



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTA DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ESTUDIO IN VITRO DE CÉLULAS MESENQUIMALES OBTENIDAS A PARTIR
DE PAPILA APICAL DE TERCEROS MOLARES HUMANOS. Y SU
DIFERENCIACIÓN AL LINAJE OSTEOGÉNICO.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

HERNÁNDEZ GONZÁLEZ ANA KAREN

DICTAMINADORES:

DIRECTOR: MTR. JOSÉ TRINIDAD CANO BROWN

ASESORES

DR. RAÚL ROSALES IBÁÑEZ

DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

AVENIDA DE LOS BARRIOS NÚMERO 1, COLONIA LOS REYES IZTACALA
TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, C.P. 54090, FEBRERO 2016

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares
humanos.



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.

CONTENIDO

Resumen	7
Introducción	9
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivos	12
Marco teórico	13
Células mesenquimales: Concepto y clasificación	14
Células mesenquimales de origen dental: Concepto y clasificación	16
Fuentes de obtención de células mesenquimales de origen dental	16
Células mesenquimales de papila apical (SCAPs)	19
Embriología e histología de la papila dental	20
Características principales reportadas de las SCAPs	22
Plasticidad al linaje Osteogénico	28
Biomateriales: características del andamio	29
Andamio de quitosano y poli-lisina	30
Biocompatibilidad	31
Metodología	33
Obtención del órgano dentario	33
Cultivo celular	34
Método de Separación celular, para pases subsecuentes	37
Purificación celular mediante Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)	39
Obtención del Inmunofenotipo	43

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Determinación de la viabilidad celular _____	44
Ensayos de proliferación por absorbancia (MTT Y AlamarBlue) _____	46
Ensayos de viabilidad celular mediante fluorescencia (Live & Dead, DAPI Y Edu proliferation) _____	48
Diferenciación Osteogénica _____	52
Tinción de Diferenciación Osteogénica con Von Kossa _____	53
Tinción de Diferenciación Osteogénica con Rojo de Alizarina _____	54
Marcadores de membrana con osteopontina _____	54
Ensayo con QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit _____	55
Resultados _____	57
-Cultivo primario y caracterización morfológica de las células mesenquimales de papila apical _____	57
-Expresión de marcadores antigénicos de superficie celular _____	59
-Ensayos in vitro de andamios quitosano/polil-isina y células cultivadas en pocillos ____	60
-Ensayo de Proliferación celular con MTT _____	60
-Ensayo de Proliferación Celular con Alamar Blue _____	61
-Ensayo con Live & Dead de SCAPs cultivadas en pocillos _____	62
-Ensayo con Live & Dead de SCAPs cultivadas en andamios quitosano/polil-isina ____	63
-Comparación de la viabilidad de SCAPs cultivadas en pocillos y andamios quitosano/polil-isina con calceína-AM. _____	64
-Ensayo Edu Proliferation con Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 _____	65
-Diferenciación al linaje osteogénico _____	66
-Tinción de iones cálcicos con Von Kossa _____	66
-Tinción con Rojo de Alizarina _____	67
-Fosfatasa alcalina. _____	68
-Marcador de superficie con Osteopontina día 21 _____	69

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Discusión	70
Conclusiones	74
Referencias.	76

*Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano.
Isaac Newton*

*Saber que se sabe lo que se sabe
y que no se sabe lo que no se sabe;
he aquí el verdadero saber.
Confucio*

Agradecimientos

A mis padres: Por brindarme su apoyo y amor incondicional, por fomentarme valores y tradiciones que hoy me distinguen. Y por su enorme comprensión.

A mi hermana Karlita: que siempre me da ánimos cuando estoy a punto de desistir, por ser mi motivo para querer ser una mejor persona y un buen ejemplo para ella.

A toda mi familia por comprender cuándo no podía estar con ellos el tiempo suficiente en las reuniones familiares. Ustedes saben que los amo.

A mis amigos de la Universidad, en especial a ti Gerardo que me invitaste a la conferencia del Doctor Raúl Rosales y por animarme a realizar mi servicio social en el Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional, en donde termine enamorada de la Ingeniería Tisular, a ti Araceli mi segunda hermana, por estar a mi lado en todo momento.

Al Doctor Raúl Rosales por ser un excelente maestro, por compartir sus conocimientos y experiencia, por saberme guiar y así poder concluir este trabajo y sobre todo, por mostrarme que la odontología no solo es clínica, que aún hay un potencial por explorar y explotar en este campo.

Al Maestro José Cano Brown, director del presente trabajo, por toda su paciencia, por su apoyo incondicional, por compartir su experiencia conmigo y sobre todo por confiar en mí.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, especialmente a Michell y Arely que siempre me acompañaron y ayudaron en las pruebas experimentales.

Al Doctor Luis Ignacio Terrazas, a la Maestra Yadira Ledesma Soto por su disponibilidad y tiempo para apoyarnos con algunas técnicas y facilitarnos el uso de su equipo y materiales.

A los profesores Arely Martínez, Álvaro González Aragón, Alberto Galindo y Rosario Morales de la Luz, por su ayuda en histología, estadística y en la obtención de los molares

A mi Universidad, a la Facultad, a todos mis profesores por formarme profesionalmente.

A todos mil gracias.

Resumen

La Medicina Regenerativa ha tenido su auge mediante técnicas como la Regeneración Tisular Guiada y sus diversos tipos de injertos, sin embargo, algunas situaciones como escasez de donantes, el rechazo del paciente con respecto al injerto han mermado el uso de estos y han llevado a la necesidad de perfeccionar e innovar técnicas para la restauración del tejido dañado. Actualmente la Ingeniería de Tejidos mediante el uso de células mesenquimales, biomateriales y moléculas señalizadoras y los estudios *in vitro* e *in vivo* para finalmente llevarlo a la clínica, todo esto con el propósito de la regeneración de tejidos.

Desde el descubrimiento de las células mesenquimales de médula ósea (Fredeinstein 1968), cordón umbilical y células embrionarias, se ha intensificado la búsqueda de diversas fuentes de células mesenquimales con ventajas sobre las 3 mencionadas anteriormente.

En la cavidad bucal se puede encontrar alrededor de 10 fuentes de células mesenquimales, la primer población de células mesenquimales en ser caracterizadas fueron las de la pulpa dental (Gronthos *et al.*, 2000).

Sonoyama *et al.*, 2006 caracterizó a las células mesenquimales de papila apical o SCAPs por sus siglas en inglés (Stem Cells of Apical Papilla), posteriormente diversos estudios también demostraron su capacidad de diferenciación a principalmente a 5 linajes (osteogénico, odontogénico, adipogénico, condrogénico y neurogénico), su capacidad de proliferación, biocompatibilidad con diversos andamios, características que las hacen idóneas para su utilización en la Ingeniería de Tejidos.

Metodología: En el presente trabajo se aisló y cultivó papila apical de terceros molares inmaduros humanos, en total de 10 muestras de pacientes entre 17 y 19 años con técnica de disgregación mecánica. Para obtener una población homogénea

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

de células mesenquimales, se realizó purificación celular con anticuerpo CD44 mediante sistema de MACS (Magnetic Activated Cell Sorting), para determinar la viabilidad y proliferación celular se realizaron ensayos en dos grupos: SCAPs sembradas en pocillos y en andamios de quitosano/poli lisina con Live & Dead, MTT, Alamar Blue, DAPI y EDU Proliferation. Para demostrar su capacidad de diferenciación las muestras se mantuvieron durante 28 días con medio osteoinductor (dexametasona, L-glutamina, ácido ascórbico, penicilina y estreptomina, suplemento de crecimiento de células mesenquimales y β -glicerofosfato), posteriormente se realizaron tinciones con Von Kossa, Rojo de Alizarina. Fosfatasa Alcalina por observancia y marcador de superficie con Osteopontina.

Resultados: A la 2^{da} semana de cultivo, los explantes de papila apical se comenzaron a observar células con morfología de huso, a la 5^{ta} semana ya había formación de unidades formadoras de colonias, la viabilidad y proliferación de SCAPs resulto ligeramente mayor en los andamios de Quitosano/Poli-lisina con respecto a los pocillos, la tinción con Von Kossa, Rojo de Alizarina, Actividad de Fosfatasa Alcalina, e inmunofluorescencia con Osteopontina resultaron positivas, confirmando la diferenciación al linaje osteogénico.

Introducción:

Desde tiempos inmemoriales, el hombre ha sentido la necesidad de reemplazar los tejidos perdidos, ejemplo de esto es la cultura maya, quienes fueron los primeros en realizar injertos aloplásticos *in vivo*, para reemplazar órganos dentarios, utilizando implantes de concha. Así lo muestran los estudios realizados a una mandíbula encontrada en Honduras y que data del año 400 (1).

Actualmente, la Medicina Regenerativa ha alcanzado un gran interés, nacional e internacionalmente, y al mismo tiempo ha sido implementado por distintas técnicas como la Regeneración Tisular Guiada con sus diferentes tipos de injertos y en los últimos años por la Ingeniería Tisular, término utilizado desde 1987. La Ingeniería Tisular tiene por objetivo la construcción de tejidos a partir de células madre y biomateriales. Las primeras células madre mesenquimales fueron caracterizadas como una subpoblación celular de médula ósea por Friedenstein en 1968, quien las aisló y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (2), posteriormente se descubrieron células madre de cordón umbilical y células embrionarias. En el año 2000 Gronthos *et. al.*, (4) aisló las primeras células mesenquimales de origen dental y las denominó Dental Pulp Stem Cells (DPSC). Este estudio fue trascendental para la comunidad odontológica, ya que después de este trabajo se encontraron otras fuentes de obtención de células mesenquimales a partir de tejido dental, lo que involucra un gran avance ya que su obtención es más fácil, en comparación con células mesenquimales de tejido óseo, cordón umbilical y embrionarias, ya que estas últimas el aislamiento y uso es difícil y éticamente controvertido.

En los últimos años se ha prestado mayor atención a las otras fuentes de origen dental que contienen células mesenquimatosas, como al tejido blando situado en los ápices del Órgano Dental permanente en formación llamada papila apical.

Las células mesenquimales de papila apical o SCAPs por sus siglas en inglés (Stems Cells of Apical Papilla), fueron aisladas por primera vez por Sonoyama *et al.*, en 2006 (9). En este estudio se demostró una mayor actividad para diferenciarse hacia varios linajes como son el adipogénico, el osteogénico y el dentinogénico.

Las SCAPs han demostrado que son de fácil acceso y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una notable capacidad de diferenciación, y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular. (9)

Por lo tanto, las SCAPs son una fuente valiosa de células mesenquimales en la Medicina Regenerativa para solucionar los problemas de carácter óseo por enfermedad periodontal, quistes odontogénicos, esto a nivel bucal, o defectos óseos a nivel craneofacial.

De acuerdo con su potencialidad las SCAPs y la importancia con que se han ido desarrollando las mismas dentro de la Medicina Regenerativa, pueden ser utilizadas cada vez con mayor frecuencia, motivo por el cual se desarrolló la presente tesis.

Justificación:

La indagación ha sido poca acerca de las células mesenquimales de papila apical (SCAPs), en comparación a la atención que se le ha otorgado a las otras fuentes de obtención como lo son de medula ósea, cordón umbilical, embrionarios y de otras fuentes de origen dental. Sin embargo, las células mesenquimales de origen dental tienen la ventaja en comparación a los tres primeros mencionados, de que se obtienen durante una consulta de rutina, mediante una pequeña cirugía ambulatoria no incapacitante.

El potencial de proliferación y diferenciación que han demostrado las SCAPs (9) hacia otros linajes las hacen idóneas para su posterior utilización clínica, además de ser la progenitora del complejo dentino-pulpar, lo que la hace una fuente prometedora de células mesenquimales en el área de la Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa, también ha demostrado ventajas importantes sobre las otras fuentes de células mesenquimales. Varios estudios sugieren que las SCAPs al ser derivados de un tejido en desarrollo puede representar una población de progenitores tempranos que tienen ventajas para su uso en la regeneración de tejidos. Estos datos apoyan la noción de que las SCAPs son una población única de células Mesenquimales postnatales.

En esta tesis se pretende como objetivo primordial el aislamiento de células mesenquimales de papila apical como una alternativa de obtención de células mesenquimales posnatales. Por ello, nos planteamos estudiar la técnica de cultivo mediante disgregación mecánica, de igual manera la realización de ensayos de viabilidad y proliferación *in vitro*, y su diferenciación al tejido osteogénico para su futura utilización clínica.

