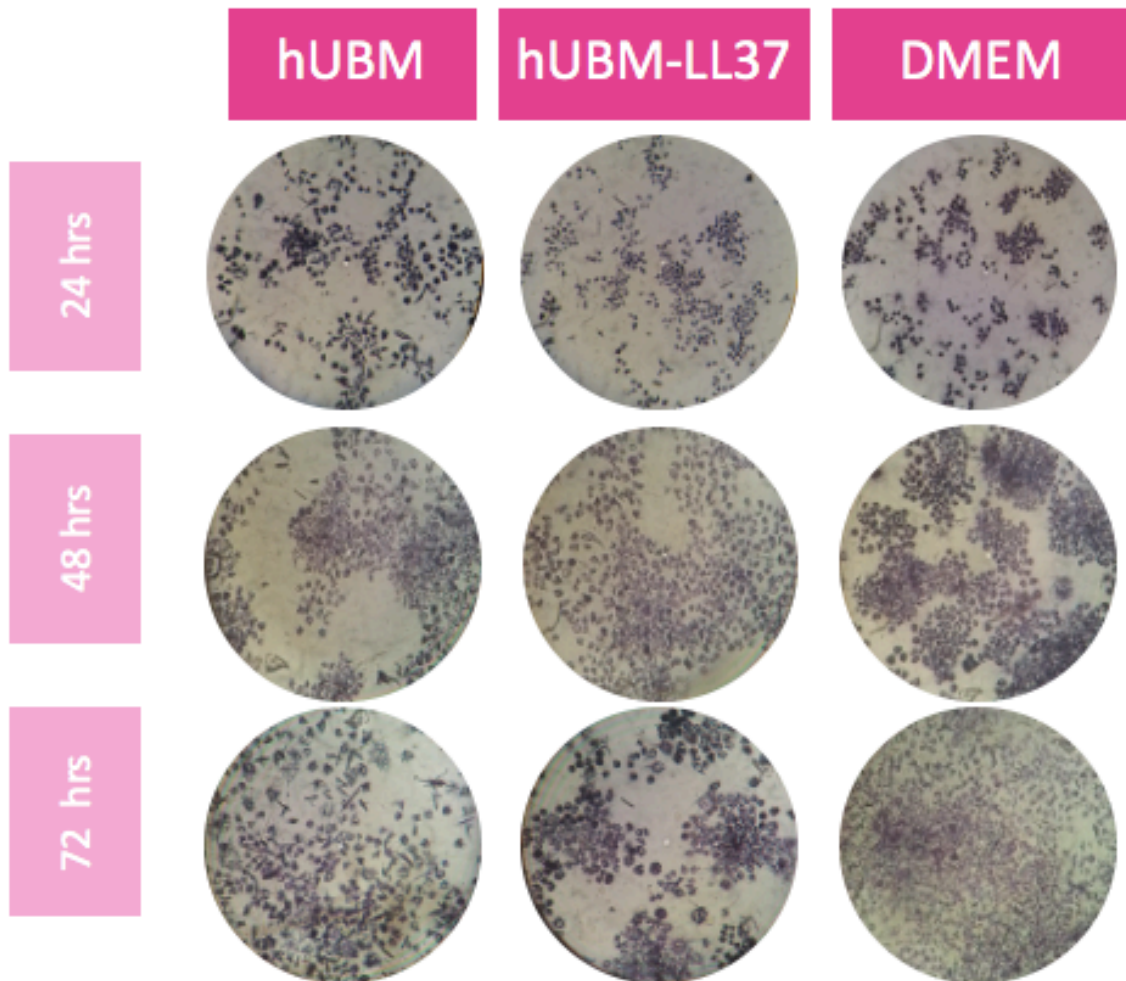
### **1.11 Resultados de la proliferación celular mediante el ensayo de tetrazolio (MTT)**

Se evaluaron los efectos de los hidrogeles, tanto hUBM como hUBM-LL37 sobre macrófagos a través del ensayo de MTT a 24, 48 y 72 horas. La observación de las células se llevó a cabo en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 40X, con especial atención a la producción de formazan. Las células mostraron actividad metabólica a partir de las 24 horas en contacto con los estímulos, notándose un crecimiento exponencial y una confluencia exponencial del 95% en los pozos que contenían los grupos experimentales y el grupo control DMEM, sin embargo se observó una disminución de la proliferación a las 72 horas. (figura 6)

