



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Obtención de Células Madre de Pulpa
Dental de Terceros Molares y su
Caracterización. Estudio in Vitro.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

JIMÉNEZ ÁVILA ALBERTO

Dictaminadores	Director	Dr. Raúl Rosales Ibáñez
	Co-director	Mtro. Carlos Gallardo Leyva
	Asesor	Dr. Ignacio Peñalosa Castro

LOS REYES IXTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Obtención de Células Madre de Pulpa Dental de Terceros Molares y su Caracterización. Estudio In Vitro





Contenido

Resumen.....	4
Introducción	6
Marco Teórico.....	7
Ingeniería de tejidos.....	8
Definición de Stem Cells.....	9
Clasificación de Células Madre.....	10
Fuentes de Obtención	11
Células madre en pulpas de dientes permanentes (DPSCs).....	12
Las células madre de la pulpa dental (DPSCs).....	12
Células madre del ligamento periodontal (PDLSCs)	13
Células madre de dientes temporales (SHED cells).....	13
Células Madre de Papila Apical (SCAP).....	14
Células Madre del Folículo Dental (DFPC)	14
Células Madre de la Mucosa Bucal	15
Células madre de la pulpa dental (DPSCs).....	16
Metodología.....	19
Selección de pacientes y extracción dentaria.....	19
Criterios de inclusión para la obtención de las muestras:.....	19
Criterios de exclusión para la obtención de las muestras:.....	19
Obtención de la muestra de tejido pulpar:.....	21
Aislamiento y cultivo de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana.....	21
Caracterización morfológica de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana	22
Método de Separación o recolección celular	22
Expresión de marcadores antigénicos de superficie celular para la identificación de las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana a través del análisis Inmucitoquímico	24
Determinación de la viabilidad celular:.....	24
Evaluación de Eficiencia formadora de colonias en la Pulpa Dental	26
Resultados.....	27



Aislamiento, cultivo y caracterización morfológica de las células mesenquimales de la pulpa dental humana. 27

Determinación de Viabilidad Celular. 29

Determinación de la eficiencia de formación de colonias de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana..... 30

Expresión de marcadores antigénicos de superficie celular para la identificación de las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana a través del análisis Inmunocitoquímico. 31

Discusión: 32

Conclusiones:..... 35

Referencias Bibliográficas..... 37



Resumen

En ingeniería tisular, las Stem Cells (SC) son las células más prometedoras, se definen como células clonogénicas, indiferenciadas que tienen dos propiedades:

A) La autorrenovación, que es la capacidad de dividirse en más células madre.
B) La capacidad de diferenciarse en uno o varios tipos de células especializadas, bajo condiciones apropiadas o señales correctas como en condrocitos, adipocitos y osteocitos entre otros. Dichas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo, donde se han hecho proliferar en cultivos in vitro, permitiendo estudiar algunas de sus propiedades funcionales. En la última década se han estudiado sus nichos y señales específicas que modulan su potencial de diferenciación. En la cavidad oral podemos encontrarlas en la pulpa, en el folículo dental y en el tejido conectivo gingival entre otros. La pulpa posee células mesenquimatosas indiferenciadas que derivan del ectodermo de la cresta neural, constituyendo una reserva celular y poseen la capacidad de diferenciarse en nuevas estirpes celulares.

Las SC ofrecen una esperanza para el futuro tanto en medicina como en odontología, dada su gran potencial para ser utilizadas en la terapia celular y la ingeniería de tejidos, por su capacidad de regenerar órganos dañados y enfermos. En el tejido dentario se han aislado y caracterizado poblaciones de células madre adultas derivadas de la pulpa dentaria, el ligamento periodontal, la papila apical y el folículo dentario. Las células madre de la pulpa dentaria fueron aisladas por primera vez por Gronthos y col., en el 2000, de pulpa dental de terceros molares retenidos. Los datos presentados en su investigación demuestran que la pulpa dental adulta contiene células que son clonogénicas, altamente proliferativas y capaces de regenerar tejido mineralizado, propiedades que las define como células madre. Son células multipotentes, capaces de diferenciarse en varios tipos de células, exhiben características similares a las células madre mesenquimales de médula ósea. Por lo que podrían ser consideradas como una alternativa más fácilmente accesible de células madre adulta.

Las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria prometen constituir un valioso recurso en la medicina regenerativa. El objetivo de la presente



Obtención de Células Madre de Pulpa Dental de Terceros Molares y su Caracterización. Estudio In Vitro



investigación es establecer el cultivo de las células madre mesenquimales de la pulpa dental humana.



Introducción

La capacidad de los dientes para formar dentina reparativa en respuesta a la caries profunda y traumatismos sugiere el importante papel de la pulpa dental en la regeneración tisular. Esto se debe a que las células madre mesenquimales residentes en la pulpa dental tienen la capacidad de diferenciarse y formar odontoblastos para dar lugar a una nueva dentina (Gronthos, Mankani et al. 2000). Por lo tanto, la obtención de Stem Cells de la pulpa dental ha sido el objetivo de interés de varios estudios en la medicina regenerativa tisular (Zhang, Walboomers et al. 2006).

Además uno de los retos en las cirugías odontológicas es la regeneración ósea, especialmente del hueso alveolar para el implante dental, y de las células madre de pulpa dental también se pueden obtener por diferenciación osteoblastos (Laino, Graziano et al. 2006).

Actualmente, las Stem Cells se usan en ensayos clínicos en animales y en humanos (Giordano, Galderisi et al. 2007), en combinación con matrices tridimensionales; materiales compatibles que sirven de soporte para las células madre y que se reabsorben gradualmente por la degradación enzimática e hidrolítica (Pieri, Lucarelli et al. 2009). Pero para tales usos clínicos, existen factores que todavía limitan su uso: el gran tiempo requerido para la obtención de estas células madre y el gran número de células que se necesita, supone que el cultivo debe mantenerse durante semanas antes de poder ser combinado con el biomaterial e implantado en el paciente.

En esta tesis se pretende, como objetivo primordial, el aislamiento de células madre, con tal de subsanar, en parte, la limitación del número de células y el tiempo requerido que es necesario actualmente para los ensayos de regeneración ósea. Por ello, nos planteamos estudiar distintos protocolos para aislar las células y estandarizar las condiciones del cultivo, para asemejarlas lo más posible a las condiciones fisiológicas, con el fin de preservar sus propiedades originales de proliferación.



Marco Teórico.

En la actualidad, los tratamientos odontológicos en el campo de la regeneración de tejidos se basan en la aplicación de matrices inductoras para favorecer la producción de células necesarias en el área afectada por procesos patológicos. Sin embargo, las aplicaciones de estas matrices no siempre tienen resultados satisfactorios y es en este escenario donde el área odontológica necesita nuevos conocimientos en células madre, ya que tienen la capacidad de rescatar y / o reparar un tejido lesionado.

En los seres humanos, es posible aislar diferentes tipos de células madre del cuerpo. Entre ellas, las células madre de la pulpa dental (DPSCs), estas son relativamente fáciles de obtener, exhiben alta plasticidad y capacidades multipotenciales para la reconstrucción ósea y pueden ser utilizadas para la reparación de defectos del cuerpo en estrategias terapéuticas autólogas de bajo riesgo, siendo un factor muy importante para establecer una medicina regenerativa.

La medicina regenerativa es una disciplina basada en los nuevos conocimientos en células mesenquimales y en el uso de matrices artificiales para establecer terapias celulares y contribuir a la nueva ciencia llamada ingeniería tisular.

La ingeniería tisular es un área interdisciplinaria en la que fundamentalmente se realiza la manipulación de células vivas a nivel de laboratorios para proveer a un futuro, constructos celulares para implantación en un área del cuerpo humano donde se ha establecido algún proceso degenerativo, patológico o traumatológico (Langer & Vacanti, 1993).

En los últimos años, los estudios se han centrado en la posible aplicación de las células madre y la ingeniería de tejidos para reparar y regenerar las estructuras del cuerpo. (Estrela, Alencar, & Kitten, 2011), (Riccardo d'Aquino et al., 2009), (Laino et al., 2006) (Camassola, Maria, Macedo, Chagastelles, & Nardi, 2012). Esta nueva idea de la terapia, conocida como la medicina regenerativa, puede estar lista para aplicaciones clínicas en el futuro. Se ha planteado la hipótesis de que las células madre podrían desempeñar un papel clave en tratamientos médicos futuros, ya que pueden ser cultivadas fácilmente e inducidas



a diferenciarse en distintos tipos de células en cultivo (Camassola et al., 2012). El objetivo general de la ingeniería de tejidos es restaurar la vitalidad y función del tejido enfermo y traumatizado. Se pueden utilizar varios enfoques, ya estudiados en cirugía oral y maxilofacial, para la reparación ósea, incluyendo:

- 1.- injertos autólogos utilizando células y factores de crecimiento con propiedades osteogénicas (Engineering & Series, 2006) ;
- 2.- los injertos alogénicos y xenogénicos, utilizando porciones de hueso con propiedades osteoinductoras de otros seres humanos o animales (Cr, Jt, Ma, Ht, & Clin-, 1999).
- 3.- biomateriales osteoinductores que sirven como vehículos para factores de crecimiento osteogénico (Wahl & Czernuszka, 2006).
- 4.- materiales sintéticos capaces de regenerar el hueso con o sin la resorción parcial.