Hipótesis

La papila apical entre sus componentes celulares existen células mesenquimales, positivas al anticuerpo CD44

Objetivos:

Objetivo general: Obtener células mesenquimales a partir de papila apical de terceros molares inmaduros humanos.

Objetivos específicos:

- Cultivar tejido de papila apical de terceros molares inmaduros humanos.
- Corroborar las características morfológicas de las células mesenquimales presentes en papila apical.
- Aislar células mesenquimales de papila apical de terceros molares inmaduros.
- Confirmar los marcadores de membranas correspondientes a las células mesenquimales de papila apical.
- Realizar pruebas de viabilidad y proliferación en andamios de quitosano/ poli-lisina (MTT, Alamar Blue, Live & Dead)
- Inducir las células mesenquimales de papila apical a linaje osteogénico.
- Realizar ensayos de mineralización (tinción con Von Kossa, Rojo de Alizarina, Actividad de Fosfatasa Alcalina por absorbancia y marcador de superficie con Osteopontina)

Marco teórico

El deseo de recuperar los tejidos perdidos ha sido un tema de inquietud para el hombre desde tiempos inmemorables, muestra de esto son los restos antropológicos de implantes dentales, colocados *in vivo*, de la cultura maya, encontrados en la Playa de los Muertos de Honduras por el arqueólogo Popenoe, en 1931, quien descubrió una mandíbula, que data del año 400, con tres fragmentos de concha de Sagaamote introducidos en los alvéolos de los incisivos. Los estudios radiológicos determinaron la osteointegración de los implantes, haciendo suponer que dichos fragmentos se introdujeron en vida. **(Fig.1)**



Fig. 1: Mandíbula, que data del año 400, con tres implantes de concha de la cultura Maya.

Existen antecedentes similares en el antiguo Egipto, donde se trasplantaban dientes humanos y de animales, e implantes de piedras y metales preciosos (1).

La Ingeniería de Tejidos es una ciencia multidisciplinaria que combina el conocimiento y tecnología del cultivo celular, la ingeniería de materiales y factores bioquímicos para crear órganos y tejidos artificiales ó para regenerar tejidos dañados (3).

La triada de la Ingeniería Tisular, se compone por tres elementos:

1- Células, 2- Andamios y 3-Factores de crecimiento y generalmente también referidos como la llave de los componentes de la Ingeniería Tisular (6,7).

Células mesenquimales: Concepto y clasificación.

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Las células mesenquimales están consideradas como uno de los futuros más prometedores en la Medicina Regenerativa y en la Ingeniería Tisular. Esta disciplina médica se basa fundamentalmente en los nuevos conocimientos sobre las células mesenquimales y en su capacidad de diferenciarse en distintos tejidos.

Actualmente se están desarrollando investigaciones para su estudio y para determinar sus posibles aplicaciones tanto en la Medicina Regenerativa como en el campo de la Ingeniería Tisular, que tiene por objetivo la construcción de tejidos nuevos, funcionalmente activos, a partir de células procedentes de cultivos y de biomateriales que funcionan como un soporte.

Cabe destacar que varios estudios han asignado a este grupo celular con diversos nombres como: Células de Estroma Medular, Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (CFU-F), Precursores Estromales, Células Adultas Progenitoras Multipotentes o MAPCs (Multi-Potent Adult Progenitor Cells), Células Madre Mesenquimales, Células Troncales o en inglés Stems Cells (11). En este trabajo se les referirá como células mesenquimales.

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (Internacional Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales (12):

- Primero, éstas células deben ser adherentes en cultivo
- Segundo, expresar los antígenos $CD73^+$, $CD90^+$ y $CD105^+$, en el caso de células mesenquimales de origen dental $CD 44^+$ Y $STRO-1^+$ y $CD34^-$, $CD45^-$.
- Tercero, las Células Mesenquimales deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo.

Por todo lo mencionado anteriormente, se puede definir a las células mesenquimales como células indiferenciadas que tienen capacidad para autorenovarse, ser clonogénicas y diferenciarse en distintas estirpes celulares.

Clasificación

Se pueden clasificar según su origen: embrionarias y adultas; según el nicho en donde se encuentran y la potencialidad de diferenciación (13,14).

1. Según el origen:

- *Origen embrionario*. Poseen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula (totipotentes), contando así con un enorme potencial para la regeneración tisular.
- *Origen adulto*. También son denominadas células madre postnatales. Son multipotentes y sobre ellas cabe destacar que su potencial de diferenciación queda restringido a la capa embrionaria de la que procedan.

2. Según en el nicho en que se encuentra.

El nicho, se compone de aquellos elementos que rodean a la célula troncal cuando se encuentra en su estado nativo. Encontramos nichos en las siguientes localizaciones: médula ósea, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, folículo piloso, intestino, sistema nervioso y órgano dentario.

3. Según el potencial de diferenciación:

- *C.M. totipotentes*. Son aquellas capaces de originar un embrión y un individuo completo, diferenciándose hacia cualquier estirpe celular.
- *C.M. pluripotentes*. Tienen la capacidad de poder desarrollar todos los tejidos de un ser humano, con excepción al tejido extraembrionario.
- *C.M. multipotentes*. Pueden originar un subconjunto de tipos celulares.
- *C.M. oligopotentes*. Al igual que las anteriores, pueden desarrollar un conjunto de tipos de celulares, pero mucho más reducido.
- *C.M. unipotentes*. Con capacidad para diferenciarse en un único tipo celular.

Células mesenquimales de origen dental: Concepto y clasificación.

Células Mesenquimales Dentales (C.M.D.): Son Células Mesenquimales (C.M.) que poseen potencial de multidiferenciación y por tanto pertenecen al grupo de C.M.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

adultas (postnatales), teniendo la capacidad de formar células con carácter osteo/odontogénico, adipogénico, condrogénico y neurogénico.

Se ha reportado la existencia de 10 fuentes de células mesenquimales de origen dental:

1.- Células mesenquimales de pulpa dental o Dental Pulp Stem Cells (DPSCs).

La pulpa dental contiene una población de células mesenquimales, a veces referido como células odontoblásticas, ya que estas células parecen sintetizar y secretar matriz de dentina como los odontoblastos.

Estas células fueron aisladas por primera vez a partir de terceros molares permanentes en el 2000 por Gronthos *et al.*, (4) presentando un potencial de diferenciación para otros tejidos *in vitro* tales como: odontoblastos, adipocitos, condrocitos y osteoblastos.

En estudios *in vitro* de DPSCs se ha demostrado producir nódulos de calcificación y en estudios *in vivo*, pueden formar tejidos semejantes a la dentina con una forma irregular (4,5).

2. Células mesenquimales del ligamento periodontal o Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSC).

Las células mesenquimales del ligamento periodontal (PDLSCs) fueron caracterizadas por Seo *et al.*, 2004 (15). Demostrando el potencial de PDLSC para desarrollar otros linajes celulares como cementoblastos, adipocitos y células de colágeno tanto *in vitro* como *in vitro* (15).

3. y 4. Células mesenquimales de dientes temporales exfoliados (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED) y células mesenquimales de dientes temporales con raíces completos.

Las células mesenquimales de los dientes deciduos exfoliados humanos llamados (SHED; Miura *et al.*, 2003). Se han aislado de la pulpa de los incisivos deciduos

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

humanos y mostraron una alta plasticidad, ya que podrían diferenciarse *in vitro* en neuronas, adipocitos, osteoblastos y odontoblastos. *In vivo* las SHEDs pueden inducir la formación de hueso o dentina, pero a diferencia de la pulpa dental, no pudo producir el complejo dentino-pulpar. Diversos estudios refieren que las SHEDs tienen una mayor capacidad de diferenciarse en una variedad de tipos celulares, mayor tasa de proliferación en comparación con DPSCs, afirmando que son un tejido más inmaduro, y con una clara ventaja ya que ofrecen la recolección de células mesenquimales sin dolor con mínima invasión, ya que se recuperan de un tejido considerado desechable y de fácil acceso (16,17).

5. Células mesenquimales de papila apical o Stem Cells of Apical Papilla (SCAP).

La papila dental, es un tejido importante durante la odontogénesis, puesto que es el tejido formador de la pulpa dental y la dentina radicular, los primeros estudios de las células de papila dental humana fueron realizados por Shteyer *et al.*, en 1987, inicialmente llamadas: Human Dental Papilla (HDP) reportaron la capacidad de diferenciarse a tejido osteogénico y odontogénico (18,19).

Sonoyama *et al.*, en el 2006 (9), realizó la caracterización total de las células mesenquimales de papila apical (SCAPs), en este estudio se demostró una mayor actividad para diferenciarse hacia diferentes linajes como son el adipogénico, condrogénico, osteogénico y el dentinogénico (9,30).

6. Células mesenquimales del folículo dental o Dental Follicle Precursor Cells (DFPC).

El folículo dental ha sido considerado como un tejido multipotente, basado en su capacidad de generar cemento, hueso y ligamento periodontal. Estas células se pueden mantener en cultivo durante al menos 15 pasajes. DFPCS pueden diferenciarse en cementoblastos *in vitro* y son capaces de formar cemento *in vivo*.

Las células del folículo dental tienen la capacidad de formar ligamento periodontal después de la implantación *in vivo* (20, 21).

7. Células mesenquimales del germen dental (human Tooth Germ Stem Cells (hTGSCs)).

Se han reportado en la última década que los gérmenes de los dientes humanos contienen células pluripotentes que dan lugar a estructuras dentales y periodontales. Las células mesenquimales del germen dental mostraron la capacidad de diferenciarse en osteogénico, adipogénico y neurogénico (22).

8.- Células mesenquimales de mucosa oral.

Yang et al., (2013) aisló por primera vez a una población dentro de los tejidos gingivales las cuales denomino Gingival Mesenchymal Stem Cells (GMSC) con la capacidad de formar colonias clonogénicas, son sensibles a marcadores superficiales que corresponden a las células mesenquimales y poseen la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes mesodérmicos (23).

Además de su capacidad de autorenovación y formación de estructuras como tejido conectivo, las GMSCs tienen propiedades regenerativas y tienen funciones inmunorreguladoras (24).

9. Células mesenquimales de dientes supernumerarios. (stem cells from a supernumerary tooth).

Huang et al., (2008) (25) aisló células mesenquimales de pulpa dental a partir de mesiodens, en estudios anteriores se ha aislado este mismo tejido pero de terceros molares (4), este estudio dio pauta a una diferente fuente de aprovechamiento como lo son los dientes supernumerarios.

Los resultados de *Huang et al.*, sugieren que la pulpa dental de mesiodens tienen características comunes a las DPSCs de terceros molares, lo que las convierte como una fuente viable en la regeneración de tejidos.

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

10. Células mesenquimales de la Bola de Bichat (Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad).

Broccaioli *et al.*, (2013) (26) aisló células mesenquimales obtenidas de la grasa encapsulada encontrada en los carrillos, comúnmente denominado bola de Bichat. Este tejido expreso características de células mesenquimales como positividad a marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, negativo CD14, CD31, y CD34, diferenciación al tejido osteogénico y adipogénico, demostrando así su potencialidad en la regeneración de tejidos.

CÉLULAS MESENQUIMALES DE PAPILA APICAL (SCAPs)

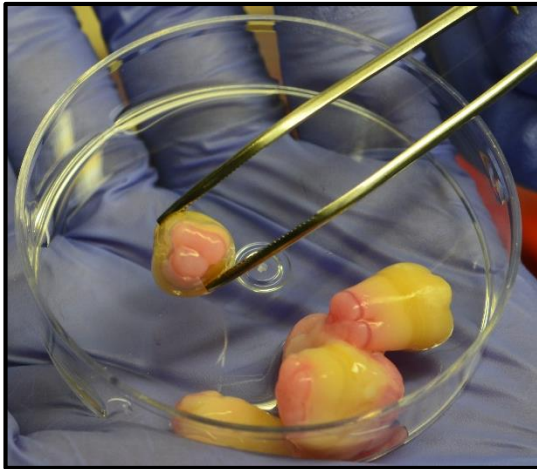


Fig. 2: Terceros molares en formación, con papila apical. Obtenidos en la clínica Odontológica Cuauhtepc FESI

En este trabajo se hace referencia a las células mesenquimales de papila apical por lo que, se hace mención del desarrollo embriológico y las características reportadas en los últimos años.

La papila apical es el tejido blando situado en los ápices del diente permanente en desarrollo. **(Fig. 2)**

Se puede clasificar a las SCAPs como células clonogénicas, postnatales, multipotentes con nicho en el órgano dentario en formación.

Embriología e histología de la papila dental.