El análisis de proliferación mostró que el material de prueba no interfiere con el crecimiento celular de los macrófagos a ningún día de estudio correspondientes a 0, 24, 48 y 72 h ( $0.323 \pm 0.08$  vs  $0.228 \pm 0.02$ ,  $p=0.005$ ;  $0.310 \pm 0.01$  vs  $0.465 \pm 0.04$ ,  $p=0.000$ ;  $0.564 \pm 0.03$  vs  $1.011 \pm 0.06$ ,  $p=0.001$ , respectivamente). Esto es importante para asegurar la bioseguridad del producto *in vivo*. (figura 5)



**Figura 5** Ensayo de proliferación en macrófagos. Para evaluar la proliferación celular se realizó el ensayo de MTT para detectar la formación de cristales de formazan de RAW 264.7 en contacto con los medios condicionados. Tanto en los grupos experimentales como en el grupo DMEM se mostraron un crecimiento exponencial desde las 24 horas, sin embargo, no hubo datos estadísticamente significativos entre los grupos en ninguno de los tiempos evaluados (24 horas;  $0.323 \pm 0.08$  vs  $0.228 \pm 0.02$ ,  $p=0.005$ ; 48 horas;  $0.310 \pm 0.01$  vs  $0.465 \pm 0.04$ ,  $p=0.000$ ; 72 horas:  $0.564 \pm 0.03$  vs  $1.011 \pm 0.06$ ,  $p=0.001$ ).

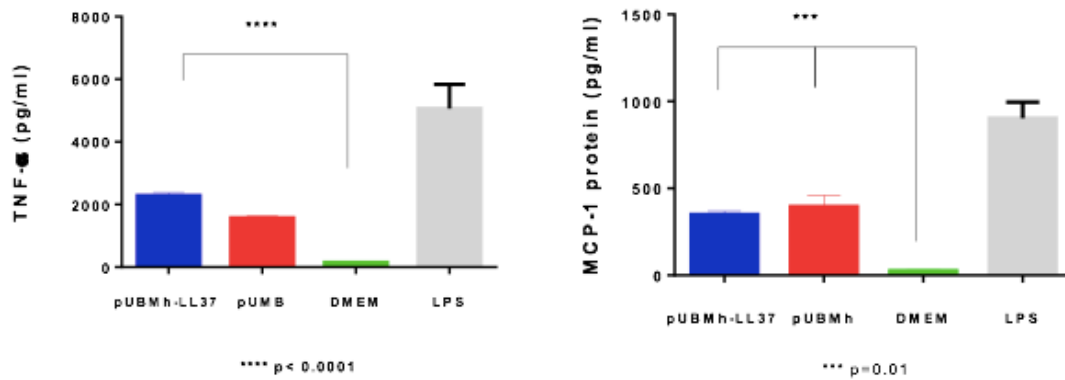


**Figura 6** Macrófagos ensayo MTT. Microfotografía a 40X de RAW 264.7 a 24,48 y 72 horas. Posterior a la incubación con MTT se observan abundantes cristales de formazan en todos los grupos a partir de las 24 horas, observándose una mayor concentración de cristales a las 48 horas en todos los grupos respecto a los demás tiempos.



### **1.12 Resultados de citocinas proinflamatorias mediante el ensayo de perlas citométricas**

La exposición por 24 h de macrófagos con el hUBM-LL37, ocasionó un incremento significativo en la expresión de las citocinas MCP-1 ( $493.96 \pm 49.25$  vs  $51.67 \pm 24.21$ ,  $p=0.000$ ) y TNF-alfa ( $1283.22 \pm 96.35$  vs  $247.37 \pm 18.91$ ,  $p=0.000$ ) con respecto al grupo control. Esto es relevante dado que la inflamación es un proceso necesario en cualquier tipo de regeneración tisular, incluyendo la vasculogénesis, y tanto el TNF-alfa como la MCP-1 son citocinas proinflamatorias. (Figura 7)



**Figura 7.** Ensayo de citocinas proinflamatorias. En el ensayo de perlas citométricas se evaluó el panel de citocinas proinflamatorias mostrando un aumento de las citocinas TNF- a y MCP-1 para nuestros grupos experimentales respecto al grupo control (DMEM) para TNF-a ( $1283.22 \pm 96.35$  vs  $247.37 \pm 18.91$ ,  $p=0.000$ ) mientras que para MCP-1 ( $493.96 \pm 49.25$  vs  $51.67 \pm 24.21$ ,  $p=0.000$ ) en macrófagos al estar expuestos con extractos solubles de hUBM-LL37 y hUBM a 24 horas de exposición.