Las aplicaciones de las células mesenquimales son múltiples en diferentes zonas del cuerpo humano, pero en el área odontológica, uno de los campos más importantes es la regeneración de tejido óseo para así, establecer condiciones para combatir diferentes alteraciones funcionales del sistema estomatognático.

Ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejido, o ingeniería tisular, se puede definir como un grupo de herramientas utilizadas para la creación de implantes biológicos con las características fisiológicas, capaces de conducir e inducir la regeneración de un tejido específico (Barreto, 2009).

Esta disciplina nace como respuesta a los problemas que presentan las terapias de reparación y regeneración actuales. La ingeniería de tejidos también puede definirse como la utilización combinada de células, biomateriales y factores bioquímicos para reparar tejidos lesionados o enfermos (Forriol & Esparza, 2008). Es un campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de la biología para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular (Langer & Vacanti, 1993).



La ingeniería tisular comprende la combinación de células vivas, en un molde, para reproducir una estructura tridimensional tisular que sea funcional y semejante al tejido de debe reemplazar. Además se deben cumplir un número adecuado de células y tejido para asegurar la regeneración completa, mantener y diferenciar las células al fenotipo correcto y corroborar la orientación tridimensional necesaria junto con la producción de matriz extracelular, y es ahí donde entran en función moldes biorreabsorbibles hasta que las células sean capaces de generar su propio medio.

Por lo tanto, las células, los factores de crecimiento y señalización en conjunto con la estabilidad biomecánica del biomaterial fundamentan la triada de la Ingeniería de Tejidos.

Los principales objetivos de este novedoso campo están encaminados a la regeneración o reemplazo bioartificial de tejidos y órganos propios del cuerpo humano, que han sido dañados por diversos factores, como trauma, quemaduras, enfermedades adquiridas como cáncer o ciertas anormalidades congénitas (Ibáñez & Estrada, 2012).

En los últimos años se ha producido un extraordinario avance en los conocimientos relacionados con diferentes ramas biológicas, entre ellas la biología celular. Esto ha dado un notable impulso a una nueva rama de la medicina denominada medicina regenerativa. Esta disciplina médica se ha basado fundamentalmente en los nuevos conocimientos sobre las Stem Cells y en su capacidad de convertirse en células de diferentes tejidos.

Un aspecto que se debe destacar y que conforma el elemento básico a esta ciencia, es que se apoya en los mismos factores que el organismo emplea para su auto-reparación.

Definición de Stem Cells.

El término Stem Cells aplicado en español no tiene actualmente una traducción arbitrariamente dictada. Las similitudes han acuñado a la interpretación por células madre, células indiferenciadas, células mesenquimales, células troncales por



mencionar algunas. Sin embargo, nos referiremos a estas estructuras como Stem Cells (SC).

Desde el punto de vista de su capacidad reproductiva y funcional, las SC se han definido como aquellas que pueden dividirse simultáneamente para mantener por su lado su auto-renovación, con producción de más células semejantes a ella, y por otro lado, generar células hijas comprometidas con diferente linajes celulares que se diferencian en distintos tipos de células especializadas (Gaona et al., 2007).

Clasificación de Células Madre.

Existen diferentes clasificaciones para las células madre, localizando primariamente un grupo:

Por su origen:

El cual es determinado por el desarrollo embrionario y por su desarrollo postnatal o adulto.

El desarrollo embrionario da origen a la formación de un grupo de células capaces de generar un organismo por completo (totipotencialidad), las cuales tienen un gran potencial para la regeneración tisular, sin embargo, su utilización enfrenta cuestiones éticas, religiosas por mencionar algunas.

Durante el desarrollo posnatal, el cuerpo humano desarrolla un subgrupo de células capaces de autorrenovarse, ser clonogénicas y diferenciarse a otros estirpes celulares. Estas son las células madre adultas. Con características de multipotencialidad y sobre ellas cabe destacar que su potencial de diferenciación queda limitado a la capa embrionaria de la que procedan (Jesús & Orta, 2011).

Por el potencial de diferenciación.

Determinando los siguientes:

Totipotenciales: son aquellas que en las condiciones apropiadas son capaces de formar un individuo completo, pues pueden producir tejido embrionario y extraembrionario.

Pluripotencialidad: son células que tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias. Aunque estas células por



sí solas no pueden producir un individuo, ya que necesitan el trofoblasto, sí originan todos los tipos de células y tejidos del organismo.

Multipotencialidad: este grupo celular tiene la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de las mismas capas embrionarias, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos (Hern & Dortic, n.d.).

Oligopotencialidad: Dan lugar a dos o más tipos celulares en un tejido. Por ejemplo una célula madre neuronal que puede crear un subgrupo de neuronas en el cerebro.

Unipotencialidad: Son aquellas que pueden formar únicamente un tipo de célula particular. Por ejemplo las células madre espermatogoniales (dan lugar a espermatozoides).

Y por último se les clasifica de acuerdo al tejido en el que asientan. Así se les asignarían las fuentes posibles de obtención de SC. Y por lo tanto, es importante comprender el concepto de “nicho” acuñado por Scofield en 1978. Son elementos que rodean a la célula troncal cuando se encuentra en su estado nativo, incluyendo las células no troncales que pudieran estar en contacto con ella, así como la matriz extracelular y las moléculas solubles que se encuentran localmente. Existen nichos en las siguientes localizaciones: Medula ósea, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, folículo piloso, intestino, sistema nervioso y estructuras bucales.

Las SC de origen bucal, son unidades que poseen un potencial de multidiferenciación y por tanto pertenecen al grupo de SC adultas. Teniendo la capacidad de diferenciación hacia linajes osteo/odontogénico, adipogénico, y neurogénico.

Fuentes de Obtención

Existen diversas fuentes de obtención de células madre como son médula ósea, cordón umbilical tejidos adiposo por mencionar algunas, pero en esta ocasión nos enfocaremos a las células madre obtenidas de la cavidad bucal.



Células Madre Dentales (C.M.D.): Son SC que poseen potencial de multidiferenciación y por tanto pertenecen al grupo de SC adultas, teniendo la capacidad de formar células con carácter osteo/odontogénico, adipogénico y neurogénico. Sin embargo, se puede afirmar que, en comparación con las C.M. de la médula ósea, las C.M.D tienen predilección por el desarrollo odontogénico (Huang, Gronthos, & Shi, 2009).

Se han identificado grupos principales de células madre en la cavidad bucal, de sus tejidos específicos.

Células madre en pulpas de dientes permanentes (DPSCs).

Fueron las primeras células madre dentarias que se aislaron (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000). Por analogía con las células madre de la médula, se consideró que había una comunidad de células multipotenciales en el tejido pulpar de dientes maduros. En estudios posteriores, se las empezó a relacionar con características endoteliales y vasculares, pero no ha sido hasta años después cuando se aislaron, determinando sus características.

El origen y localización exacta de estas células sigue siendo incierto. La producción de DPSC es muy pequeña (1 por 100 de todas las células) y según aumenta la edad del individuo, la disponibilidad de estas células se ve reducida. Se han estudiado sobretodo las células que provienen de terceros molares y dientes supernumerarios. Cabe destacar que, si son aisladas durante la formación de la corona, las DPSC son más proliferativas que si se aíslan más adelante.

Las células madre de la pulpa dental (DPSCs)

Se ha demostrado que pueden resolver todas estas cuestiones: el acceso al lugar donde se encuentran estas células es fácil y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular (Graziano, d'Aquino, Laino, & Papaccio, 2008).



Células madre del ligamento periodontal (PDLSCs)

Varios estudios afirman que el ligamento periodontal tiene poblaciones de células que pueden diferenciarse tanto hacia cementoblastos como hacia osteoblastos. La presencia de múltiples tipos de células en el periodonto sugiere que este tejido contiene SC llamadas (Periodontal Ligament Stem Cells) que mantienen la homeostasis y la regeneración del tejido periodontal. Los análisis in vivo con PDLSC realizados en ratones inmunocomprometidos, sugirieron la participación de estas células en la regeneración del hueso alveolar al propiciar la formación de una fina capa de tejido muy similar al cemento que, además de contar entre sus componentes con fibras de colágenas, se asociaron íntimamente al hueso alveolar próximo al periodonto regenerado.