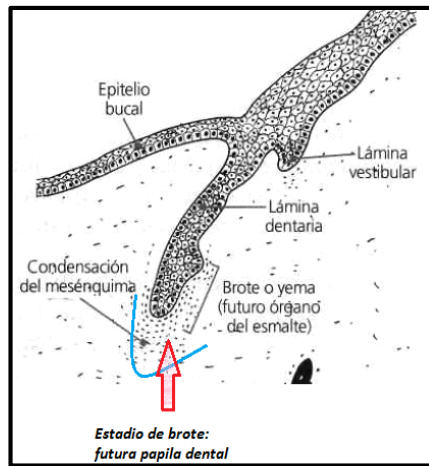


Fig.3: Estadio de brote o yema dentaria de la dentinogénesis

En el estadio de casquete se forma una concavidad en la yema dentaria y encierra una pequeña porción de células del ectomesénquima que lo rodea y estas células pertenecen a la papila dentaria, en este estadio la papila dentaria es encargada de la nutrición del órgano de esmalte, hasta cuando se comienzan a depositar las primeras laminillas de dentina, es entonces cuando se corta la fuente de nutrientes del órgano del esmalte proveniente de la papila. **(Fig. 4)**

La papila apical se origina del ectomesénquima, el primer vestigio de la papila dental se forma en el estadio de brote de la odontogénesis, las células del ectomesénquima se encuentran subyacentes y por debajo del epitelio de revestimiento y alrededor del brote o yema, estas células pertenecerán en un futuro a la papila dental. **(Fig.3)**

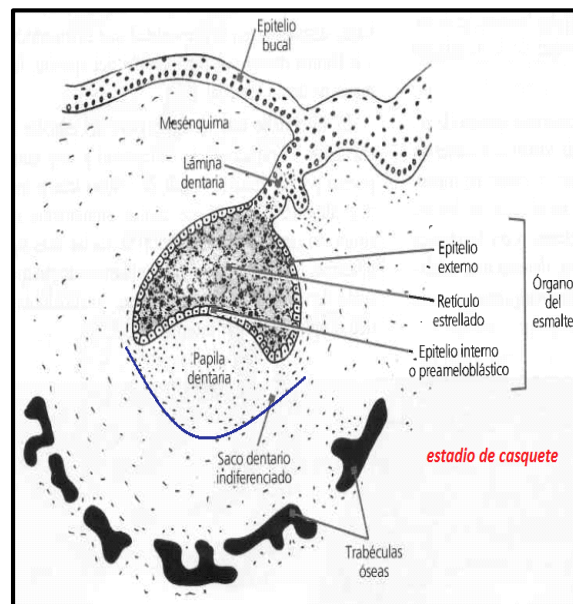
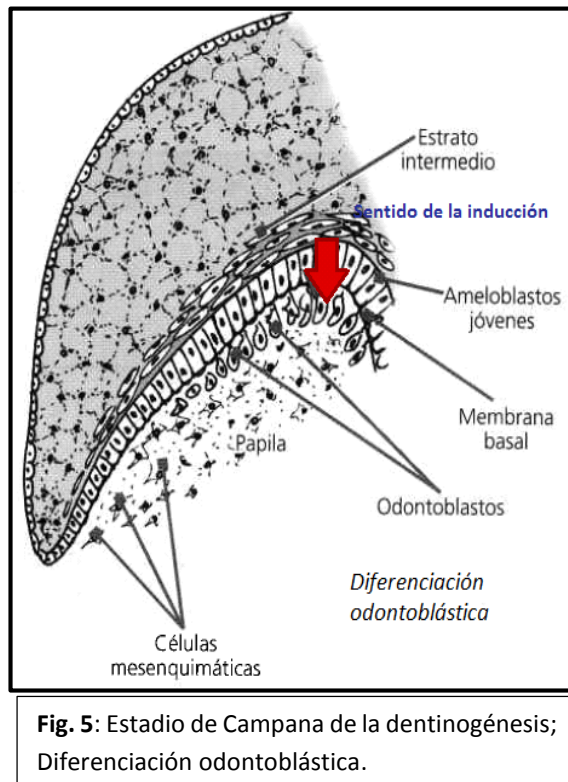


Fig. 4: Estadio de casquete inicial de la dentinogénesis

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.



Al avanzar en el estado de campana, los ameloblastos jóvenes ejercen su influencia inductora sobre la papila dentaria. Las células superficiales ectomesenquimáticas indiferenciadas (totipotentes) se diferencian en odontoblastos que comenzarán luego a sintetizar dentina. En este momento los ameloblastos jóvenes en vías de diferenciación están separados de los odontoblastos por la membrana basal. A través de la 1ª membrana pasan los nutrientes desde la papila hacia el epitelio interno o ameloblástico. **(Fig.5)**

Como consecuencia del depósito dentinario, la nutrición de los ameloblastos se realiza ahora a expensas del estrato intermedio y no de la papila, como ocurría al iniciarse este período, previo a la dentinogénesis

Cuando se forma dentina, la porción central de la papila se transforma en pulpa dentaria. La zona central de la papila se caracteriza ahora por presentar fibroblastos jóvenes con abundante sustancia fundamental, principalmente ácido hialurónico y condroitín sulfato.

La inervación se establece en forma precoz. Delgadas prolongaciones nerviosas, dependientes del Trigémino, se aproximan en los primeros estadios del desarrollo dentario, pero no penetran en la papila hasta que comienza la dentinogénesis. Existen factores tróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de la glía

(GDNF) que se relacionan con el comienzo y el desarrollo de la inervación sensorial en la papila dental y con el crecimiento de los axones pulpares.

Con respecto a la irrigación, se ha visto que agrupaciones de vasos sanguíneos penetran en la papila en la etapa de casquete. A medida que avanza el desarrollo, los vasos se ubican preferentemente en el lugar donde se formará la raíz o raíces.

Tanto la inervación, como la irrigación presentan dos variedades, una destinada al folículo dental y la otra a la papila, donde los vasos y nervios atraviesan el folículo dental para distribuirse por la misma.

Durante el Desarrollo y formación del patrón radicular, la vaina epitelial de Hertwig induce a la papila dental, para que se diferencien en la superficie del mesénquima papilar y los odontoblastos radiculares. Cuando se deposita la primera capa de dentina radicular, la vaina de Hertwig pierde su continuidad, es decir, que se fragmenta y forma los restos epiteliales de Malassez. La causa de la fragmentación y desplazamiento de la vaina se debería a la falta de aporte nutritivo que las células recibían desde la papila.

Al completarse la formación radicular, la vaina epitelial se curva hacia adentro (en cada lado) para formar el diafragma (27).

Debido a su desarrollo embrionario, las SCAPs son responsables de dar origen al complejo dentinopulpar y son las precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular (27,28, 29).

Características principales reportadas de las SCAPs.

En el 2006 Sonoyama *et al.*, fueron los primeros investigadores en obtener células mesenquimales de papila apical y ligamento periodontal con el método de digestión enzimática con colagenasa y dispasa, para después generar un complejo periodontal denominado «bio-raíz», en donde utilizaron células mesenquimales de

la papila apical y aquellas provenientes de ligamento periodontal, para una posterior colocación de una corona de porcelana en cerdos. Estas dos poblaciones celulares fueron trasplantadas a un biomaterial (con forma similar a una raíz) de hidroxiapatita/ fosfato tricálcico (HA/TCP), a los dos meses el lugar del trasplante fue abierto quirúrgicamente para la colocación de una corona de porcelana, cuya resistencia compresiva fue menor en comparación con la natural, aunque de igual manera, capaz de soportar la incorporación de una corona y realizar funciones normales. Al final del estudio experimental, se pudo demostrar la presencia de ligamento periodontal y un tejido mineralizado parecido a la raíz (9).

Las SCAPs tienen la capacidad de formación de grupos celulares clonogénicas adherentes a la caja de cultivo (CFU-F, unidad de formación de colonias, fibroblástica), similar a las observadas para diversas poblaciones de células madre mesenquimales.

En diversos estudios las SCAPs expresaron diversos marcadores de superficie incluyendo STRO-1, ALP, CD24, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 y ALP, pero fueron negativos para CD34, CD45, CD18 y CD150. En este estudio se encontró que CD24 parece ser un marcador específico de SCAPs, no detectable en otras células madre mesenquimales incluyendo DPSCs y BMMSCs. Pero en respuesta a las condiciones de inducción osteogénica, las SCAPs comienzan a regular a la baja la expresión de CD24 mientras que gana expresión de ALP (9, 29, 30, 31).

Se observa la acumulación de iones de calcio *in vitro* después de 4 semanas de inducción al linaje osteogénico, mediante rojo de alizarina.

Las SCAPs también demostraron ser capaces de diferenciarse en otros tipos de células tales como los adipocitos, pero en mayor cantidad hacia linaje osteogénico y dentinogénico.

Esta población celular expresa altos niveles de survivina y telomerasa, que son ambas moléculas importantes en la mediación de la proliferación celular.

Esta evidencia sugiere que SCAPs al ser derivadas de un tejido en desarrollo puede representar una población de progenitores tempranos que tienen ventajas para su uso en la regeneración de tejidos.

Estos datos apoyan la noción de que SCAPs son una población única de células Mesenquimales postnatales.

En el 2008, Sonoyama *et al.*, (30) realizaron un trabajo comparativo, en donde cultivó Células Mesenquimales de Papila Apical (SCAPs), Células Mesenquimales de Pulpa Dental (DPSCs) y Células Madre de la Médula Ósea (BMMSCs) con método de digestión enzimática. Posteriormente a los 3 cultivos se marcaron con bromodesoxiuridina (BrdU, indicador de la proliferación celular), se indujeron a linaje osteogénico, dentinogénico y adipogénico.

Reportando así que la papila apical contiene de dos a tres veces más células marcadas con BrdU positivas en comparación con la pulpa dental del mismo diente.

La acumulación de calcio en cultivos de SCAPs y DPSCs es comparable a la de BMMSCs, mientras que el potencial adipogénico de SCAPs y DPSCs es menor en comparación con BMMSCs.

Estudios comparativos posteriores *in vitro*, entre SCAPs y DPSCs, indicaron que SCAPs mostró una tasa de proliferación y mineralización significativamente más alta, al ser inducida al tejido osteogénico, en comparación con DPSCs, lo que la hacen una fuente de importancia para su uso en ingeniería de tejidos (32).

Ke Chen *et al.*, (33) realizaron un estudio comparativo entre SCAPs y células mesenquimales de ligamento periodontal (PDLSCs); las primeras mostraron una tasa de proliferación significativamente mayor y la capacidad de formación de colonias. Ambos tipos de células mostraron potencial de mineralización después

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

del cultivo de inducción. Sin embargo, SCAPs mostraron mayores niveles de Fosfatasa Alcalina (ALP), Sialoproteína Ósea (BSP) y expresión de Osteocalcina (OC) que los PDLSCs, lo que indica mayor capacidad de mineralización de SCAPs.

Las SCAPs al ser un tejido inmaduro, en comparación con PDLSCs que es un tejido maduro, indican que las células de tejido en desarrollo tienen una capacidad de mineralización mayor que los de un tejido maduro.

Por otro lado, la Periostina que es una proteína de la matriz celular esencial para la integridad del tejido y la maduración, se cree que tiene una función clave como un modulador de la homeostasis del ligamento periodontal. En el Ligamento Periodontal humano, la periostina se expresa fuertemente en la zona que rodea las raíces de los molares entre la dentina y el hueso alveolar, y está específicamente localizada en las fibras de Sharpey. Como la Periostina es un marcador específico de Ligamento Periodontal, de igual manera se encontró que se expresa en SCAPs, lo que puede indicar que hay algunas similitudes entre SCAPs y PDLSCs. Por lo tanto las SCAPs al exhibir periostina demuestran tener propiedades periodontales *in vitro* (33).

Las SCAPs muestran expresión de marcadores neurogénicos tales como de β -tubulina III, GAD, NeuN, nestin, GFAP, neurofilamentos M, NSE y CNPase, entre otros. Mediante estimulación con el medio neurogénico (9, 29,30).

Se ha demostrado, que las SCAPs tienen un papel potencial en la contribución de la maduración de raíces (34, 35), por lo tanto, son importantes para lograr la apicogénesis de la raíz, de dientes inmaduros tratados endodónticamente con periodontitis peri radicular o abscesos (36).

El interés en la Endodoncia Regenerativa se ha incrementado sustancialmente en los años recientes, promovido por los exitosos casos reportados en tratamientos en la necrosis pulpar de dientes inmaduros. Las SCAPs por encontrarse en el ápice de

dientes inmaduros y al ser expuestas a tratamientos como pulpectomia y pulpotomía, el conocimiento de los diferentes medicamentos en estos tratamientos es de vital importancia para la optimización de los protocolos clínicos en la Endodoncia Regenerativa, Schneider *et al.*, (37) en su trabajo demostró que el WMTA (White Mineral Trioxide Aggregate) favorece a la proliferación y migración de SCAPs, lo que lo hace idóneo en el uso de tratamientos endodónticos.