## DISCUSIÓN

Los biomateriales utilizados clínicamente se diseñaron históricamente en el contexto de una respuesta del sistema inmunológico a un cuerpo extraño. La respuesta al cuerpo extraño, ampliamente caracterizada por James Anderson en la década de 1980, describió la infiltración inmune por neutrófilos y macrófagos que resulta en oxidación y degradación del biomaterial, formación de células gigantes de cuerpo extraño, inflamación que daña los tejidos y encapsulación fibrosa (Leleux & Roy, 2013). Los macrófagos son células fagocíticas clave del sistema inmunológico y están implicados en la respuesta a la presencia de materiales extraños en el cuerpo. Al incluir macrófagos en las pruebas de biocompatibilidad en nuestro estudio, se simula de manera más precisa la respuesta inmunológica que ocurriría *in vivo*. Obtener resultados favorables en términos de biocompatibilidad para un andamio de hUBM sugiere que dicho andamio es bien tolerado por el cuerpo y puede proporcionar un entorno propicio para la regeneración tisular.

Rosario et. Al. 2008, realizaron la evaluación de la biocompatibilidad de UBM. En ese experimento, la UBM se combinó con células uroteliales y células estromales durante periodos de 7 y 14 días. En el transcurso de las pruebas, no se detectó evidencia de citotoxicidad. En cambio, se observó una mejora en la proliferación de las células estromales cuando se expusieron al extracto de UBM en cultivo, indicando la persistencia de factores de crecimiento. Después de 14 días, las células estromales lograron infiltrarse en la matriz, y se evidenció una proliferación significativa de las células uroteliales (Rosario et al., 2008). En nuestra investigación, al llevar a cabo la prueba de MTT, se observó la formación de cristales de formazan en todos los grupos a partir de las 24 horas. Sin embargo, se destacó una notable intensificación en la concentración de cristales a las 48 horas, mostrando un aumento exponencial. Este fenómeno puede interpretarse como un indicador de una mayor viabilidad o actividad metabólica de las células en estudio, en este caso, las células RAW 264.7.

Las evaluaciones actuales de la composición de la UBM han demostrado que está compuesta principalmente de colágenos, intercalados con proteoglicanos, factores de crecimiento secuestrados en la MEC y citocinas (Sadtler et al., 2017). En nuestro estudio, a las 24 horas de exposición, se observó una expresión significativa de citocinas MCP-1 y TNF- $\alpha$ . Este hallazgo podría tener implicaciones importantes en procesos biológicos como la inflamación y la respuesta inmune. La detección de estas citocinas sugiere la posibilidad de una respuesta inflamatoria activada, ya que MCP-1 y TNF- $\alpha$  suelen estar asociados con procesos inflamatorios y el reclutamiento de células del sistema inmunológico. A partir de esta observación, se podría asumir que hUBM promueve la liberación de citocinas proinflamatorias, lo cual podría indicar el inicio de un proceso regenerativo. Este fenómeno es relevante ya que la respuesta inflamatoria controlada es a menudo un precursor necesario para la regeneración tisular y la cicatrización. Estos datos concuerdan con lo reportado con López-Gutiérrez et al., debido a que ellos encontraron una sobreexpresión de citocinas tanto de MCP-1 y TNF-  $\alpha$  sugiriendo que el andamio utilizado en estos ensayos induce vías angiogénicas y proangiogénicas involucradas en estados iniciales de la inflamación no patológica (López-gutierrez et al., 2023).

Vicensoto et al. 2017 evaluaron la biocompatibilidad de 5 y 10 ug/mL LL-37 de manera *in vitro* y su efecto sobre la diferenciación de las células madre de la pulpa dental humana a través de ensayos de viabilidad celular, en donde los resultados fueron que no fueron citotóxicos y generalmente aumentaron la viabilidad celular, especialmente al tercer día. Lo que indica que este péptido contribuye a la diferenciación celular (Milhan et al., 2017). En nuestro caso, la concentración utilizada de LL-37 fue de 10 ug/mL, y observamos una mayor proliferación y viabilidad celular al tercer día de exposición. Este resultado sugiere que la concentración específica de LL-37 aplicada en nuestro estudio ha tenido un impacto positivo en la proliferación celular y la capacidad de supervivencia, indicando una respuesta beneficiosa de las células al péptido antimicrobiano.