Las fibras colágenas generadas in vivo en humanos, fueron capaces de unirse con la nueva estructura formada de cemento, imitando así la unión fisiológica de las fibras de Sharpey. De estos estudios y análisis se podría decir que las PDLSC podrían contener un subgrupo de células capaces de diferenciarse hacia cementoblastos/cementocitos así como hacia células formadoras de colágeno (Huang et al., 2009).

Células madre de dientes temporales (SHED cells)

Se han aislado células de la pulpa remanente de los dientes deciduos exfoliados, denominadas (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth). Los resultados revelaron que ésta, contiene una población de células indiferenciadas multipotenciales diferentes a las aisladas anteriormente de la pulpa de dientes permanentes (DPSC).

Conservadas las SHED se consideran una importante fuente de células madre de fácil obtención. Los dientes deciduos y los permanentes tienen importantes diferencias en cuanto a su función, proceso de desarrollo y estructura tisular, y al comparar las SHED con las DPSC, se encontró una mayor velocidad de proliferación y una mayor capacidad de especialización. Un revelador ejemplo es el de la existencia, hasta ahora ignorada, de células epiteliales en la pulpa de estos dientes. (Nam & Lee, 2009).



En cuanto a la capacidad osteoinductora, se ha comprobado, en ratones, que las SHED pueden reparar defectos de formación ósea. Así, los dientes deciduos no solo favorecerían la guía eruptiva de los dientes permanentes, también pueden estar involucrados en la inducción ósea durante la erupción permanente (Miura et al., 2003).

Células Madre de Papila Apical (SCAP)

La papila apical hace referencia al tejido blando situado en los ápices del diente permanente que se está formando. Existe una zona muy rica en células entre la papila apical y la pulpa. Es interesante destacar que, sin estimulación neurológica, las SCAP se muestran positivas para varios marcadores neurológicos, pero cuando se someten a estimulación neurológica, el número de marcadores aumenta notablemente. Parece que las SCAP son las precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular, mientras que las células madre de la pulpa (DPSC) son, probablemente, las precursoras de los odontoblastos que forman la dentina reparativa (Huang et al., 2009)

Además, éstas últimas, contienen un mayor componente vascular y celular que las SCAP. Se utilizaron las SCAP para conseguir raíces mediante ingeniería tisular utilizando cerdos como modelo experimental y así probar que son una fuente prometedora para las futuras aplicaciones clínicas (Sonoyama et al., 2008).

Células Madre del Folículo Dental (DFPC)

El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación. Este tejido contiene SC que son las que terminarán formando el periodonto, constituido por cemento, ligamento, hueso alveolar y encía. Las Dental Follicle Precursor Cells (DFPC) han sido aisladas de folículos dentales de los terceros molares impactados. Son semejantes al resto de SC de origen dental pero constituyen colonias clonogénicas en menor número que los demás tipos.



Estas células muestran una morfología típica de fibroblastos. Posteriormente a los ensayos de inducción osteogénica, se ha demostrado la diferenciación hacia ese linaje. En ensayos de inmunohistoquímica ha sido identificado el antígeno STRO-1 en los folículos dentales. El trasplante de estas células genera una estructura constituida de tejido fibroso rígido (Huang et al., 2009).

Células Madre de la Mucosa Bucal

Las SC de la mucosa bucal también han sido aisladas y cultivadas, expresando multipotencialidad con capacidad de reparar lesiones cutáneas de baja inmunogenicidad, y han sido empleadas estas células exitosamente para la reparación de defectos epiteliales oculares, logrando así, una fina membrana epitelial capaz de regenerar o sustituir la córnea (Nishida et al., 2004).

El campo de las células madre representa un área de especial interés para la investigación científica. Los resultados obtenidos hasta la fecha dan buenas expectativas para el uso de células madre en ensayos clínicos. Nuevas estrategias terapéuticas han sido posibles gracias a los grandes avances en la biología de células madre, con el objetivo de regeneración de tejidos dañados por la enfermedad (Sylvester & Longaker, 2004) (Bianco, Robey, & Simmons, 2008). Con base en su capacidad para rescatar y / o reparar un tejido dañado y restaurar parcialmente la función del órgano, múltiples tipos de células madre / progenitoras se han especulado. Un objetivo principal es identificar cómo los diferentes tejidos y órganos pueden surgir a partir de células madre indiferenciadas.

Stemness es la capacidad de las células indiferenciadas que someterse a un número indefinido de repeticiones (auto-renovación) y dar lugar a células especializadas (diferenciación). Por lo tanto, las células madre se diferencian de otros tipos de células en el cuerpo, ya que son capaces de sostener la autorrenovación, no son especializadas, y pueden dar lugar a tipos celulares



diferenciados. La diferenciación puede ser reconocida por un cambio en la morfología de la célula y por la detección de proteínas específicas de tejido.

Las células madre pueden permanecer en reposo (no se dividen) durante largos períodos de tiempo hasta que son activadas por una necesidad fisiológica de más células para mantener los tejidos, por una enfermedad o por lesión de los mismos. Por lo tanto, la función principal de las células madre adultas es mantener y reparar el tejido en el que se encuentran. Se cree que residen en áreas específicas denominadas nichos de células madre (Scadden, 2006). Las Stem Cells adultas se han identificado en muchos órganos y tejidos, incluyendo cerebro, médula ósea, sangre periférica, los vasos sanguíneos, músculo esquelético, piel, dientes, corazón, intestino, hígado, epitelio ovárico, y testículo. Entre estos tejidos, la pulpa dental se considera una fuente rica de células madre mesenquimales adecuadas para aplicaciones de ingeniería de tejidos y, por esta razón, muchos estudios se realizan con el objetivo final de obtener hueso nuevo.

Células madre de la pulpa dental (DPSCs)

La pulpa dental, un tejido conectivo laxo dentro de la corona dental, es una interesante fuente de células madre adultas debido a la gran cantidad de células presentes y la no invasividad de los métodos de aislamiento en comparación con otras fuentes de tejido adulto (Riccardo d'Aquino et al., 2009) (Goldberg & Smith, 2004) (Tirino, Paino, Rosa, & Papaccio, 2012). La pulpa dental contiene células madre mesenquimales definidas como células madre de la pulpa dental (DPSCs). Estas DPSCs se obtienen a partir de los dientes humanos permanentes y primarios, terceros molares, dientes deciduos exfoliados humanos (SHED) y papila apical (SCAP). (Gronthos et al., 2000) (Atari et al., 2011) (Miura et al., 2003) (Sonoyama et al., 2008). Por otra parte, las DPSCs pueden también aislarse de los dientes supernumerarios, que generalmente se desechan. Otras fuentes de células madre dentales son el ligamento periodontal, que alberga las células madre del ligamento periodontal (PDLSCs), (Seo et al., 2004) y el folículo dental, que contiene células progenitoras del folículo dental (DFPCs). (Navabazam et al., 2013) (R d'Aquino, Tirino, & Desiderio, 2011). Las DPSCs han sido aisladas de



diferentes organismos, incluyendo los seres humanos, ratón, rata, oveja, chimpancé y cerdo (Nakatsuka et al., 2010) (Iohara et al., 2006) (Mrozik et al., 2010) (Cheng et al., 2008).

Una característica de las DPSCs es diferenciarse en distintos tipos de células y tejidos (R d'Aquino et al., 2007) (Almushayt, Narayanan, Zaki, & George, 2006) (Arthur, Rychkov, Shi, Koblar, & Gronthos, 2008) (Khanna-Jain, 2012) y su multipotencia se ha comparado con la de las células madre de la médula ósea (BMSC). Se ha demostrado que la proliferación, la disponibilidad y el número de células de DPSCs es mayor que las BMSCs (Alge et al., 2011)

Hay dos métodos ampliamente utilizados para el aislamiento de células madre de pulpa dental: el método de explante y el método de digestión enzimática del tejido pulpar. El método de explante se basa en la fragmentación del tejido y la adherencia posterior sobre una superficie de plástico (Spath et al., 2010) (Hilkens et al., 2013). La segunda técnica consiste en la extirpación quirúrgica estéril de la pulpa dental, y la digestión en Colagenasa/Dispasa, y la detección mediante el uso de marcadores específicos.

Diferentes marcadores de células madre mesenquimatosas se utilizan para seleccionar diferentes subconjuntos de DPSCs que muestran diversos comportamientos biológicos (Kawashima, 2012). Yang y sus colegas demostraron que Stro-1 identifica un subgrupo de DPSCs con propiedades odontogénicas y osteogénicas. Otra población DPSCs es positiva para CD34 y CD117 y negativa para CD45. Esta población tiene una gran auto-expansión y capacidad de diferenciación osteogénica y produce un tejido vivo autólogo de médula fibrosa in vitro en el tejido óseo cuando se implantan en ratones. Tales DPSCs pueden ampliarse por períodos largos y divididos para 80 pasajes al mismo tiempo que muestra la plasticidad y la capacidad de los nódulos y el chip de la formación ósea in vitro (Laino et al., 2006). Esta capacidad se produce cuando las células no se separan de su sustrato, evitando la pérdida de interacciones célula a célula, fundamentales para la secreción de matriz extracelular (R d'Aquino et al., 2007). Otros marcadores expresadas por DPSCs son CD29 y CD44 (Jo et al., 2007) , así como CD73 y CD105 (Pivoriuñas et al., 2010) , todos los marcadores de la



troncalidad mesenquimales. A pesar de esto, estos marcadores no se utilizan para aislar DPSCs, sin embargo, se utilizan para la caracterización.