Por otro lado, la irrigación de los conductos inmaduros es también un tema de interés en la Endodoncia Regenerativa, Treviño *et al.*, (38) al realizar un estudio comparativo de diferentes soluciones de irrigación, encontró que el EDTA al 17% contribuye a la supervivencia de las SCAPs al igual que puede beneficiar en el proceso de regeneración (38).

Huang *et al.*, (2010) en sus estudios en biomodelos han demostrado que las SCAPs posee la capacidad de regenerar tejidos como pulpa dental humana, vascularizados en los espacios vacíos del conducto radicular y producir tejido dentinario en las paredes de la dentina existentes (39).

Abe *et al.*, (2011) realizó un estudio en donde se aislaron células mesenquimales derivadas de papila apical, en el cual se irradiaron a las células para comprobar su radioresistencia, demostrando así que exhiben un fenotipo radio resistente, pero conlleva a la reducción significativa en la capacidad de formar tejido duro *in vivo* (40).

El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) es una molécula de señalización y factor de crecimiento, involucrados en el desarrollo de la raíz del diente. Jiayuan *et al.*, (2012) realizó un estudio *in vitro* para investigar los efectos reguladores de bFGF sobre la proliferación y la diferenciación potencial de SCAPs, se obtuvieron para el estudio 2 cultivos, uno en presencia de bFGF y un grupo control libre de bFGF. Los cultivos con bFGF aumentaron significativamente la proliferación celular, la expresión de STRO-1, los niveles de expresión neurogénicos de Oct4, Nanog, Sox2 y Rex1 también aumentaron, en contraste, la mineralización parecía

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

estar afectada por la presencia de bFGF, que redujo la actividad de la ALP, la formación de nódulos de minerales, osteocalcina, sialoproteína ósea, y sialofosfoproteína dentina (41).

Por lo tanto, el bFGF puede ser utilizado para mantener la potencialidad de SCAPs en cultivos, facilitando el uso a largo plazo de estas células en diversas aplicaciones de regeneración de tejidos e incluso para la regeneración de tejido neural.

Debido a que las SCAPs muestran una gran cantidad de marcadores neuronales, se pueden diferenciar a linaje neurogénico Zou *et al.*, (2013), pero se necesitan más investigaciones para probar si son una buena fuente de células para la regeneración *in vivo* del tejido neural (42).

La vía de señalización de NF- κ B regula la expresión de múltiples genes involucrados en el sistema inmune, factores de crecimiento, inflamación y en el desarrollo del cáncer. Comúnmente se cree que la vía de señalización de NF- κ B tienen un papel importante durante el proceso de organogénesis y la erupción dental.

Lia *et al.*, (2014) en sus estudios han confirmado que la capacidad de proliferación, potencial de migración, la diferenciación hacia el tejido osteogénico y odontogénico de SCAPs son significativamente incrementados, al ser activada la vía canónica de NF- κ B, y de modo inverso al ser inhibida la vía canónica de NF- κ B (43).

En SCAPs cultivadas, se encontró que los distintos componentes de la vía de señalización Notch se expresaron, como NOTCH2, NOTCH3, JAG2, y DLL3. Recientemente, se ha informado que miRNAs juegan papeles críticos en la regulación de la señalización de Notch. Los resultados de Sun *et al.*, (2014) de la transfección de miR-34a en SCAPS fue la inhibición de la señalización de Notch y la inducción de la diferenciación celular (44).

Se ha investigado la influencia de ciertos inductores como: 17beta-estradiol (E2), Factor de crecimiento transformante beta1 (TGF-B1), Distalless homeobox 2 (DLX2),

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

La histone demethylase, lysine (K)-specific demethylase 2A (KDM2A), los cuales afectan directamente en la proliferación celular y el incremento de la diferenciación osteogénica de SCAPS (45, 46, 47, 48).

En resumen, las SCAPs embriológicamente son las precursoras del complejo dentinopulpar y de la dentina radicular (27, 29), se diferencian con mayor capacidad a tejido odontogénico y osteogénico, seguido del neurogénico y en muy poca cantidad a adipogénico y condrogénico. Presenta un marcador específico el CD 24, una gran cantidad de marcadores neurogénicos como: Oct4, Nanog, Sox2 y Rex1, β -tubulina III, GAD, NeuN, nestin, GFAP, neurofilamentos M, NSE y CNPase, GFAP, entre otros. Con la influencia de bFGF y la activación de algunas vías como NF- κ B, entre las otras mencionadas, presentan mayor proliferación y mantienen por mayor tiempo su indiferenciación, tienen cualidades radioresistentes y favorecen en el proceso de apicogénesis.

Es por todas estas cualidades, lo que hace a las células mesenquimales de papila apical un tejido especial y único de células mesenquimales postnatales.

Plasticidad al linaje Osteogénico.

La diferenciación hacia el linaje Osteogénico de las SCAPs ha sido ampliamente demostrada *in vitro*. Habitualmente se realiza mediante el cultivo de una capa adherente de SCAPs en un medio de inducción osteogénica, el cual suele incluir dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerol fosfato. Las SCAPs forman en un primer momento agregados o nódulos y aumenta la expresión de fosfatasa alcalina. A partir de la primera semana se puede observar la aparición de depósitos de calcio, pero no es hasta la tercera semana cuando se obtiene una diferenciación completa. Tanto la aparición de depósitos de calcio como el aumento de la actividad fosfatasa alcalina pueden valorarse por métodos histoquímicos o por técnicas de genética molecular como cuantificación de la expresión de genes como la osteopontina y osteocalcina.

Biomateriales en la ingeniería tisular.

En la Ingeniería Tisular, los andamios deben favorecer la función biológica y mecánica de las células ya que actúan como una matriz extracelular artificial. Como resultado, los andamios pueden proporcionar a las células un espacio en tres dimensiones para formar los tejidos nuevos con la estructura y función apropiada. Esto involucra el sembrar células en andamios para su crecimiento *in vitro* y finalmente puedan ser implantadas en el paciente para así regenerar el tejido perdido.

Un andamio es una estructura o soporte inicial que permite la adhesión, proliferación, diferenciación celular, así como síntesis de matriz extracelular que provee de integridad estructural al tejido en formación.

Características del andamio.

a) Biocompatibilidad: los productos de degradación del material no deben ser dañinos para las células en crecimiento. Debe permitir la adhesión, proliferación y diferenciación de las células.

b) Biodegradabilidad: después de la formación del tejido, el andamio debe degradarse por completo.

c) Estructura tridimensional y porosa: la porosidad debe cubrir el 90% del volumen o área. Se recomienda esta estructura para que las células puedan formar la matriz extracelular y los nutrientes y productos de desecho de las células puedan ser transportados.

d) Plasticidad y buenas propiedades mecánicas: los andamios deben tener cierta plasticidad para poder formar un tejido funcional.

e) Adecuada interacción entre la superficie del andamio y las células, ésta permite la expresión del fenotipo celular adecuado, así como la adhesión y la proliferación.

f) Fabricación sencilla: para que el andamio sea de bajo costo y pueda ser aplicado ampliamente.

g) Fácil de esterilizar.

Acorde al material utilizado en la síntesis, los andamios pueden ser:

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

a) *Naturales*: son derivados de plantas y animales, están compuestos por proteínas o carbohidratos. Los más utilizados son: colágena, gelatina, glicosaminoglicanos, ácido hialurónico, fibrina y quitosano.

b) *Sintéticos*: se producen a partir de polímeros sintéticos, se diseñan para tener ciertas características de degradación, tamaño de poro, porosidad y otras propiedades fisicoquímicas. La ventaja de utilizar un material sintético es que existe menor riesgo de provocar alguna respuesta inmune y de transferir patógenos al hospedero (6, 7, 8).

Andamio de quitosano/poli-lisina

Quitosano.

El quitosano es el derivado N-desacetilado de la quitina. La quitina es ampliamente sintetizada en un buen número de organismos vivos como componentes estructurales en el exoesqueleto de los artrópodos o en la pared celular de hongos filamentosos y levaduras, entre otros. Es el segundo polímero más abundante de la naturaleza.

El quitosano se obtiene de la desacetilación de la quitina, es conocido por ser soluble en soluciones acuosas o alcohólicas de ácidos orgánicos e inorgánicos $\text{pH} < 6$. Es muy estable y poco sensible a la humedad, se descompone a temperaturas mayores de 185°C . Es una sustancia biodegradable, citocompatible, presenta actividad antimicrobiana (10).

Por estas propiedades va en aumento su uso en la biomedicina, farmacéutica y en la ingeniería tisular. Se ha utilizado para preparar hidrogeles, películas, fibras, esponjas, etcétera.

poli-lisina

Es un Poli aminoácido, que facilita la unión de las células y proteínas a superficies sólidas en aplicaciones biológicas.

Poli-lisina mejora la interacción electrostática entre los iones cargados negativamente de la membrana celular y los iones cargados positivamente a la superficie del andamio, favoreciendo así la unión celular (51).

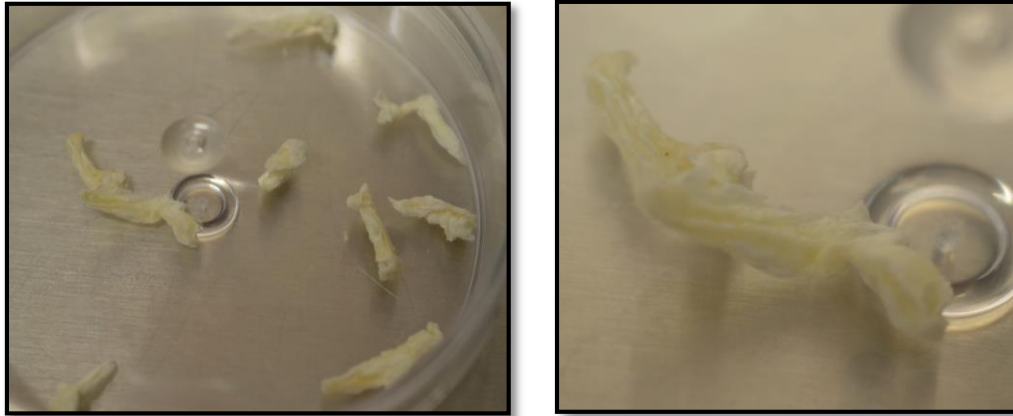


Fig. 6: Andamios de quitosano/poli-lisina, caracterizados por el autor, Rodríguez-Lorenzo *et al.* Consejo Superior Investigación Científica, Madrid, España.

Biocompatibilidad

Con el objetivo de regenerar tejidos, se están investigando distintos biomateriales en los cuales puedan proliferar las células mesenquimales viables, y ser transportadas hacia un sitio en el cual se mantengan sin diseminarse y logren la regeneración de tejidos. Uno de los materiales en estudio es el quitosano, un polímero biodegradable y natural proveniente de la quitina, componente natural de la concha de crustáceos. Es un biomaterial, que ha demostrado ser biocompatible y que no genera una reacción inflamatoria, convirtiéndose así en una herramienta útil para la Ingeniería Tisular (49). Uno de los objetivos del presente estudio experimental *in vitro* fue determinar la biocompatibilidad de la matriz de quitosano/poli-lisina como vehículo de transporte de células mesenquimales de papila apical con el fin de ser utilizadas para la regeneración de tejido óseo y sus futuras aplicaciones en enfermedades que afectan al sistema estomatognático como

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

periodontitis, quistes dentigeros, enfermedades congénitas como paladar hendido o traumatismos a nivel oro facial o en defectos de huesos largos.

Por todo lo mencionado anteriormente, podemos concluir que la ingeniería de tejidos es la aplicación de principios biológicos, químicos para la reparación, restauración y regeneración de tejidos vivos utilizando biomateriales, células y señalizadores, podría constituir una alternativa de los autoinjertos y aloinjertos óseos en los defectos óseos traumáticos o patológicos en la medicina regenerativa.

Una parte importante en la ingeniería de tejidos son los estudios *in vitro* de los biomateriales en conjunto con los cultivos celulares, previos a los implantes en biomodelos y su futura utilización clínica.

METODOLOGÍA

Para el presente trabajo fueron recolectados 10 terceros molares humanos incluidos y con raíces parcialmente formadas, extraídos en la Clínica Odontológica Cuauhtepc, a pacientes de 17 a 19 años.