## CONCLUSIÓN

La interpretación de los resultados del estudio sobre hUBM y hUBM-LL37 indican que el biomaterial empleado como andamio es biocompatible por tres razones, la primera es que proporcionó un entorno que favorable para la adhesión, proliferación y la diferenciación celular, logrando una población celular viable, como segunda encontramos ausencia de toxicidad generando una respuesta inflamatoria poco excesiva, el cual no causó inflamación crónica ni activación prolongada del sistema inmunológico, como tercera favorece a la cicatrización y regeneración tisular mediante la producción de citocinas proinflamatorias como MCP-1 y TNF-  $\alpha$ , las cuales ayudaran al reclutamiento celular para la reparación de heridas, generando un nuevo panorama sobre los tratamientos en pulpas necróticas, devolviendo la vitalidad del diente.

Aunque es crucial continuar con la investigación *in vivo* de estos hidrogeles, los resultados obtenidos en este estudio señalan propiedades prometedoras que sugieren su potencial aplicación en procedimientos de revascularización.

## **PERSPECTIVAS**

Continuar con el enfoque de esta línea de investigación de una forma *in vivo* en algún modelo animal, acercaría cada vez más la posibilidad de regenerar el tejido de la pulpa dental en humanos, lo cual beneficiaría tanto a estudiantes del posgrado como a los pacientes de nuestra sociedad, alargando el tiempo de vida de los dientes en cavidad oral.

## REFERENCIAS

- Afaneh, C., Abelson, J., Schattner, M., Janjigian, Y. Y., Ilson, D., Yoon, S. S., & Strong, V. E. (2015). Esophageal Reinforcement with an Extracellular Scaffold During Total Gastrectomy for Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 22(4), 1252–1257. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4125-4>
- Albuquerque, M. T. P., Valera, M. C., Nakashima, M., Nör, J. E., & Bottino, M. C. (2014). Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *Journal of Dental Research*, 93(12), 1222–1231. <https://doi.org/10.1177/0022034514549809>
- Allbritton-King, J. D., Kimicata, M., & Fisher, J. P. (2021). Incorporating a structural extracellular matrix gradient into a porcine urinary bladder matrix-based hydrogel dermal scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 109(10), 1893–1904. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37181>
- Athirasala, A., Tahayeri, A., Thirivikraman, G., Franca, C. M., Monteiro, N., Tran, V., Ferracane, J., & Bertassoni, L. E. (2018). A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry. *Biofabrication*, 10(2). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa9b4e>
- Ayala-Ham, A., López-Gutierrez, J., Bermúdez, M., Aguilar-Medina, M., Sarmiento-Sánchez, J. I., López-Camarillo, C., Sanchez-Schmitz, G., & Ramos-Payan, R. (2021). Hydrogel-Based Scaffolds in Oral Tissue Engineering . In *Frontiers in Materials* (Vol. 8).
- Baker, S. M., Sugars, R. V., Wendel, M., Smith, A. J., Waddington, R. J., Cooper, P. R., & Sloan, A. J. (2009). TGF- $\beta$ /Extracellular matrix interactions in dentin matrix: A role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calcified Tissue International*, 85(1), 66–74. <https://doi.org/10.1007/s00223-009-9248-4>
- Bell, C. C., Hendriks, D. F. G., Moro, S. M. L., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Fredriksson Puigvert, L., Dankers, A. C. A., Jacobs, F., Snoeys, J., Sison-Young, R. L., Jenkins, R. E., Nordling, Å., Mkrtchian, S., Park, B. K., Kitteringham, N. R., Goldring, C. E. P., Lauschke, V. M., & Ingelman-Sundberg, M. (2016). Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for

- drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep25187>
- Bertassoni, L. E. (2020). Progress and Challenges in Microengineering the Dental Pulp Vascular Microenvironment. *Journal of Endodontics*, 46(9), S90–S100. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.033>
- Boateng, J., & Catanzano, O. (2015). Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing — A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(11), 3653–3680. <https://doi.org/10.1002/jps.24610>
- Bohl, K. S., Shon, J., Rutherford, B., & Mooney, D. J. (1998). Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9(7), 749–764. <https://doi.org/10.1163/156856298X00127>
- Brännström, M., & Lind, P. O. (1965). Pulpal Response to Early Dental Caries. *Journal of Dental Research*, 44(5), 1045–1050. <https://doi.org/10.1177/00220345650440050701>
- Bucki, R., Leszczyńska, K., Namiot, A., & Sokołowski, W. (2010). Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 58(1), 15–25. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0057-2>
- Byers, M. R., & Närhi, M. V. O. (1999). Dental injury models: Experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 10(1), 4–39. <https://doi.org/10.1177/10454411990100010101>
- Cavalcanti, B. N., Zeitlin, B. D., & Nör, J. E. (2013). A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dental Materials*, 29(1), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.08.002>
- Colombo, J. S., Moore, A. N., Hartgerink, J. D., & D'Souza, R. N. (2014). Scaffolds to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *Journal of Endodontics*, 40(4 SUPPL.), S6–S12. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.019>
- Cveck, M. (1978). A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *Journal of Endodontics*, 4(8), 232–237.



- de Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70029-0](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70029-0)
- Diogenes, A., Ruparel, N. B., Shiloah, Y., & Hargreaves, K. M. (2016). Regenerative endodontics A way forward. *Journal of the American Dental Association*, 147(5), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2016.01.009>
- Egorikhina, M. N., Timofeeva, L. B., Linkova, D. D., Rubtsova, Y. P., Bugrova, M. L., Charykova, I. N., Ryabkov, M. G., Kobyakova, I. I., Farafontova, E. A., & Aleynik, D. Y. (2023). *Biocompatibility Study of Hydrogel Biopolymer Scaffold with Encapsulated Mesenchymal Stem Cells*.
- El Karim, I. A., Linden, G. J., Orr, D. F., & Lundy, F. T. (2008). Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. *Journal of Neuroimmunology*, 200(1–2), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.05.014>
- Faulk, D. M., Londono, R., Wolf, M. T., Ranallo, C. A., Carruthers, C. A., Wildemann, J. D., Dearth, C. L., & Badylak, S. F. (2014). ECM hydrogel coating mitigates the chronic inflammatory response to polypropylene mesh. *Biomaterials*, 35(30), 8585–8595. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.057>
- Faust, A., Kandakatla, A., van der Merwe, Y., Ren, T., Huleihel, L., Hussey, G., Naranjo, J. D., Johnson, S., Badylak, S., & Steketee, M. (2017). Urinary bladder extracellular matrix hydrogels and matrix-bound vesicles differentially regulate central nervous system neuron viability and axon growth and branching. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(9), 1277–1295. <https://doi.org/10.1177/0885328217698062>
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- Gordon, S. (2007). The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology*, 37(SUPPL. 1), 9–17. <https://doi.org/10.1002/eji.200737638>
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551–

1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>

- Hargreaves, K. M., Diogenes, A., & Teixeira, F. B. (2013). Treatment options: Biological basis of regenerative endodontic procedures. *Journal of Endodontics*, 39(3 SUPPL.), S30–S43. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.025>
- Harris, R., & Griffin, C. J. (1969). The fine structure of the mature odontoblasts and cell rich zone of the human dental pulp. *Australian Dental Journal*, 14(3), 168–177. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1969.tb03348.x>
- Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S. (2020). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(January), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00160>
- Hersel, U., Dahmen, C., & Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24(24), 4385–4415. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00343-0)
- Huleihel, L., Dziki, J. L., Bartolacci, J. G., Rausch, T., Michelle, E., Cramer, M. C., Vorobyov, T., Lopresti, S. T., Ilea, T., White, L. J., Brown, B. N., Badylak, S. F., & Sciences, R. (2018). *HHS Public Access*. 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.04.004.Macrophage>
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, 21, 175–189. <https://doi.org/10.1016/B978-008045154-1.50021-6>
- Jeffrey D. Hartgerink, Elia Beniash, S. I. S. (2001). *Self-Assembly and mineralization*. 294, 1684–1688.
- Jiménez-Gastélum, G., Ramos-Payán, R., López-Gutierrez, J., Ayala-Ham, A., Silva-Benítez, E., Bermúdez, M., Romero-Quintana, J. G., Sanchez-Schmitz, G., & Aguilar-Medina, M. (2023). An extracellular matrix hydrogel from porcine urinary bladder for tissue engineering: In vitro and in vivo analyses. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 34(4), 331–344. <https://doi.org/10.3233/BME-221450>
- Khurshid, Z., Warsi, I., Moin, S. F., Slowey, P. D., Latif, M., Zohaib, S., & Zafar, M. S. (2021). Biochemical analysis of oral fluids for disease detection. In *Advances in Clinical Chemistry* (1st ed., Vol. 100). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.04.005>