Numerosos estudios han evaluado la multipotencia de DPSCs, son capaces de diferenciarse en osteoblastos cuando se cultivan en medio osteogénico suplementado con Dexametasona, β -glicerofosfato y ácido ascórbico (Liu, Ling, Wei, Wu, & Xiao, 2009) (Hsu & Chang, 2010).

Se han encontrado diferentes condiciones de cultivo para mejorar la diferenciación de linaje osteogénico, por ejemplo, con el uso de un lisado de plaquetas humanas como una alternativa a FBS (Chen et al., 2012).

Las DPSC se pueden diferenciar también en otros tipos de células, incluyendo las células musculares lisas, y las neuronas. (Gronthos et al., 2002) (Arthur et al., 2008) (Kadar et al., 2009).

Además, las DPSCs son capaces de formar estructuras similares a capilares cuando se cultivan con VEGF (Marchionni & Bonsi, 2008) .

Gran atención también se ha centrado en la capacidad de las DPSCs en diferenciarse en células similares a odontoblastos, caracterizadas por la acumulación de nódulos mineralizados (Almushayt et al., 2006) (Paula-Silva, Ghosh, Silva, & Kapila, 2009) (Couple et al., 2000).

Otro aspecto a tener en cuenta es la capacidad de DPSCs para mantener sus características después de la criopreservación durante años. Los osteoblastos diferenciados a partir de DPSCs, así como DPSCs sí mismos, son todavía capaces de re-comenzar la proliferación, la diferenciación y la producción de una matriz mineralizada (Laino et al., 2006) (Papaccio et al., 2006).



Metodología

Para el presente trabajo fueron utilizados 10 molares extraídos en la Clínica Odontológica Cuauhtepc, bajo los lineamientos establecidos para la donación de órganos dentales para investigación.

Selección de pacientes y extracción dentaria

Una vez llenada la historia clínica de los pacientes en el expediente electrónico de la FES Iztacala se entregó la información correspondiente sobre el procesamiento de los órganos dentarios, y así mismo se hizo la entrega del consentimiento informado correspondiente.

Se llevaron a cabo las indicaciones de asepsia estandarizadas en la clínica de cirugía, las cuales constan de asepsia extra e intra bucal con Iodopovidona y Clorhexidina respectivamente.

Criterios de inclusión para la obtención de las muestras:

- Presencia de terceros molares totalmente formados
- Ápice totalmente cerrado
- Órgano dentario fuera de oclusión
- Órgano sin presencia de caries o procesos infecciosos
- Órganos dentarios que durante su extracción quirúrgica no sufran odontosección.

Criterios de exclusión para la obtención de las muestras:

- Terceros molares completamente erupcionados y en oclusión
- Terceros molares en proceso de formación
- Ápice dentario en formación
- Órgano dentario que durante su extracción quirúrgica sufrió odontosección.

Inmediatamente después de la intervención quirúrgica se obtuvieron los órganos dentarios y se colocaron en tubos de transporte con un medio de conservación solución salina con penicilina 1000 U/ml, estreptomycin 1mg/ml y anfotericina B 2.5 mg/ um al 10% (Fig. 1).



Una vez depositado cada órgano dentario dentro del tubo de transporte se refrigeraron para mantenerlos a una temperatura de 4 °C para su posterior transportación en el menor tiempo posible, el cual no debe superar el periodo de 24 horas, antes de su procesamiento (Fig. 2)



Los órganos dentarios después de estar en la solución de conservación

fueron procesados para la obtención del tejido pulpar, el cual consta de cortes por las caras axiales a nivel de la unión amelocementaria.



Para realizar este proceso, se utilizó un disco de diamante con motor de baja velocidad en presencia de irrigación constante de solución salina haciendo un corte horizontal rodeando todo el órgano. Una vez realizados los cortes y haber dejado una brecha separando corona y raíces, se

realizó la separación de estas dos estructuras mediante una espátula 7A y así exponer por completo el tejido pulpar.



Después de la exposición de la pulpa dental, las estructuras seccionadas se colocaron de nuevo en un medio de transporte, (solución salina con penicilina 1000 U/ml, estreptomycin 1mg/ml y anfotericina B 2.5 mg/ um al 10%) durante 2 horas.

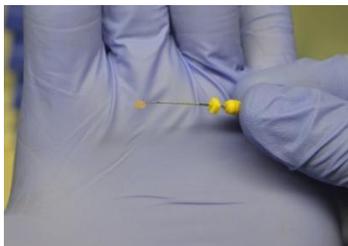
Durante el tiempo de espera en el medio de transporte de las muestras, se efectuó la preparación del área blanca para iniciar con el proceso de cultivo.

Mediante luz ultravioleta se hizo la esterilización del área blanca y campana de flujo laminar. En el sistema de filtración por vacío, se preparó una solución con 450 ml concentración final con DMEM (Dulbecos Modified Eagle's Medium) al que se le agregará Suero fetal bovino (GIBCO) al 10% y 1% de Antibiótico, antimicótico (SIGMA-ALDRICH).

Una vez completada la combinación de estas soluciones, se comenzará al filtrar el medio de cultivo.

Obtención de la muestra de tejido pulpar:

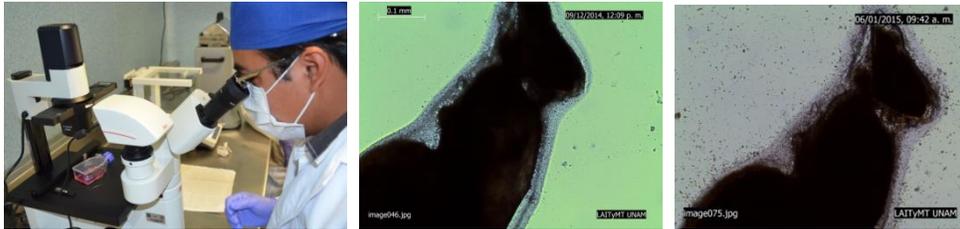
Para el aislamiento del tejido pulpar los segmentos seccionados se colocaron en una caja Petri donde la pulpa dental fue extraída de la porción radicular y cameral del órgano dentario mediante limas endodónticas y el tejido obtenido se fragmentó mecánicamente con cucharillas para dentina, elaborando fragmentos de 1mm^3 aproximadamente de volumen.



Aislamiento y cultivo de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana

Los explantes del tejido se colocaron en cajas tipoalcon () en medio DMEM (Medio de Eagle s Modificado por Dulbbeco, SIGMA-ALDRICH), enriquecido con 10% de FCS (Suero Fetal Bovino, GIBCO), 100 UI/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomcina y 0.25 µg/mL de anfotericina B (SIGMA-ALDRICH), después, las cajas se colocaron en una incubadora con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C (BINDER).

Se realizaron cambios de medio de cultivo 2 veces por semana con observación al microscopio óptico invertido (Leica), donde se verificó el crecimiento y pureza del cultivo. Los cultivos celulares se monitorearon por un periodo aproximadamente 30 días para permitir el crecimiento de las células.



Caracterización morfológica de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana

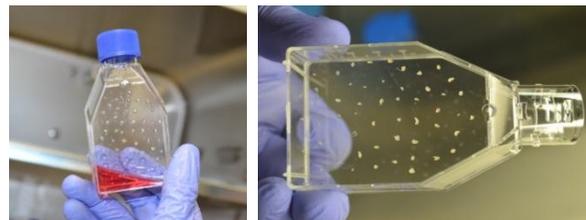


Después de este tiempo de espera el cultivo celular llegó a confluencia, es decir, que las células hayan proliferaron en toda la extensión de la caja y tomaron forma de huso o forma alargada, que corresponde a la morfología descrita para las células madre de pulpa dental.

se procedió a la realización del primer pase o primer subcultivo.

Método de Separación o recolección celular

Se retiró el medio de cultivo de la caja Falcon (NUNC).

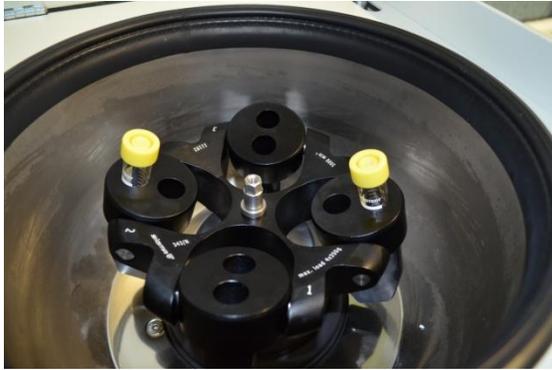


Se agregaron 5ml de Tryple Express (GIBCO).