Antes de iniciado el procedimiento quirúrgico, se realizó el llenado del expediente clínico de la FES Iztacala, consentimiento informado así como los formatos de donación de órganos dentales.

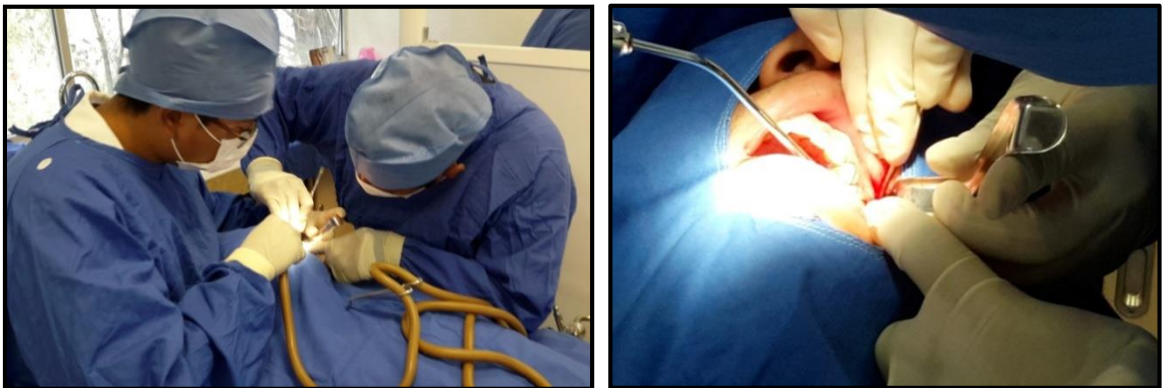


Fig. 7: Recolección de terceros molares incluidos y con raíces parcialmente formadas, extraídos en la Clínica Odontológica Cuauhtepc, FESI.

Para la realización de la antisepsia, se realizó un lavado peri bucal con yodopovidona y un enjuague con clorhexidina al 0.2% durante un tiempo de 30 segundos antes del procedimiento quirúrgico. **(Fig. 7)**

- Obtención del órgano dentario

La cirugía bucal se realizó con los estándares de asepsia y antisepsia establecidos en la clínica odontológica de Cuauhtepc, una vez extraído el órgano dentario se colocó en un tubo de punta cónica de 15 ml. (SARSTEDT) con medio de transporte (solución fisiológica con Penicilina 1000 U/ml, Estreptomina 1mg/ml y Anfotericina B 2.5mg/ml al 10% SIGMA ALDRICH) a una temperatura de 4 °C para su transporte al Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Una vez llegadas las muestras al laboratorio se realizaron dos lavados con medio de transporte y colocados en tubos nuevos y estériles con medio de transporte y refrigerados a 4°C durante 24 hrs.

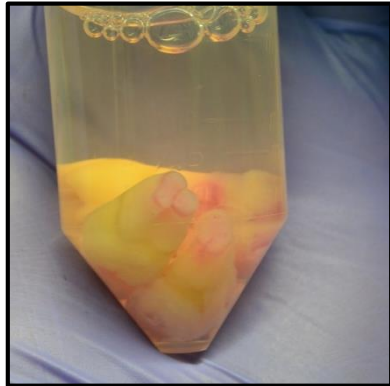


Fig. 8: Terceros molares con raíces inmaduras humanos, obtenidos en la clínica odontológica Cuauteppec, mantenidos a 4° C y con medio de transporte, para evitar la proliferación de bacterias u otros microorganismos.

- Cultivo celular

Transcurridas las 24 hrs., se realizó la esterilización del área blanca mediante limpieza con hipoclorito de sodio, luz ultravioleta, de la campana de flujo laminar (Telstar BIO II ADVANCE) con etanol al 70% y luz ultravioleta durante 15 min.

Dentro de la campana de flujo laminar, se realizó la separación de la papila apical de su respectiva raíz en formación con la ayuda de cucharilla para dentina #5 y hoja de bisturí #15, una vez separada la papila apical se colocó en un nuevo tubo con medio de transporte. **(Fig. 8)**

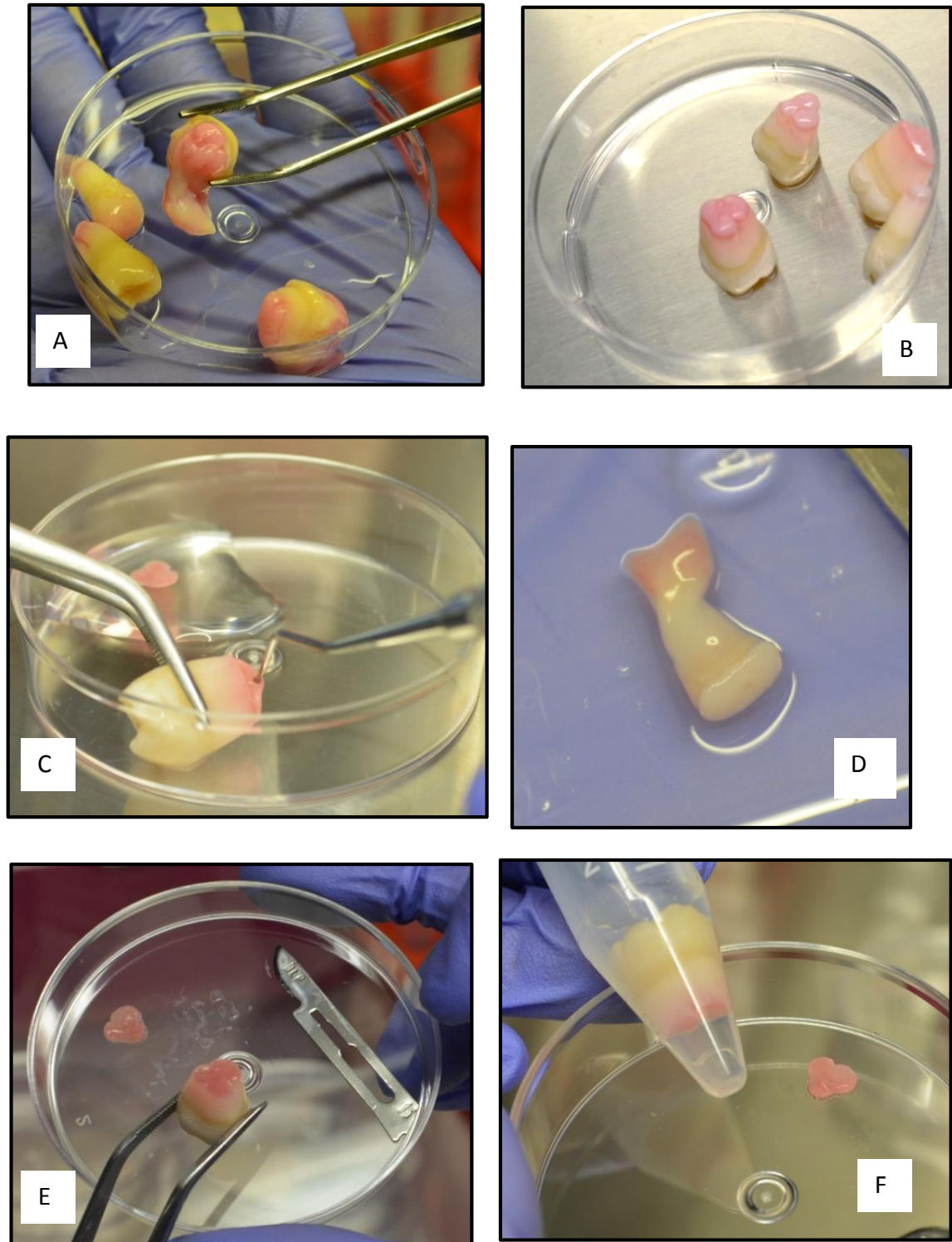


Fig. 9: Manejo del órgano dentario para su cultivo, dentro de la campana de flujo laminar en el Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional. (A, B) Terceros molares con raíces incompletas, papila apical y folículo dental. (C) Separación de la papila apical de su respectiva raíz. (D) Pulpa dental en proceso de formación, con papila apical. (E) Parte pulpar del órgano dentario. (F) Colocación del resto del órgano dentario en medio de transporte

humanos.

Posteriormente se realizó la fragmentación mecánica de la papila apical a un tamaño aproximado de 1mm^3 con ayuda de hoja bisturí #15 en una caja Petri, y los explantes fueron colocados en cajas tipo Falcón (NUNC de 25cm^2).

Después de colocados los explantes se esperó la adhesión del tejido a la caja de cultivo durante 10 min., transcurrido este tiempo se agregó 5ml. de Medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle's modificado por Dulbecco, SIGMA-ALDRICH), enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO) y 1% de solución antibiótica y antimicótica: Penicilina (1000U/ml) /Estreptomicina (1mg/ml) /Anfotericina B (2.5mg/ml)SIGMA ALDRICH), previamente filtrado para su esterilización, de manera suave, fluida y constante. **(Fig. 10)**

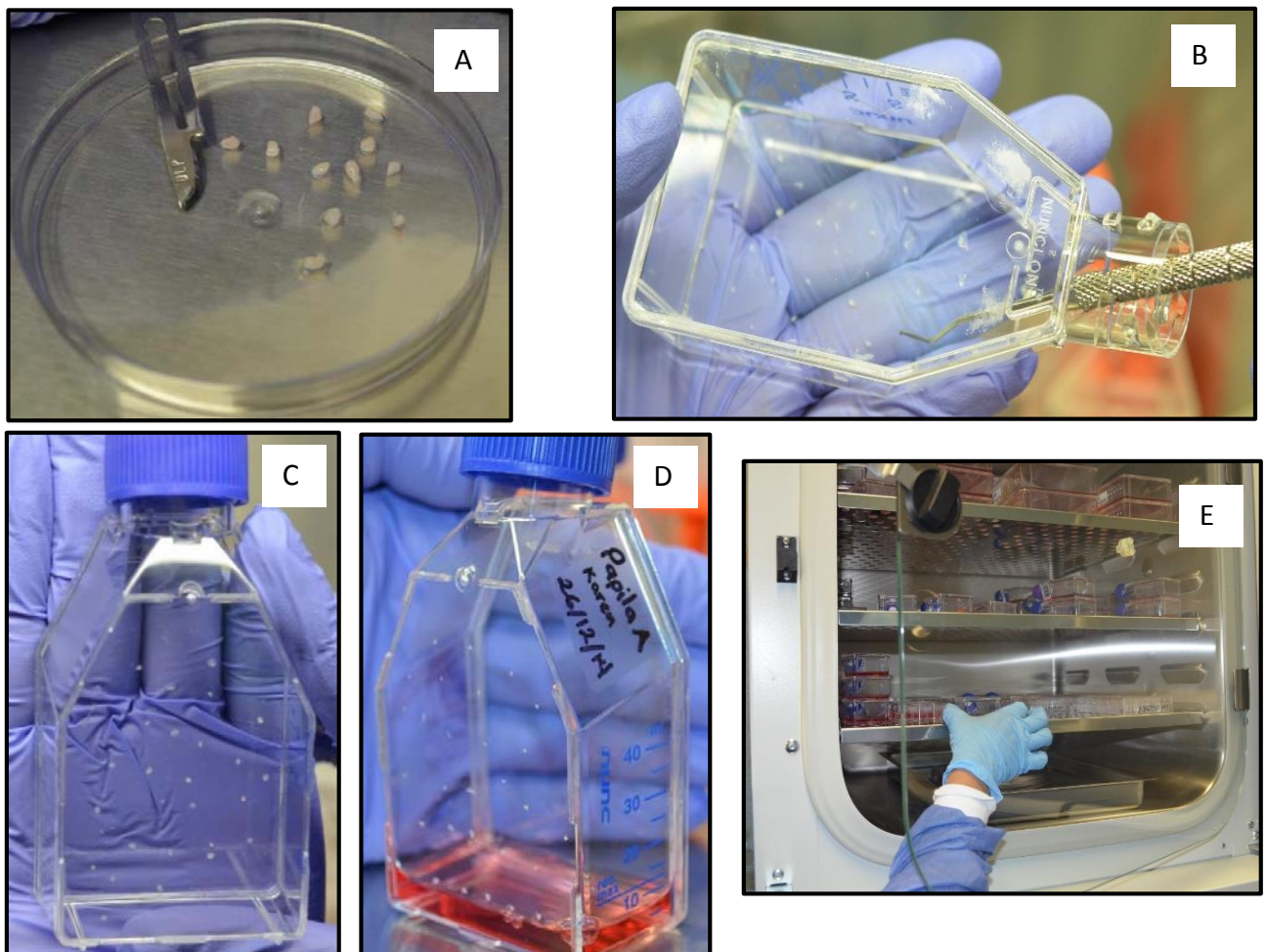


Fig. 10: Cultivo de la papila apical, con técnica de disgregación mecánica y explante, dentro de la campana de flujo laminar en el Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional. (A) Disgregación mecánica de la papila apical (B) Colocación de los explantes en cajas tipo Falcón (NUNC de 25cm^2). (C) Adhesión de los explantes a la caja de cultivo. (D) Colocación del medio de cultivo; DMEM, suplementado (E) lincubación de las cajas de cultivo con 5% de CO_2 y 95% de oxígeno.