- LeCheminant, J., & Field, C. (2012). Porcine urinary bladder matrix: A retrospective study and establishment of protocol. *Journal of Wound Care*, 21(10), 476–482. <https://doi.org/10.12968/jowc.2012.21.10.476>
- Leleux, J., & Roy, K. (2013). Micro and Nanoparticle-Based Delivery Systems for Vaccine Immunotherapy: An Immunological and Materials Perspective. *Advanced Healthcare Materials*, 2(1), 72–94. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200268>
- LEVIN, L. G. (2003). Pulpal irritants. *Endodontic Topics*, 5(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00023.x>
- Lin et al. (2000). *F E B R U a R Y 2 0 0 0*. 127(2).
- López-gutierrez, J., Ramos-payán, R., & Romero-quintana, J. G. (2023). *Evaluation of biocompatibility and angiogenic potential of extracellular matrix hydrogel biofunctionalized with the LL-37 peptide un c o r r e c t e d p r o o f v e r s i o n c e d o v i o n*. 1, 1–16. <https://doi.org/10.3233/BME-230022>
- Lundy, F. T., Irwin, C. R., McLean, D. F., Linden, G. J., & El Karim, I. A. (2020). Natural Antimicrobials in the Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, 46(9), S2–S9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.021>
- Malik, E., Dennison, S. R., Harris, F., & Phoenix, D. A. (2016). pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/ph9040067>
- Milhan, N. V. M., de Barros, P. P., de Lima Zutin, E. A., de Oliveira, F. E., Camargo, C. H. R., & Camargo, S. E. A. (2017). The Antimicrobial Peptide LL-37 as a Possible Adjunct for the Proliferation and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Endodontics*, 43(12), 2048–2053. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.08.010>
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–5812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
- Murray, P. E., Garcia-Godoy, F., & Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative

- Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *Journal of Endodontics*, 33(4), 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.09.013>
- Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H., Dixon, B., & Chen, P. (2017). Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 35(5), 530–544. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.006>
- Nguyen, H.-Q.-D., Kao, C.-Y., Chiang, C.-P., Hung, Y.-H., & Lo, C.-M. (2022). Investigating the Immunomodulatory Potential of Dental Pulp Stem Cell Cultured on Decellularized Bladder Hydrogel towards Macrophage Response In Vitro. *Gels (Basel, Switzerland)*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/gels8030187>
- Nireeksha, Varma, S. R., Damdoum, M., Alsaegh, M. A., Hegde, M. N., Kumari, S. N., Ramamurthy, S., Narayanan, J., Imran, E., Shabbir, J., & Khurshid, Z. (2021). Immunomodulatory expression of cathelicidins peptides in pulp inflammation and regeneration: An update. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(1), 116–126. <https://doi.org/10.3390/cimb43010010>
- Paris, S., Wolgin, M., Kielbassa, A. M., Pries, A., & Zakrzewicz, A. (2009). Gene Expression of Human Beta-defensins in Healthy and Inflamed Human Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, 35(4), 520–523. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.12.015>
- Poojar, B., Ommurugan, B., Adiga, S., Thomas, H., Sori, R. K., Poojar, B., Hodlur, N., Tilak, A., Korde, R., Gandigawad, P., In, M., Sleep, R., Albino, D., Rats, W., Article, O., Schedule, P., Injury, C. C., Sori, R. K., Poojar, B., ... Gandigawad, P. (2017). Methodology Used in the Study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(10), 1–5. <https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS>
- Righolt, A. J., Jevdjevic, M., Marcenes, W., & Listl, S. (2018). Global-, Regional-, and Country-Level Economic Impacts of Dental Diseases in 2015. *Journal of Dental Research*, 97(5), 501–507. <https://doi.org/10.1177/0022034517750572>
- Rosales, A. M., & Anseth, K. S. (2016). The design of reversible hydrogels to capture extracellular matrix dynamics. *Nature Reviews Materials*, 1(2), 1–15. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2015.12>
- Rosario, D. J., Reilly, G. C., Salah, E. A., Glover, M., Bullock, A. J., & MacNeil, S.