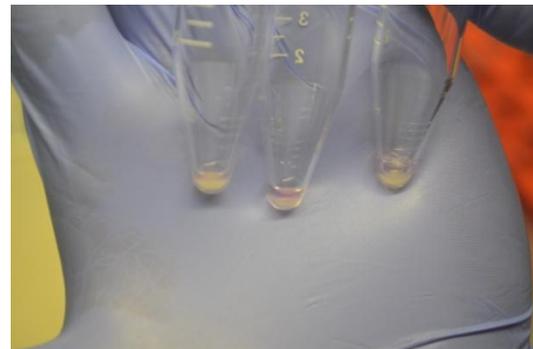
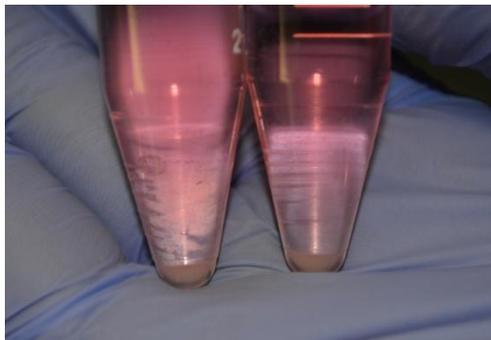
Se dejó incubar por 5 minutos a 37°C.

Se agregó medio DMEM para inactivar la enzima de separación.

El sobrenadante que contenía las Stem Cells fue recuperado con una pipeta estéril para ser colocado en tubos de 15mL (AXYGEN, INC)

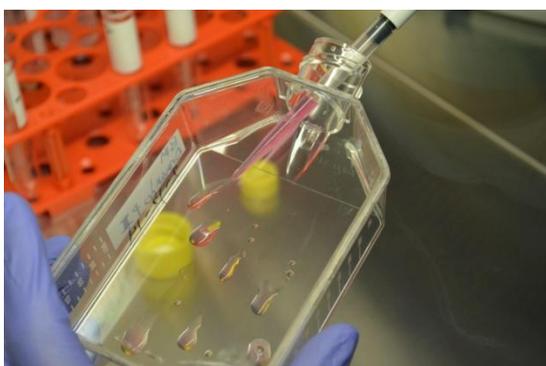
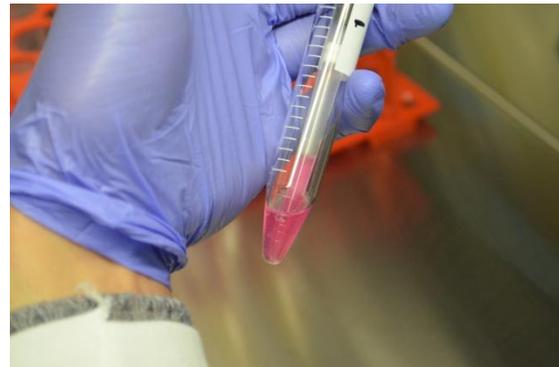


Los tubos de 15mL con el sobrenadante se centrifugaron durante 10 minutos a 1000rpm y con una temperatura de 25°C. Posteriormente se retiró cuidadosamente el sobrenadante, para re- suspender el pellet obtenido en 2mL de medio de cultivo.



se colocaron 100µl de esta suspensión celular en cajas de cultivo, correspondientes a los posteriores ensayos.

El nuevo volumen resuspendido fue colocado en cajas de 75cm² para expandir las células y generar proliferación de la línea celular.





Expresión de marcadores antigénicos de superficie celular para la identificación de las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana a través del análisis Inmunoquímico

presentes células mesenquimales con un fenotipo indiferenciado, se utilizó la expresión de marcadores de superficie característicos de estas células por métodos inmunocitoquímicos. Los anticuerpos utilizados fueron el anti-STRO-1 y anti-CD44 (Santa Cruz), dos marcadores membranales de células madre mesenquimales y el anti-CD45, un marcador específico para células hematopoyéticas, cuya expresión debe ser negativa.

Las células de los subcultivos, del tercer pasaje, de pulpa dentaria humana fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 cells en placas de 24 pozos y cultivadas durante la noche.

Las células fueron lavadas con PBS, pH 7,4, luego se fijaron con formalina neutra al 10% por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se lavaron con PBS, seguidamente, se permeabilizaron con Tritón X 100 a 0.05% por 20 minutos, y se bloquearon en un tiempo de 45 minutos con albumina al 1%

Luego se lavaron con PBS, se eliminó el exceso de líquido para posteriormente realizar la incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-STRO-1 (Santa Cruz), el anticuerpo monoclonal anti-CD44 (Santa Cruz) y el anticuerpo monoclonal anti-humano CD45 (Santa Cruz) por 45 minutos.

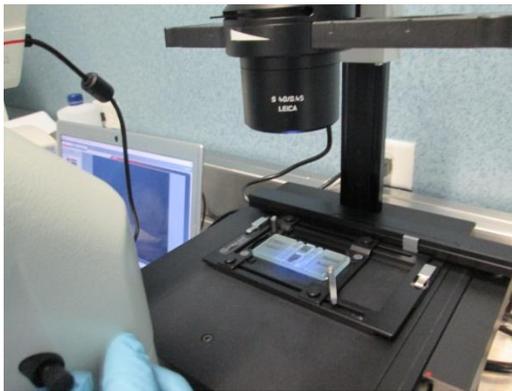
Determinación de la viabilidad celular:

La utilización de células en ingeniería tisular exige evaluar la viabilidad de las mismas en su proceso de producción y utilización corporal; evaluar la capacidad de las mismas para asociarse al resto del tejido artificial en construcción y evaluar, por último la capacidad de mantener su actividad funcional en el interior del organismo.

Para determinar la viabilidad celular mediante ensayos de exclusión de colorantes vitales, se utilizó el método de tinción con azul tripán y contaje celular en cámara de Neubauer.

Mediante ensayos de exclusión de colorantes vitales.

El azul de tripán es un colorante soluble en agua, altamente tóxico, que posee grupos cargados amino y sulfato. La utilidad de este colorante en biología es muy importante, habiéndose utilizado este método para determinar la viabilidad de distintos tipos de células. En general, el azul tripán es capaz de teñir de color azul solamente las células muertas o aquellas en las que la membrana celular ha sido



fragmentada. Sin embargo, las células vivas son capaces de excluir activamente este colorante y, por lo tanto, mantienen su color original translúcido o blanco.

Para llevar a cabo este ensayo, en primer lugar se procedió a cosechar los cultivos celulares para separar las células de frasco de cultivo,

centrifugándose la mezcla para obtener un precipitado o *pellet* celular, el cual se diluyó en una pequeña cantidad de medio de cultivo. A continuación, se tomaran 50 ul de la suspensión celular obtenida, la cual se incubó en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml con un volumen equivalente (50 ul) de solución de azul tripán al



0,4% (Sigma- Aldrich) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó una muestra de 10-15 ul de la mezcla que se colocó en una cámara de



Neubauer, para proceder al recuento de las células vivas (blancas, birrefringentes) y muertas (azules) se utilizó un microscopio óptico Invertido (Leica). Para el cálculo del porcentaje de células vivas y se utilizará la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = \left[\frac{N \text{ células vivas}}{N \text{ células vivas} + N \text{ células muertas}} \right] \times 100$$



Evaluación de Eficiencia formadora de colonias en la Pulpa Dental

La incidencia esperada de CFU-F en tejido de pulpa dental humana es de aproximadamente 20-60 CFU-F / 10^4 células no fraccionadas.

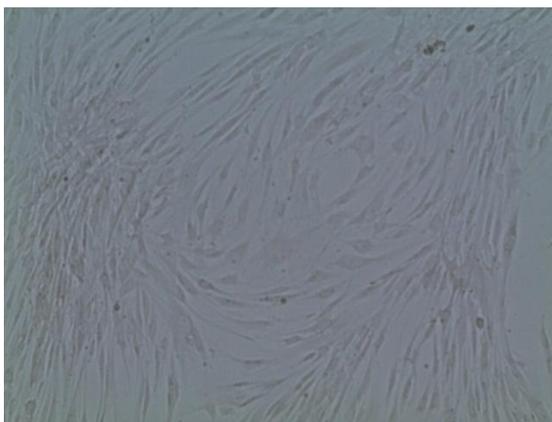
1. Suspensión de células individuales de tejido de la pulpa dental se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos a 0,3, 1,0 y $3,0 \times 10^4$ células / pocillo en medio de crecimiento clonogénico. Los cultivos se establecieron por triplicado y se incubaron a 37 ° C en el 5% de CO₂ y 90% de humedad durante 12 días.
2. Para la enumeración, en el doceavo día las colonias se lavaron dos veces con PBS y después se fijaron durante 20 min en 1% de paraformaldehído en PBS.
3. Los cultivos fijados se tiñeron con 0,1% azul de toluidina por 1 hora, luego se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar. Los agregados de más de 50 células se puntúan como CFU-F usando un microscopio de luz de disección. Las colonias se comprobaron visualmente en el día 10 para asegurarse de que no existiera crecimiento excesivo de las células, lo que haría difícil enumerar las colonias individuales, particularmente en las mayores densidades celulares.