Las cajas de cultivo fueron incubadas con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C (Binder modelo CB150UL). El medio de cultivo fue reemplazado con la ayuda de una pipeta de 5ml (Eppendorf), por cultivo fresco, dos veces por semana, durante un mes. Después de este tiempo se observó proliferación celular en un 60% en la extensión de la caja y con forma fibroblastoide, que corresponde a la morfología descrita para las células mesenquimales de papila apical (SCAP). (Sonoyama *et al.*2006). **(Fig.11)**

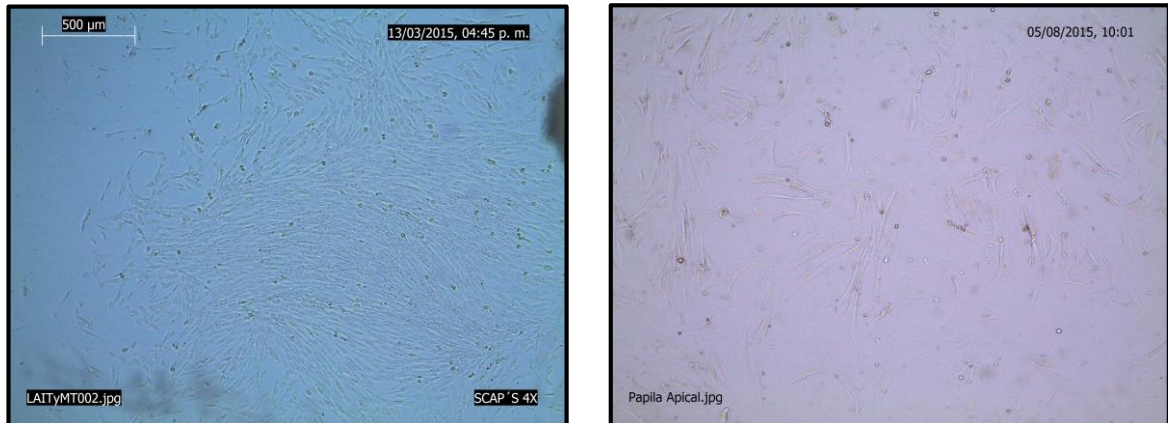


Fig. 11: Cultivo de papila apical a una confluencia celular del 60%, en la cual se observan células con morfología fibroblastoide, observada bajo microscopio óptico invertido en el laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional, FES Iztacala (Obj. 4 X).

- **Método de Separación celular, para pases subsecuentes.**

Se retiró el medio de cultivo de la caja Falcon (NUNC). Se agregó 5ml de Tryple Express (GIBCO), se dejó incubar por 5 minutos a 37°C. Se observó al microscopio invertido, para comprobar la separación celular. Se agregó 5ml. de medio de cultivo completo para inactivar la enzima de separación.

El sobrenadante que contenía las células fue recuperado con una pipeta estéril de 10 ml (Eppendorf), se colocó en tubos de punta cónica de 15mL (SARSTEDT) y posteriormente se centrifugo durante 10 minutos a 1000 rpm. en la centrifuga (SIGMA modelo 1-14)

Para obtener el pellet celular, se retiró con cuidado el sobrenadante.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Se re suspendió con 1ml. de Medio de cultivo completo con la ayuda de una punta y micropipeta de 1ml. y se realizó la siembra de las células en cajas Falcon de 25 cm².

(Fig.12)

Se incubó durante 5 minutos para que las células se adhieran al plástico, y posteriormente se le agregó 5ml. de medio de cultivo completo de manera suave, fluida y constante.

Las cajas de cultivo se incubaron durante 4 semanas con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C (Binder modelo CB150UL).

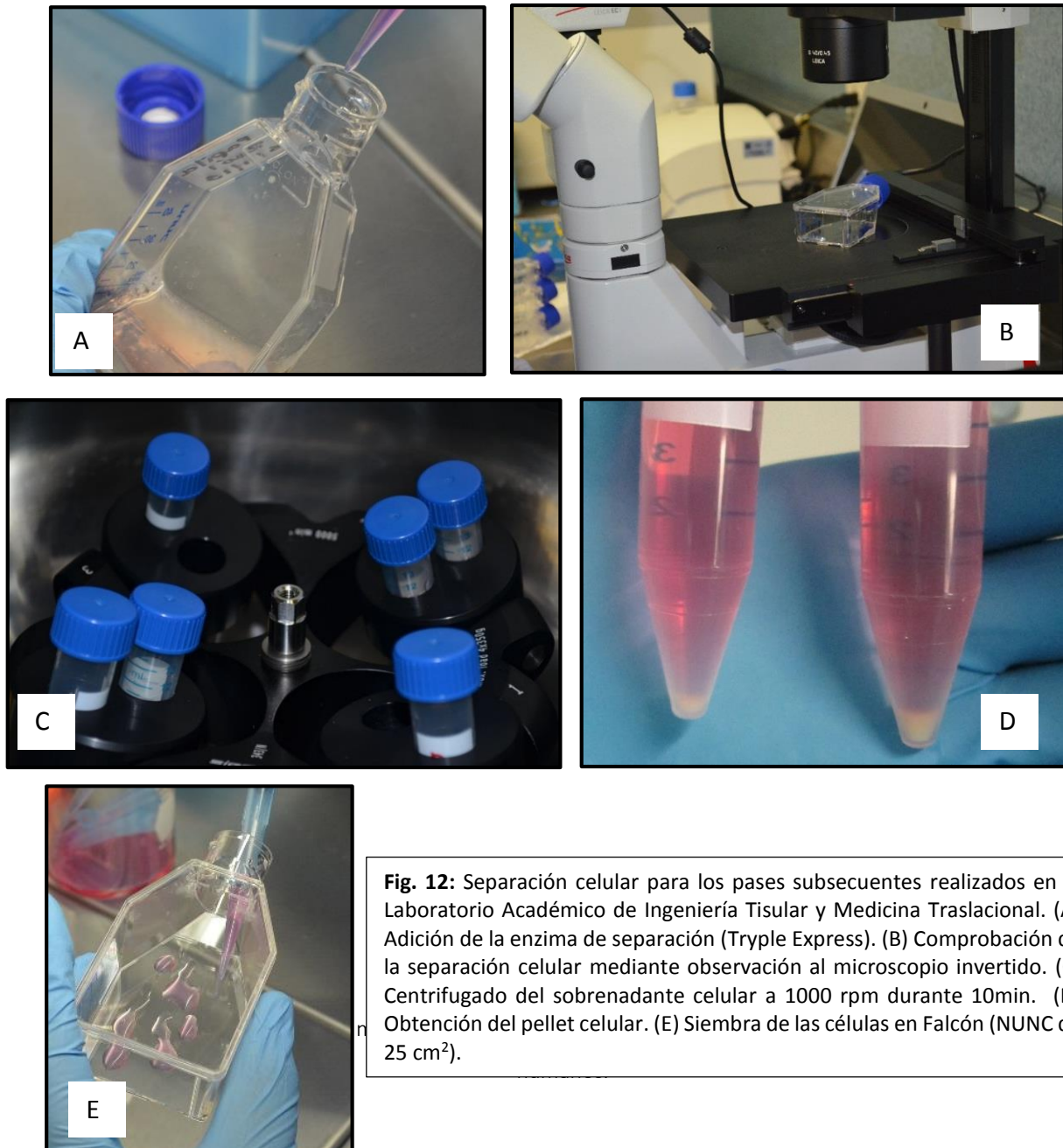


Fig. 12: Separación celular para los pases subsiguientes realizados en el Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional. (A) Adición de la enzima de separación (Tryple Express). (B) Comprobación de la separación celular mediante observación al microscopio invertido. (C) Centrifugado del sobrenadante celular a 1000 rpm durante 10min. (D) Obtención del pellet celular. (E) Siembra de las células en Falcón (NUNC de 25 cm²).

El medio de cultivo fue reemplazado con la ayuda de una pipeta estéril de 5ml (Eppendorf), por cultivo fresco, dos veces por semana, hasta obtener el 80% de confluencia. **(Fig. 13)**

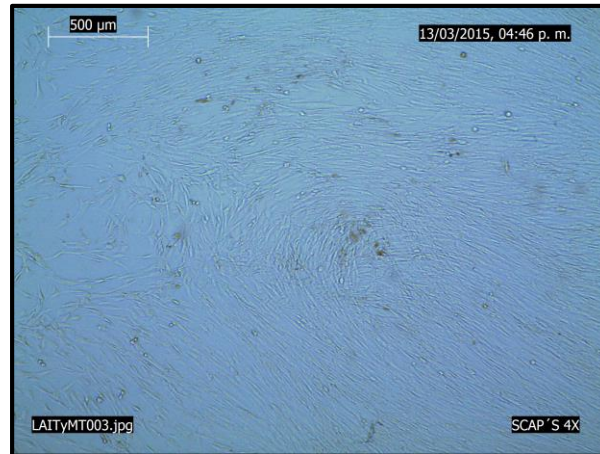


Fig. 13: Pase subsecuente del cultivo primario de papila apical con confluencia celular al 80%, observada bajo microscopio óptico invertido (Obj. 4 X)

- **Purificación celular mediante Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) con anticuerpo CD44 MicroBeads, human (Miltenyi Biotec).**

El principio de separación mediante Magnetic Activated Cell Sorting (MACS), consiste en primer lugar, que las células CD44 positivas están magnéticamente etiquetadas con microperlas con el anticuerpo CD44. La suspensión celular se carga en una columna MACS®, colocada en el campo magnético de MACS separador. Las células CD44 + marcadas magnéticamente se retienen dentro de la columna. Las células no marcadas pasan a través de la columna. Después de retirar la columna del campo magnético, las células retenidas magnéticamente CD44 + se pueden obtener como una fracción celular seleccionada positivamente.

Para realizar la purificación celular, se preparó un buffer de separación de la siguiente manera.

En un tubo de punta cónica con faldón de 50ml (SARSTEDT), se colocó 25 mg. de Albumina BSA (Santa Cruz), 38 mg. de EDTA y 50 ml de PBS (GIBCO) y se

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares

humanos.

homogeneizó, posteriormente se filtró la solución con una jeringa de 25 ml. y un filtro de 0.22micras.

Procedimiento:

Tanto las células como el Buffer deben estar a una baja temperatura (2-8°C) para evitar obstruir las columnas.

Se realizó la separación celular de la caja de cultivo.

Una vez obtenido el pellet se le agregó 1ml de buffer de separación y se resuspendió.

Se tomó 10 µl de la porción celular y se le agregó 10 µl de azul tripán para realizar el conteo celular.

Se realizó el conteo celular con cámara de Neubauer y mediante la siguiente fórmula: (número de células contadas por diez mil, entre el número de cuadros contabilizados por 2)

$$\frac{(\# \text{ Células contadas X } 10,000)}{\# \text{ Cuadros}} \quad (2)$$

Se agregó 4 ml de buffer de separación, teniendo un volumen total de 5ml.

Se centrifugó la suspensión celular por 10 minutos a 1000rpm. a 8°C.

Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 80 µl de solución buffer por 10⁷ de células, y 20 µl de anticuerpo CD44 (Miltenyi Biotec) por 10⁷ de células.

Se homogeneizó esta solución y posteriormente se incubó por 15 minutos a una temperatura de 4° C.

Posteriormente se agregó 2 ml de Buffer de separación y se centrifugó a 1000rpm por 10min a 8°C. **(Fig. 14)**

Se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 500 μ l de buffer de separación.