- (2008). Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regenerative Medicine*, 3(2), 145–156. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.2.145>
- Roth, J. G., Huang, M. S., Li, T. L., Feig, V. R., Jiang, Y., Cui, B., Greely, H. T., Bao, Z., Paşca, S. P., & Heilshorn, S. C. (2021). Advancing models of neural development with biomaterials. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(10), 593–615. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00496-y>
- Sadtler, K., Sommerfeld, S. D., Wolf, M. T., Wang, X., Majumdar, S., Chung, L., Kelkar, D. S., Pandey, A., & Elisseeff, J. H. (2017). Proteomic composition and immunomodulatory properties of urinary bladder matrix scaffolds in homeostasis and injury. *Seminars in Immunology*, 29(May), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.05.002>
- Saldin, L. T., Cramer, M. C., Velankar, S. S., White, L. J., & Badylak, S. F. (2017). Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 49, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068>
- Sell, S. A., Wolfe, P. S., Garg, K., McCool, J. M., Rodriguez, I. A., & Bowlin, G. L. (2010). The use of natural polymers in tissue engineering: A focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers*, 2(4), 522–553. <https://doi.org/10.3390/polym2040522>
- Shimizu, E., Ricucci, D., Albert, J., Alobaid, A. S., Gibbs, J. L., Huang, G. T. J., & Lin, L. M. (2013). Clinical, radiographic, and histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. *Journal of Endodontics*, 39(8), 1078–1083. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.04.032>
- Siddiqui, Z., Sarkar, B., Kim, K. K., Kadincesme, N., Paul, R., Kumar, A., Kobayashi, Y., Roy, A., Choudhury, M., Yang, J., Shimizu, E., & Kumar, V. A. (2021). Angiogenic hydrogels for dental pulp revascularization. *Acta Biomaterialia*, 126, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.001>
- Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., & Peppas, N. A. (2009). Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*, 21(32–33), 3307–3329. <https://doi.org/10.1002/adma.200802106>

- Spang, M. T., & Christman, K. L. (2018). Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo applications and development. *Acta Biomaterialia*, 68(December), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.019>
- Spinali, K. L., & Schmuck, E. G. (2018). Natural sources of extracellular matrix for cardiac repair. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1098, 115–130. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-97421-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-97421-7_6)
- Tanaka, E. (2002). Non-canonical Wnt signaling in. *Online*, 13(02), 243–249. <https://doi.org/10.1016/S1084>
- Tokajuk, J., Deptuła, P., Piktel, E., Daniluk, T., Chmielewska, S., Wollny, T., Wolak, P., Fiedoruk, K., & Bucki, R. (2022). Cathelicidin LL-37 in Health and Diseases of the Oral Cavity. *Biomedicines*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051086>
- U., S. (1985). Effects calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *Journal of Dental Research*, 64(special issue), 541–548.
- Valdoz, J. C., Johnson, B. C., Jacobs, D. J., Franks, N. A., Dodson, E. L., Sanders, C., Cribbs, C. G., & Van Ry, P. M. (2021). The ECM: To scaffold, or not to scaffold, that is the question. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312690>
- Yadlapati, M., Biguetti, C., Cavalla, F., Nieves, F., Bessey, C., Bohluli, P., Garlet, G. P., Letra, A., Fakhouri, W. D., & Silva, R. M. (2017). Characterization of a Vascular Endothelial Growth Factor–loaded Bioresorbable Delivery System for Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*, 43(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.09.022>
- Yang, X., Guo, J.-L., Han, J., Si, R.-J., Liu, P.-P., Zhang, Z.-R., Wang, A.-M., & Zhang, J. (2020). Chitosan hydrogel encapsulated with LL-37 peptide promotes deep tissue injury healing in a mouse model. *Military Medical Research*, 7(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00249-5>
- Zehra, T. (2020). Agreement between Two Commonly Used Pulp Tests in Determining Pulp Vitality. *Pakistan Journal of Medicine and Dentistry*, 9(02), 26–31. <https://doi.org/10.36283/pjmd9-2/006>