Resultados

Aislamiento, cultivo y caracterización morfológica de las células mesenquimales de la pulpa dental humana.

Una vez iniciado el cultivo del explante, este fue observado diariamente bajo microscopia óptica para evaluar la morfología bajo las condiciones de aislamiento por disgregación mecánica y cultivo llevadas a cabo. En la presente investigación se establecieron células viables de la pulpa dentaria humana, evidenciado a través del conteo celular y la observación regular de los cultivos, con un microscopio invertido de contraste de fase.

Las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana, de terceros molares, mostraron un óptimo crecimiento, cultivadas en el medio DMEM, suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 2 µg/mL anfotericina B (antibiótico-antimicótico), condiciones de cultivo descritas previamente como óptimas, para este tipo de células.



El aspecto morfológico y el comportamiento in vitro de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana mostraron inicialmente, en el cultivo primario, que las células aisladas formaron colonias adherentes a partir de la tercera semana de cultivo, la mayoría de las células presentaron una morfología fusiforme típica de células semejantes a fibroblastos con procesos citoplasmáticos cortos, que gradualmente se extendían, así como, ocasionales

colonias de células con morfología parecida a células endoteliales o epiteliales que desaparecieron en el curso de los sucesivos pasajes. Las células del cultivo primario lograron la confluencia a la quinta semana, los subsecuentes subcultivos tendían a tener un acelerado crecimiento, por lo que los cultivos alcanzaban la confluencia en corto tiempo entre 5 a 6 días.



A partir del tercer subcultivo, se obtuvo una población más homogénea, basado en la morfología de las células, características de células semejantes a fibroblastos con extensiones citoplasmáticas, núcleo ovalado, central con varios nucléolos, que permanecieron hasta el octavo pasaje.

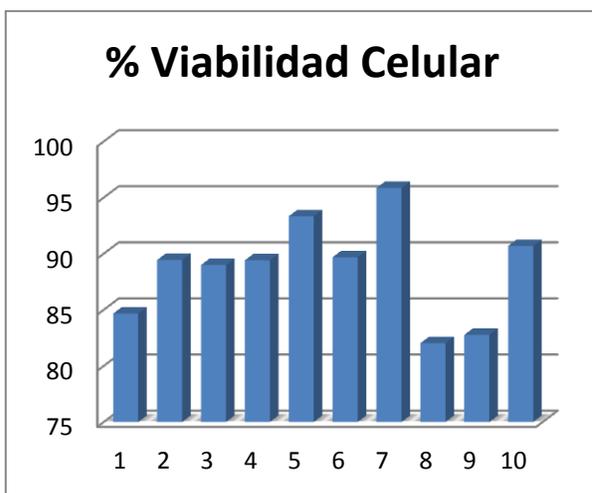
Sin embargo, se pudo evidenciar que la mayor proliferación celular se observó entre el sexto, séptimo y octavo subcultivo. Se observó que en el sexto y séptimo subcultivos además de la gran proliferación celular, la formación de agregados de células, del cual se irradian las células paralelas unas a otras.



Determinación de Viabilidad Celular.

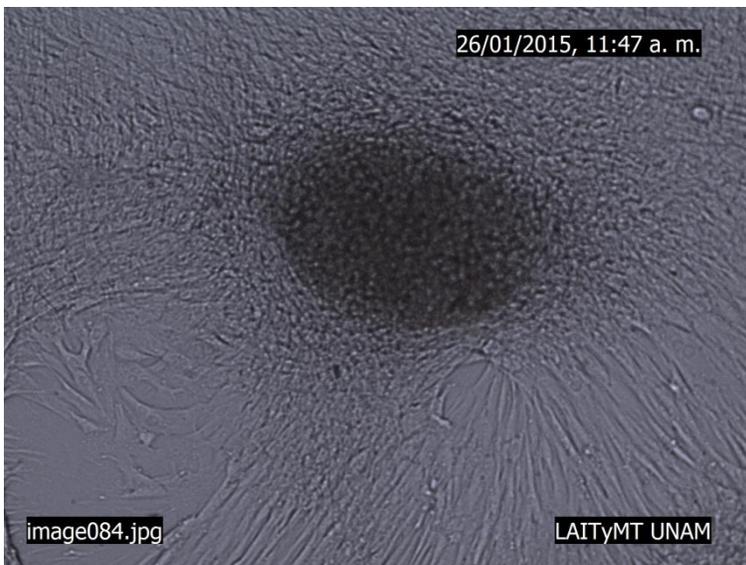
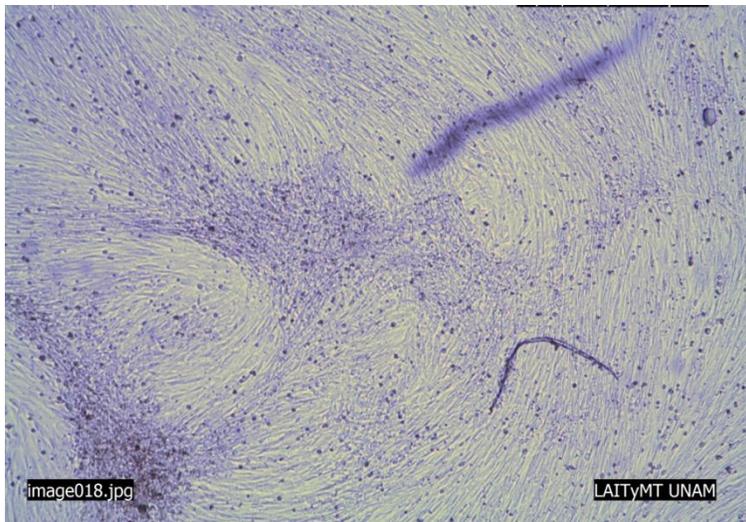
Durante el desarrollo experimental, se hicieron las cuantificaciones correspondientes a caja cultivo por muestra elaborada, de esta manera se encontró un porcentaje de viabilidad en promedio de 88.68%, siendo así un porcentaje de viabilidad bueno para la Ingeniería de Tejidos.

# Caja	Cantidad de Células Vivas	Cantidad de Células Muertas	Total de Células	% Viabilidad
Caja 1	138	25	163	84,66257669
Caja 2	127	15	142	89,43661972
Caja 3	202	25	227	88,98678414
Caja 4	76	9	85	89,41176471
Caja 5	238	17	255	93,33333333
Caja 6	113	13	126	89,68253968
Caja 7	185	8	193	95,85492228
Caja 8	73	16	89	82,02247191
Caja 9	72	15	87	82,75862069
Caja 10	185	19	204	90,68627451
Porcentaje Promedio de Viabilidad				88,68359077



Determinación de la eficiencia de formación de colonias de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana

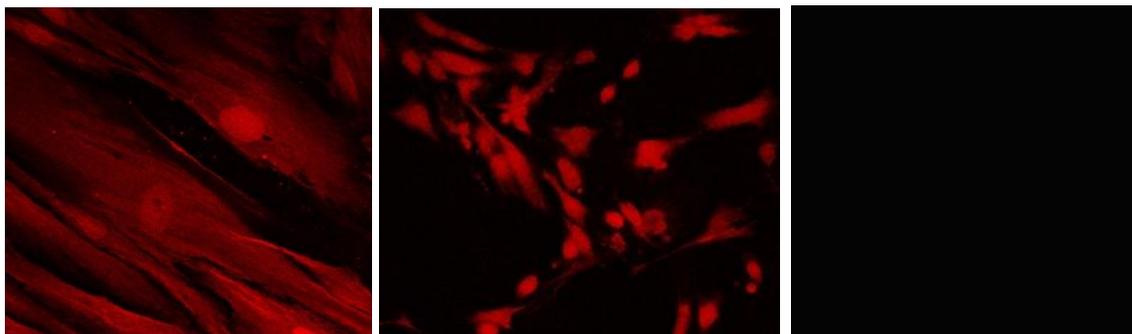
En los cultivos en monocapa de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana aisladas, las células fueron capaces de formar colonias a baja densidad. Las colonias estaban formadas por numerosas células adherentes, la morfología de las células típica de fibroblastos, fusiformes, alargadas, con un citoplasma claro y un núcleo ovalado central con varios nucléolos, que identifica la CFU-F. Demostrando su capacidad de renovación y eficiencia de formación de colonias.