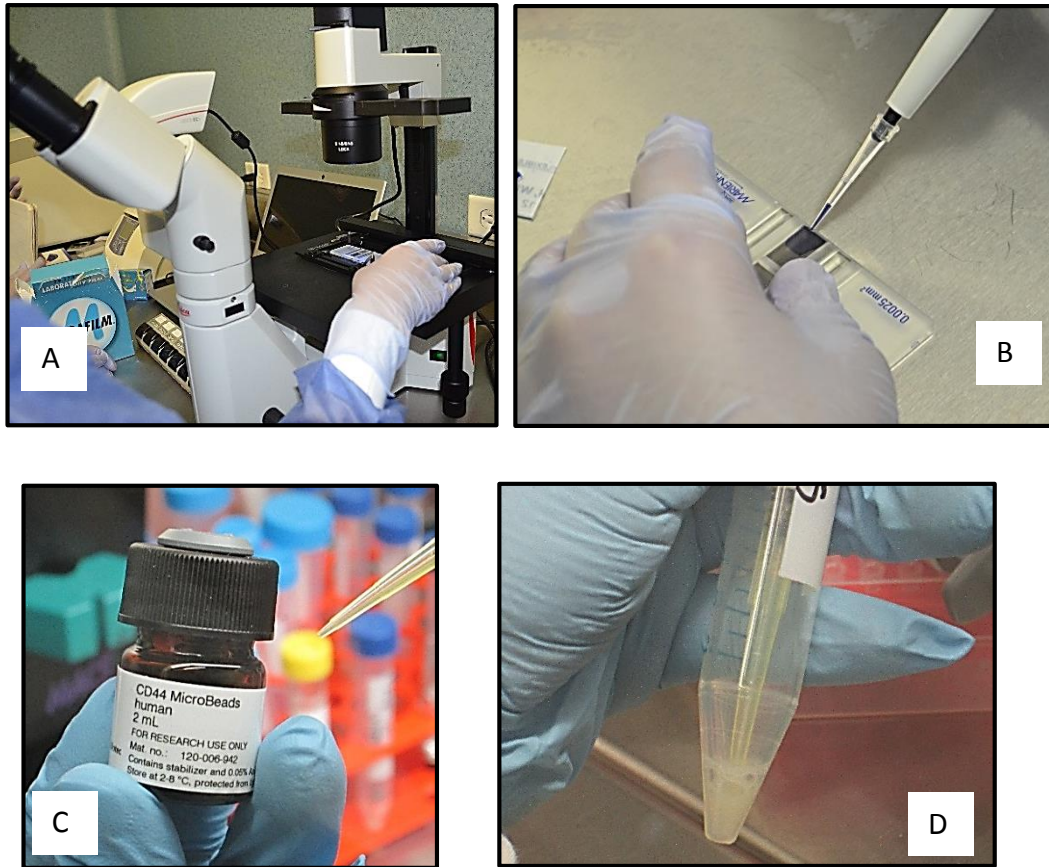


Fig. 14: Purificación celular mediante Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) realizado en el Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional. (A,B) conteo celular con cámara de Neubauer y microscopio invertido. (C) Anticuerpo CD44 (Miltenyi Biotec) (D) Adición del anticuerpo a las células de papila apical.

- **Separación magnética:**

Se seleccionó la columna de acuerdo a la cantidad de células a filtrar.

Se acopló la columna (LD Columns Miltenyi Biotec) al campo magnético separador del sistema de MACS; debajo de la columna se colocó en un tubo recolector de 15ml (SARSTEDT) para las células negativas al anticuerpo CD44.

Se preparó la columna colocando 3ml de Buffer de separación de 1ml. en 1ml. sin dejar que se seque la columna.

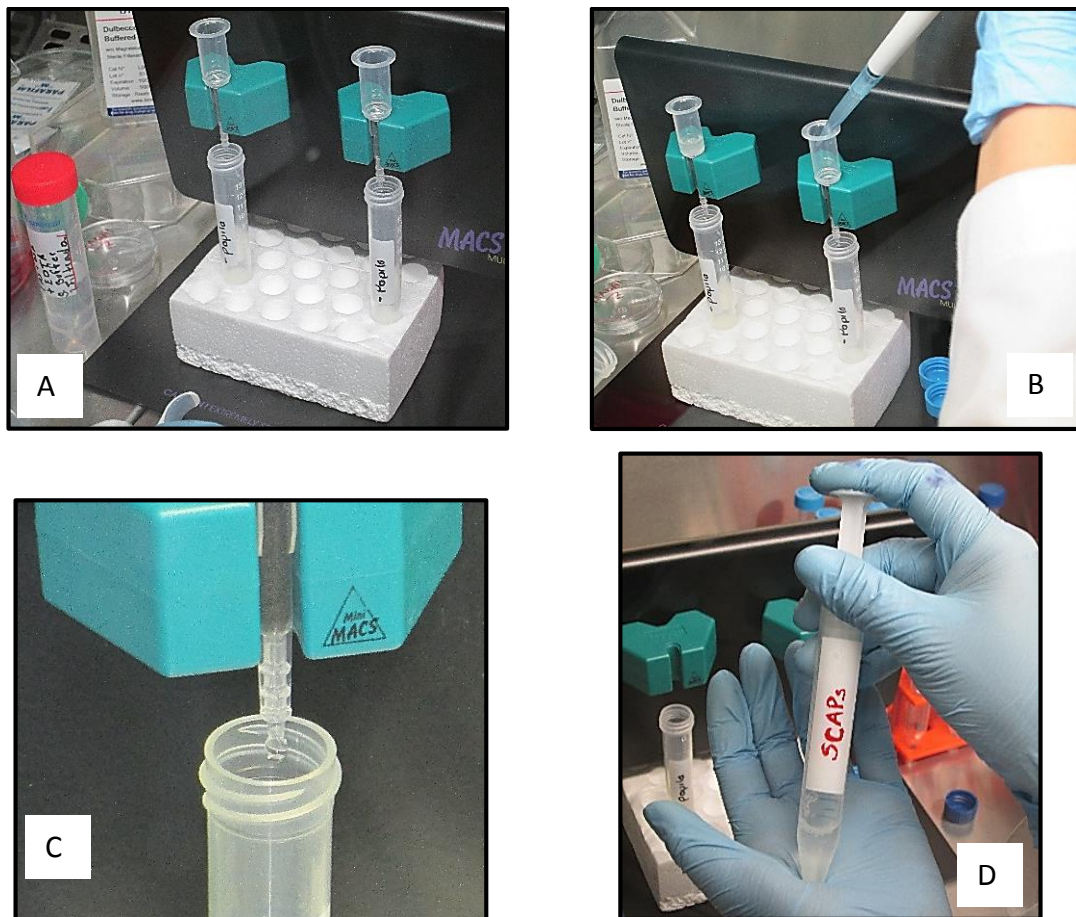
Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Se colocó la sustancia celular en pequeñas cantidades en la columna de separación, al final se lavó con 3 ml de buffer para retirar las células que no sean positivas al anticuerpo CD44 de las paredes.

Al terminar de caer la última gota de la columna, se colocó de una sola intención el émbolo para depositar las células en un tubo de 15ml. (SARSTEDT)

Se centrifugaron las células a 1000rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante, se re suspendió el pellet en 500 μ l de medio de cultivo y se sembraron en una caja de 25cm² (NUNC). **(Fig. 15)**

Se incubó a 37°C y CO₂ al 5 % se esperó a obtener el 80% de confluencia, para realizar los ensayos correspondientes.



Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.



Fig. 15: Purificación celular mediante Magnetic Activated Cell Sorting (MACS); Separación magnética. (A) Sistema de purificación con MACS; columnas, barras magnéticas y tubos de recolección. (B) Colocación de la suspensión celular en la columna de separación. (C) Recolección de las células negativos al anticuerpo CD44, (Miltenyi Biotec). (D) Recolección de las células positivas al anticuerpo CD44, para su posterior centrifugado. (E) re suspensión del pellet celular con medio de cultivo. (F) Siembra de las células positivas al anticuerpo CD44 en cajas falcón (NUNC de 25 cm²). (G) Incubación del cultivo homogéneo de SCAPs.

- **Obtención del Inmunofenotipo:**

Se realizó la siembra de las células sobre cubreobjetos redondos (COVERGLASSES), una vez obtenida la confluencia deseada se realizó el inmunomarcaje con anticuerpo anti-CD 44 (anti-Human, ABCAM)

Se lavaron las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH) durante 2 minutos repitiendo tres veces.

Se fijaron las muestras con formalina neutra al 10% por 20 minutos (100µL por pocillo).

Se lavaron las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH).

Después, se permeabilizaron con Triton X100 (SIGMA ALDRICH) a 0.05% (100µL por pocillo) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH).

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Se bloquearon las muestras durante 45 minutos con albúmina (Santa Cruz) al 1% en PBS (100µL por pocillo).

Se lavaron las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH).

En seguida, se incubaron las muestras con el anticuerpo CD 44 a una concentración 3:1000 durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH)

Se incubaron con el segundo anticuerpo Alexa Fluor™ 488 4:1000 durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Para el control negativo se realizó con marcador de superficie para células hematopoyéticas con anticuerpo CD 34 (anti-Human, ABCAM) y tinción de núcleo con DAPI con la misma técnica antes mencionada.

- **Determinación de la viabilidad celular**

El objetivo principal de la Ingeniería Tisular es regenerar y restablecer la función normal de un órgano o tejido dañado a través de la utilización de células que han sido cultivadas en el laboratorio o en matrices artificiales, para que posteriormente puedan ser trasplantadas a un órgano receptor. De esta forma, uno de los requisitos más importantes a destacar, antes de que las células puedan ser implantadas, es la determinación de la viabilidad de las células cultivadas *in vitro*.

Existe una serie de métodos y técnicas de laboratorio útiles para la evaluación de la viabilidad y funcionalidad celular. Destacan entre ellos la evaluación de la integridad de la membrana celular (azul tripan), los ensayos funcionales, los ensayos con pruebas de fluorescencia y los estudios de morfología celular.

Los ensayos de viabilidad y proliferación se realizaron en 2 modalidades:

1.- En placas de 24 y 96 pocillos, para ensayos de viabilidad y proliferación por absorbancia MTT Y Almar Blue, por fluorescencia con kit Live & Dead (Vida & Muerte), DAPI y EduProliferation.

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

2.- En andamios de quitosano/poli- lisina, para ensayos de viabilidad y proliferación por absorbancia con MTT y Alamar Blue y por fluorescencia con calceína AM y DAPI.

1.-Ensayo in vitro de la Viabilidad y proliferación de células mesenquimales de papila apical (SCAPs) sembradas en placas de 24 y 96 pocillos

Siembra en placas de 24 y 96 pocillos

Se realizó el conteo celular, mediante técnica con azul tripán y cámara de Neubauer. Una vez determinada la cantidad de células se sembraron 10,000 células para los ensayos del día 7, 14 y 21 de la siguiente manera:

Para los ensayos con Live & Dead y DAPI las células se sembraron directamente a los pocillos, para los ensayos con EdU se colocaron sobre cubreobjetos

Los ensayos de proliferación se evaluaron a 3 tiempos (día 7, 14 y 21) con MTT Y Alamar Blue, se sembraron 10,000 células en placas de 96 pocillos.

Una vez que las células se adhirieron a la placa se les colocó 1ml. de medio de cultivo completo y se incubó a 37° con 5% de CO₂, realizando cambio de medio de cultivo 2 veces por semana.

2.- Ensayos in vitro de andamios quitosano/poli-lisina con células mesenquimales de papila apical (SCAPs)

Una parte importante de la Ingeniería Tisular es la armonía entre el andamio y las células cultivadas en el laboratorio y posteriormente ser implantadas en el huésped para la regeneración del tejido perdido. Por lo cual, se realizaron los ensayos de biocompatibilidad en andamios de quitosano/poli-lisina con SCAPs.

Se sembraron de la misma forma explicada con los pocillos, con la excepción que antes del sembrado se acondicionaron los andamios de la siguiente manera:

Con una punta de 1000ul, se les colocó 500 ul. de medio de cultivo a cada andamio durante 3 minutos, posteriormente se retiró el medio y se realizó la siembra de las células, de manera cuidadosa se colocó gota por gota la suspensión celular, una vez que las células se adhirieron al andamio, les se les colocó 1ml. de medio de cultivo

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

completo y se incubó a 37° con 5% de CO₂, realizando cambio de medio de cultivo 2 veces por semana.

- **Ensayos de proliferación por absorbancia (MTT Y Alamar Blue)**

- **Ensayo con MTT** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazolium).

Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. El MTT compuesto por la sal de tetrazolium. Se utiliza para evaluar la proliferación celular como una función del potencial oxido-reducción. Las células que respiran activamente tienen la capacidad en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan). El formazán se solubiliza luego y su concentración es determinada por la densidad óptica.

Esta prueba consiste en evaluar la respiración celular según la actividad de metabolismo de las enzimas mitocondriales (53).

Procedimiento:

Se preparó la solución de MTT (ROCHE), para cada muestra de la siguiente manera:

64 µl de DMEM libre de rojo fenol y suplementado con L-Glutamina (BIOWEST)

6 µl de MTT (ROCHE)

Dando un total de 70µl.