Expresión de marcadores antigénicos de superficie celular para la identificación de las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana a través del análisis Inmunocitoquímico.

La identificación de las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana a través del análisis inmunocitoquímico de los cultivos de las células mesenquimales de la pulpa dentaria, se realizó utilizando los anticuerpos anti-STRO-1, anti-CD44 y el anti-CD45. Las células aisladas de la pulpa dental de terceros molares, del tercer pasaje, expresaron moléculas de superficie celular STRO-1 y CD44 (marcadores de células mesenquimales) "positivas", considerados dos marcadores tempranos de células madre mesenquimales, mientras el marcador específico para células hematopoyéticas, el CD45 (antígeno común de leucocitos) fue "negativo". La ausencia de expresión de este marcador, indica que en las células aisladas de la pulpa, no están presentes progenitoras hematopoyéticas. Se demuestra que estas células no derivan de fuentes hematopoyéticas sino son de origen mesenquimal. Estos resultados fueron consistentes para las distintas líneas celulares. Las células "positivas" a las moléculas de superficie STRO-1 y CD44 en las poblaciones de células aisladas, expresaron diferentes niveles de intensidad de expresión desde leve, moderada e intensa. Los marcadores no fueron uniformemente expresados, se encontraron en subgrupos de células, indicando que la población de células madre de pulpa dentaria es heterogénea. La morfología de las células que expresaron STRO-1 y CD44 "positivo" varió entre fusiforme, fusiformes con citoplasma ancho y formas no definidas. La presencia de células marcadas con STRO-1+, CD44+ y CD45-, confirma la existencia de células madre o progenitoras en las poblaciones de células de la pulpa dentaria humana aisladas.





Discusión:

El objetivo general del presente trabajo de investigación es establecer el cultivo de las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana. Sin embargo, la inducción a la diferenciación hacia diferentes linajes será publicado posteriormente, para cumplir con los criterios mínimos, para identificar a las células madre en la población de células aisladas. El primer obstáculo para el establecimiento exitoso del cultivo de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana fue la desinfección de los dientes para prevenir la contaminación. Por lo que los terceros molares pueden representar un origen valioso de células madre de pulpa dentaria humana. Para la obtención del tejido pulpar el calentamiento de los dientes mientras se cortan puede producir daño al tejido pulpar.

Caracterización de las células madre de la pulpa dental

Para confirmar que las células madre aisladas son células madre de origen mesenquimal, los autores las caracterizan con una serie de marcadores positivos o negativos, ya que no existe un marcador que caracterice exclusivamente las células madre de la pulpa dental.

Recientemente, en otro estudio se aislaron Stem Cells de ratas mediante distintos protocolos de cultivo (Waddington, Youde et al. 2009). Cultivaron células madre derivadas de cresta neuronal y positivas para STRO-1, CD31 (marcador de células madre adultas), CD44. Por otra parte, cultivaron células madre derivadas de médula ósea, y solo positivas para STRO-1, CD31 y fibronectina (Waddington, Youde et al. 2009).

En nuestro estudio, para confirmar el fenotipo de células madre mesenquimales en las células aisladas de la pulpa dental, empleamos una serie de marcadores positivos descritos en la bibliografía para células madre mesenquimales: STRO1, un marcador de células madre (Gronthos, Graves et al. 1994); y recientemente demostrado en células madre de la pulpa dental (Honda, Hirose et al. 2007); CD34, expresado dentro del sistema hematopoyético humano y sobre células madre, células progenitoras.



(Suchánek et al., 2010) Señalan que ellos no lograron aislar células madre de la pulpa dentaria, de dientes donde se separó la corona cortando en capas finas, sin enfriamiento, los autores suponen que la pulpa dentaria sufrió recalentamiento y un severo estrés mecánico, además lo consideran un método con un alto riesgo de contaminación. Mientras que si fueron capaces de aislar las células utilizando un fórceps Luers para fracturar las raíces y extraer la pulpa a través del conducto radicular o si la raíz no estaban completamente desarrolladas el foramen era ampliado y se extirpa la pulpa con una aguja por apical. En el presente trabajo para mantener la viabilidad de las células durante el corte de los dientes, se conservaron a baja temperatura y condiciones de humedad constante y en los casos de dientes con solo un tercio radicular formado, el tejido pulpar fue retirado por la raíz con sondas barbadas y colocado de inmediato en medio fresco, DMEM. Para el aislamiento de las células mesenquimales de la pulpa dentaria, la mayoría de los investigadores utilizan el método de disgregación enzimática, descrito por Gronthos y cols.

Para el análisis de la expresión de antígenos de superficie de las células mesenquimales de pulpa dentaria humana, a través de técnicas inmunocitoquímicas, para demostrar la presencia de células madre mesenquimales en la población de células aislada, se seleccionaron los anticuerpos anti- STRO-1, anti-CD44 y anti-CD45. Los resultados mostraron que las células aisladas de pulpa dentaria, del tercer pasaje expresaron moléculas de superficie celular STRO-1 y CD44 "positivos", también presentes en estudios previos en células madre mesenquimales de médula ósea y en células madre de pulpa dentaria humana de dientes permanentes y en dientes temporales exfoliados mientras, el marcador específico para células hematopoyéticas, el CD45, que reconoce el antígeno común de leucocito, monocitos y subgrupos de células T, fue "negativo". La ausencia de expresión de este marcador, indica que en las células aisladas de la pulpa, no están presentes progenitoras hematopoyéticas y coincide con los resultados de otras investigaciones. En particular, el STRO-1 es extremadamente importante en la selección de las células madre de la pulpa dentaria, solo las células STRO-1+ son capaces de



diferenciarse en células semejantes a odontoblastos, lo que indica la importación de estas células en el proceso de reparación.

En el presente estudio, en las poblaciones de células aisladas se identificaron células con características de células madre mesenquimales, como su capacidad de adherirse a las placas de cultivo, formar colonias altamente proliferativas, su morfología fusiforme y la expresión consistente de marcadores de superficie que caracteriza células madre mesenquimales adultas de pulpa dentaria. Sin embargo, faltaría determinar su capacidad de diferenciación para cumplir con los criterios básicos para definir las como células madre.



Conclusiones:

Nuestros resultados indican que las células derivadas de las fragmentaciones mecánicas de pulpas dentales humanas contienen subpoblaciones celulares, entre las cuales existen células progenitoras que expresan marcadores que las identifican como células madre postnatales.

Estas células madre derivadas de las pulpas dentales humanas, presentan una característica esencial que son clonogénicas y que pueden ser catalogadas como multipotenciales, con capacidad de diferenciación hacia un fenotipo mineralizante. Sin embargo, es necesario llevar más estudios para caracterizar el fenotipo al cual las células se han diferenciado con especial énfasis al fenotipo osteoblástico para pensar en un futuro en un uso potencialmente clínico en terapias de regeneración ósea.

Investigaciones en los últimos años han demostrado que posiblemente en las células pluripotenciales reside el futuro de la regeneración. El órgano dental ofrece un buen modelo de investigación, que nos brinda grandes posibilidades para el desarrollo de tecnologías que tienen que ver con las terapias de regeneración para el reemplazo de órganos. Por ahora, estos avances y conocimientos sólo se han producido en especies animales, pero esperamos que pronto sea una realidad el regenerar dientes y otros órganos humanos a partir de células con cantidades óptimas para el cultivo y un ambiente adecuado celular, en un laboratorio que cuente con las condiciones ideales.

Existen conflictos bioéticos, religiosos, sociales, políticos y económicos, además de obstáculos técnicos por superar e interrogantes científicas que resolver, antes de empezar a utilizar las células madre para aplicaciones terapéuticas de manera exitosa y segura. Debido a que en la actualidad hay algunos bancos privados que almacenan las células madre de la pulpa dental y prometen que éstas se conservarán para en un futuro sanar a la persona de cualquier tipo de enfermedad, no hay duda de que las células pluripotenciales tengan aplicación terapéutica en cierto tipo de enfermedades, pero estos tratamientos sólo se han experimentado generalmente en especies animales, sin embargo en el ser humano todavía no se ha obtenido un nivel mayor al 80%, por lo tanto debemos



tener cierto cuidado de no confiar en personas que carecen de principios éticos, que por intereses particulares, en lugar de curar al paciente de su enfermedad, le provocan patologías más severas y juegan con la salud, economía y vida de las personas.



Referencias Bibliográficas

- Alge, D. L., Zhou, D., Adams, L. L., Wyss, B. K., Shadday, M. D., Woods, E. J., ... Goebel, W. S. (2011). Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 4(1), 73–81. doi:10.1002/term.220.Donor-matched
- Almushayt, a, Narayanan, K., Zaki, a E., & George, A. (2006). Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Therapy*, 13(7), 611–20. doi:10.1038/sj.gt.3302687
- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A., & Gronthos, S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(7), 1787–95. doi:10.1634/stemcells.2007-0979
- Atari, M., Barajas, M., Hernández-Alfaro, F., Gil, C., Fabregat, M., Ferrés Padró, E., ... as als, . (2011). Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histology and Histopathology*, 26(8), 1057–1070. Retrieved from http://ufpi.br/subsiteFiles/ppgo/arquivos/files/Atari_et_al_2011_Isolation_of_pluripotent_stem_cells.pdf
- Barreto, J. . A. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos : una introducción Osseous Regeneration through Tissue Engineering :, 1, 98–109.
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2(4), 313–9. doi:10.1016/j.stem.2008.03.002
- Camassola, M., Maria, L., Macedo, G. De, Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2012). Somatic Stem Cells, 879, 491–504. doi:10.1007/978-1-61779-815-3
- Chen, B., Sun, H.-H., Wang, H.-G., Kong, H., Chen, F.-M., & Yu, Q. (2012). The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. *Biomaterials*, 33(20), 5023–35. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.057
- Cheng, P.-H., Snyder, B., Fillos, D., Ibegbu, C. C., Huang, A. H.-C., & Chan, A. W. S. (2008). Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. *BMC Cell Biology*, 9, 20. doi:10.1186/1471-2121-9-20
- Couple, M.-L., Farges, J.-C., Bleicher, F., Perrat-Mabillon, B., Boudeulle, M., & Magloire, H. (2000). Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Cells in



Explant Cultures. *Calcified Tissue International*, 66(2), 129–138.
doi:10.1007/PL00005833

Cr, R., Jt, M., Ma, B., Ht, M., & Clin-, C. D. L. (1999). Clinical evaluation of Bio-Oss : a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans, (1994), 421–428.

d'Aquino, R., De Rosa, A., Laino, G., aru so, ., Guida, L., Rullo, R., ... Papaccio, G. (2009). Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 312B(5), 408–15. doi:10.1002/jez.b.21263

d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., & Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death and Differentiation*, 14(6), 1162–71.
doi:10.1038/sj.cdd.4402121

d'Aquino, R., Tirino, V., & Desiderio, V. (2011). Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either in vitro or in vivo. *European Cells & Materials*, 21, 304–316. Retrieved from <http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol021/pdf/v021a23.pdf>

Engineering, T., & Series, R. (2006). Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view.

Estrela, C., Alencar, A., & Kitten, G. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental ...*, 22, 91–98. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-64402011000200001&script=sci_arttext&tIng=es

orri ol, ., & Esparza, R. (2008). Ingeniería tisular : aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica Tissue engineering : application of pluripotent stem cells in traumatology and orthopedic surgery, 19, 88–101.

Gaona, V., ri stina, M., Mas, R., Ángel, M., ortés, ., Son, Q. . É., ... é lulas, T. O. (2007). ¿ Qué son las células troncales o “ células madre ”?, 38, 81–104.

Goldberg, M., & Smith, a. J. (2004). Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: a Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(1), 13–27. doi:10.1177/154411130401500103



- Graziano, A., d'Aquino, R., Laino, G., & Papaccio, G. (2008). Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 21–6. doi:10.1007/s12015-008-9013-5
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Heerman, J., Boyde, A., ... Shi, S. (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531–535. doi:10.1177/154405910208100806
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–30. doi:10.1073/pnas.240309797
- Hern, P., & Dortic, E. (n.d.). Medicina Regenerativa - Células Madre Embrionarias y Adultas.
- Hilkens, P., Gervois, P., Anton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., ... Bronckaers, A. (2013). Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell and Tissue Research*, 353(1), 65–78. doi:10.1007/s00441-013-1630-x
- Hsu, S.-H., & Chang, J.-C. (2010). The static magnetic field accelerates the osteogenic differentiation and mineralization of dental pulp cells. *Cytotechnology*, 62(2), 143–55. doi:10.1007/s10616-010-9271-3
- Huang, G. T.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806. doi:10.1177/0022034509340867
- Ibáñez, R. R., & Estrada, K. N. A. (2012). Ingeniería Tisular en Odontología., LXIX(4), 164–167.
- Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Tomokiyo, A., Matsushita, K., & Nakashima, M. (2006). Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(11), 2493–503. doi:10.1634/stemcells.2006-0161
- Jesús, L., & Orta, G. (2011). Investigación con células madre de origen dentario . Actualización . Ciencia.
- Jo, Y.-Y., Lee, H.-J., Kook, S.-Y., Chung, H.-W., Park, J.-Y., Chung, J.-H., ... Chung, P.-H. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Engineering*, 13(4), 767–73. doi:10.1089/ten.2006.0192



- Kadar, K., Kiraly, M., Porcsalmy, B., Molnar, B., Racz, G. Z., Blazsek, J., ... Varga, G. (2009). DIFFERENTIATION POTENTIAL OF STEM CELLS FROM HUMAN DENTAL ORIGIN - PROMISE FOR TISSUE ENGINEERING, (22), 167–175.
- Kawashima, N. (2012). Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Archives of Oral Biology*, 57(11), 1439–58. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.08.010
- Khanna-Jain, R. (2012). Growth and Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Maintained in Fetal Bovine Serum, Human Serum and Serum-free/Xeno-free Culture Media. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 02(04). doi:10.4172/2157-7633.1000126
- Laino, G., Graziano, A., d'Aquino, R., Pirozzi, G., Lanza, V., Valiante, S., ... Papaccio, G. (2006). An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 206(3), 693–701. doi:10.1002/jcp.20526
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8493529>
- Liu, L., Ling, J., Wei, X., Wu, L., & Xiao, Y. (2009). Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells undergoing odontogenic/osteogenic differentiation. *Journal of Endodontics*, 35(10), 1368–76. doi:10.1016/j.joen.2009.07.005
- Marchionni, C., & Bonsi, L. (2008). Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *International Journal ...*, 22(3), 699–706. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/19822086>
- 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), 5807–12. doi:10.1073/pnas.0937635100
- Mrozik, K. M., Zilm, P. S., Bagley, C. J., Hack, S., Hoffmann, P., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2010). Proteomic characterization of mesenchymal stem cell-like populations derived from ovine periodontal ligament, dental pulp, and bone marrow: analysis of differentially expressed proteins. *Stem Cells and Development*, 19(10), 1485–99. doi:10.1089/scd.2009.0446
- aka tsuka, R., ozaki, T., e mura, Y., Matsuoka, Y., Sasaki, Y., Shinohara, M., ... Sonoda, Y. (2010). 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal



myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 55(5), 350–7. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.03.003

- Nam, H., & Lee, G. (2009). Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(1), 135–9. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.141
- Navabazam, A. R., Nodoshan, F. S., Sheikha, M. H., Miresmaeili, S. M., Soleimani, M., & Fesahat, F. (2013). Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament, 11(3), 235–242.
- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., ... Tano, Y. (2004). o rneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England Journal of Medicine*, 351(12), 1187–96. doi:10.1056/NEJMoa040455
- Papaccio, G., Graziano, A., d'Aquino, R., Graziano, M. ., Pirozzi, G., Menditti, D., ... Laino, G. (2006). Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *Journal of Cellular Physiology*, 208(2), 319–25. doi:10.1002/jcp.20667
- Paula-Silva, F. W. G., Ghosh, a, Silva, L. a B., & Kapila, Y. L. (2009). TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *Journal of Dental Research*, 88(4), 339–44. doi:10.1177/0022034509334070
- Pivoriūnas, A., Surovas, A., Borutinskaite, V., Matuzevicius, D., Treigyte, G., Savickiene, J., ... Magnusson, K.-E. (2010). Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells and Development*, 19(7), 1081–93. doi:10.1089/scd.2009.0315
- Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), 1075–9. doi:10.1038/nature04957
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., ... Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–55. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T.-J. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*, 34(2), 166–71. doi:10.1016/j.joen.2007.11.021
- Spath, L., Rotilio, V., Alessandrini, M., Gambará, G., De Angelis, L., Mancini, M., ... Papaccio, G. (2010). Explant-derived human dental pulp stem cells



enhance differentiation and proliferation potentials. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6B), 1635–44. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00848.x

Suchánek, J., Visek, B., Soukup, T., El-Din Mohamed, S. K., Ivancaková, R., Mokry, J., ... Omran, a. (2010). Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Kralove*, 53(2), 93–99.

Sylvester, K. G., & Longaker, M. T. (2004). Stem cells: review and update. *Archives of Surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, 139(1), 93–9. doi:10.1001/archsurg.139.1.93

Tirino, V., Paino, F., Rosa, A. De, & Papaccio, G. (2012). Somatic Stem Cells, 879, 443–463. doi:10.1007/978-1-61779-815-3

Wahl, D. A., & Czernuszka, J. T. (2006). COLLAGEN-HYDROXYAPATITE COMPOSITES FOR HARD TISSUE REPAIR, 11, 43–56.