Se retiró el medio de cultivo y se lavó las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH) 2 veces durante 2 minutos y se colocó 70 µl por muestra. Las muestras se resguardaron de la luz con papel aluminio y se incubaron durante 4 hrs. a 37°C con 5% de CO₂

Pasado este tiempo se le agregó 100µl. de solubilizante que incluye el kit de MTT y se dejó incubando durante el resto del día y la noche, dando en total de 170 µl. de solución en cada muestra.

Al siguiente día se retiró la solución de MTT y se colocó en una caja de 96 pocillos, en una cantidad de 85 µl por pocillo.

Se realizó la lectura de la Dispersión Óptica mediante lector de ELIZA (Thermo Labsystems Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 540nm, en la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de FES Iztacala.

Para determinar la citotoxicidad de los andamios sobre las células, se evaluó la proliferación celular, el estudio se diseñó en 3 tiempos, para el día 7, 14 y 21. Con 2 grupos: células cultivadas en pocillos y células cultivadas en andamios de quitosano/poli-lisina

- **Ensayo con Alamar Blue.**

Alamar Blue es un indicador de la salud y proliferación celular probada que utiliza el poder reductor natural de las células vivas para convertir la resazurina a la molécula fluorescente, resorufina. El ingrediente activo de Alamar Blue (resazurina) es un compuesto no tóxico permeable, donde la célula que es de color azul y virtualmente no fluorescente, al actuar el Alamar Blue con las células, resazurina se reduce a resorufina, que produce fluorescencia roja muy brillante. Las células viables se convierten continuamente resazurina a resorufina, generando de esta manera una medida cuantitativa de la viabilidad y la citotoxicidad (54). La cantidad de fluorescencia o absorbancia es proporcional al número de células vivas y corresponde a la actividad metabólica células. Las células dañadas y no viables tienen actividad metabólica innata menor y por lo tanto generan una señal proporcionalmente menor que las células sanas.

Procedimiento:

Se preparó la solución de Alamar Blue (para cada muestra) de la siguiente manera:

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

299 μ l de DMEM libre de rojo fenol y suplementado con L-Glutamina (BIOWEST) y 1 μ l de Alamar Blue (INVITROGEN)

Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH) 2 veces durante 2 minutos y se colocó 300 μ l por muestra. Se resguardaron de la luz con papel aluminio y se incubaron durante el resto del día y la noche a 37°C con 5% de CO₂

Al siguiente día se retiró la solución de Alamar Blue para ser colocada en una placa de 96 pocillos, en una cantidad de 100 μ l por pocillo.

Se realizó la lectura de la Dispersión Óptica mediante lector de ELIZA (Thermo Labsystems Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 570nm en la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de FES Iztacala.

Para determinar la viabilidad celular, los ensayos se evaluaron a 3 tiempos, para el día 7, 14 y 21 días. Dos grupos: control, células cultivadas en pocillos y experimental células cultivadas en andamios de quitosano/poli-lisina.

- **Ensayos de viabilidad celular mediante fluorescencia (Live & Dead, DAPI y EdoProliferation)**

- **Ensayo con Live & Dead (Vida & Muerte)**

Es un ensayo rápido y fácil de dos colores para determinar la viabilidad de las células en una población basada en la actividad esterasa y la integridad de la membrana plasmática. El Live & Dead (invitrogen) discrimina rápidamente las células vivas de las muertas, mediante tinción simultáneamente con verde fluorescente calceína-AM para indicar la actividad esterasa intracelular y etidio rojo fluorescente homodímero-1 para indicar la pérdida de la integridad de la membrana plasmática.

Procedimiento:

Preparación de la solución de Live & Dead:

997.5 μ l de PBS (Sigma- Aldrich)

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

0.5 μ l.de Calceína AM. (INVITROGEN)

2 μ l de homodímero de etidio-1(INVITROGEN)

Dando un total de 1000 μ l.

Se retiró el medio de cultivo y se lavó las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH) 2 veces durante 2 minutos, se colocó 300 μ l de la solución por muestra, se resguardaron de la luz con papel aluminio y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para determinar la viabilidad celular se evaluaron en 3 tiempos para el día 7, 14 y 21.

- **Ensayo con DAPI**

4'6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro

La prueba con DAPI tiñe preferentemente de azul el ADN de doble cadena (dsDNA). Se une a grupos de Adenina-Timina en el surco menor de ADN que tiene una molécula de colorante para cada base de 3 pares. La unión de DAPI a dsDNA produce un aumento de fluorescencia 20 veces aproximadamente. La fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente, con máximo de emisión a 460 nm.

Procedimiento:

Se retiró el medio de cultivo y se lavó las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH) 2 veces durante 2 minutos, se colocó 2 μ l de DAPI (INVITROGEN) por muestra, se protegieron de la luz con papel aluminio y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo se realizó la lectura en un microscopio de fluorescencia (ZEISS HXP 120C) a una emisión de 488 nm.

- **Ensayo Edu Proliferation con Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 (INVITROGEN)**

Descripción

En este ensayo, el análogo de la timidina modificada se incorpora de manera eficiente en el ADN recién sintetizado y marcado con fluorescencia.

La medición de la capacidad de una célula a proliferar es un método fundamental para la evaluación de la salud celular, la determinación de genotoxicidad, y la evaluación de fármacos contra el cáncer. El método más exacto es mediante la medición directa de la síntesis de ADN.

EdU (5-etinil-2 'desoxiuridina) proporcionado en el kit es un análogo de nucleósido de timidina y se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN.

Metodología para el etiquetado de las células con EdU Alexa Fluor® 488 (INVITROGEN)

Se realizó la siembra de las células sobre cubreobjetos (COVERGLASSES), para los ensayos a 7, 14 y 21 días.

En los días 6, 13 y 20 se incubaron con 40 µl de EdU Componente A y medio completo durante 24 hrs.

-Fijación y permeabilización de la célula

Después de la incubación, se retiró el medio con EdU, y se lavó las muestras con PBS (SIGMA ALDRICH) 2 veces durante 2 minutos.

Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con 1 ml de formaldehído al 3,7% en PBS a cada muestra.

Se retiró el fijador y se lavaron las muestras dos veces con 1 ml de PBS (SIGMA ALDRICH) con BSA (Santa Cruz) al 3%.

Posteriormente se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con 1 ml de Triton® X-100 al 0,5% en PBS a cada muestra.

Detección EdU

Se preparó el coctel reacción de la siguiente manera y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Click-iT® EdU reaction buffer Componente D. a una concentración 1:10 con agua destilada, obteniendo un total de **430µL** para cada muestra

CuSO₄ (Component E) **20 µL** por muestra.

Alexa Fluor® azide (Componente B) **1.2µL** para cada muestra

EdU buffer additive (Componente F), una concentración de 1:10 en agua destilada obteniendo un total de **50µL**

Teniendo un total de volumen de 500 µL. por muestra.

Una vez preparado el coctel reacción, se lavaron las células dos veces con 1 ml de PBS con BSA al 3%, para eliminar el agente permeabilizador.

Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con 500 µL del coctel reacción a cada muestra, de forma constante para asegurar la distribución uniforme sobre las muestras y se resguardaron de la luz con papel aluminio.

Se retiró el coctel de reacción, se lavaron con 1 ml de PBS con BSA al 3%, para eliminar residuos del cóctel de reacción.

Tinción de ADN

Se agregó la solución de Hoechst 33342 (componente G) se diluyo a una concentración de 1:2000 en PBS para obtener una solución 1X Hoechst 33342.

Finalmente se le colocó 1 ml de Hoechst por muestra a una concentración 1:2000 y se Incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Después de la incubación, se lavó cada muestra dos veces con 1 ml de PBS.

Pasado este tiempo se realizó la lectura en un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 488 nm.

Para determinar la viabilidad celular se realizaron 3 ensayos, para el día 7, 14 y 21. Y con un grupo control, al cual se le agrego 40ul de DMSO.

- **Diferenciación Osteogénica:**

El tratamiento con los factores de diferenciación genera cambios en la expresión genética de las células promoviendo la osteogénesis. La dexametasona, estimula la proliferación de las células mesenquimales y permite la diferenciación hacia el linaje osteogénico, incrementando la expresión de Runx2 considerado como el gen maestro de la osteogénesis, ya que desencadena la vía de diferenciación. El β -Glicerol fosfato, un fosfato orgánico también da soporte a la osteogénesis mediante el control de la mineralización y la actividad de los osteoblastos. Los fosfatos libres pueden inducir la expresión de mRNA y proteínas osteogénicas tales como la osteopontina. El ácido ascórbico desempeña un papel en el incremento de la secreción de colágena tipo I, actividad de la fosfatasa alcalina y promueve la producción de osteocalcina; particularmente, funciona como un cofactor en la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en el colágeno, e incrementa la síntesis de proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea, participando de esta forma, en todas las fases de la osteogénesis hasta formar los osteocitos maduros (54, 55).

Inducción:

Para ensayos con Von Kossa, y osteopontina se sembraron 10, 000 células en cubreobjetos redondos en placas de 24 pocillos y con 2 grupos, un grupo experimental y un grupo control.

Para el ensayo con fosfatasa alcalina se sembraron 10, 000 células en placas de 96 pocillos y con 2 grupos, un grupo experimental y un grupo control.

Se preparó el medio inductor osteogénico (LONZA PT-4105) que contiene dexametasona, L-glutamina, ácido ascórbico, penicilina y estreptomina, suplemento de crecimiento de células mesenquimales (MCGS) y β -glicerofosfato de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Al alcanzar el 80% de confluencia, se le agregó 500 µl de medio de diferenciación osteogénica (LONZA PT-4105) a cada pocillo de 24 y 200 µl para los de 26 pocillos a las muestras experimentales

A las muestras controles se les mantuvo con medio de cultivo completo, en las mismas proporciones que los grupos experimentales.

Se colocaron en la incubadora con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C (Binder modelo CB150UL) durante todo el proceso, y se realizó cambio de medio de cultivo cada 4 días, durante 4 semanas, para realizar las pruebas correspondientes (tinción con Von Kossa y rojo de alizarina, fosfatasa alcalina por absorbancia e inmnofluorescencia con Osteopontina día 21).

- **Tinción de Diferenciación Osteogénica con Von Kossa.**

La tinción con Von Kossa se utiliza para ver la mineralización de un cultivo de celular y secciones de tejidos. Se basa en la sustitución de los iones de calcio intratisulares en forma de fosfatos o carbonatos, por iones de plata en solución acuosa sometidos a un proceso de exposición de luz. Los depósitos iniciales de calcio se colorean de marrón-negro.

Protocolo de tinción

Se fijaron las células con formalina neutra al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente

Se lavaron las muestras 2 veces con agua destilada durante 5 minutos.

Se incubaron las muestras con nitrato de plata al 2% en agua destilada durante 1 hora bajo fuente de luz UV.

Se lavaron las células 2 veces con agua destilada durante 5 minutos.

Se colocó en solución de tiosulfato sodio (5%) durante 3 minutos.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Se lavaron las muestras 2 veces con agua destilada durante 5 minutos.

Se deshidrato con etanol al 100% durante 15 min.

Finalmente se realizó la observación al microscopio óptico invertido (LEICA MIL LED).

- **Tinción de Diferenciación Osteogénica con Rojo de Alizarina.**

La tinción con rojo de alizarina se utiliza para evaluar los depósitos minerales ricos en calcio durante el proceso de diferenciación Osteogénica de los cultivos inducidos.

Se fijaron las células con formalina neutra al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente

Se lavaron las muestras 2 veces con agua destilada durante 5 minutos.

Se colocó 1 ml de la solución de Rojo de Alizarina al 2% (SIGMA) por muestra durante 20 min a temperatura ambiente.

Se lavaron las células 3 veces con agua destilada durante 5 minutos.

- **Marcadores de membrana con osteopontina**

Se lavaron las muestras con solución buffer (PBS)

Se fijaron las muestras con formalina neutra al 10% por 20 minutos (100µL por pocillo).

Después, se permeabilizaron las muestras con Triton X100 (SIGMA ALDRICH) a 0.05% (100µL por pocillo) durante 20 minutos a temperatura ambiente Se bloquearon por un tiempo de 45 minutos con albumina al 1% (100µL por pocillo). Posteriormente, se incubaron las muestras con el anticuerpo osteopontina a una concentración 3:1000 (abcam) por 45 minutos a temperatura ambiente.

Se incubaron con el segundo anticuerpo Alexa Fluor™ 488 4:1000 durante 45 minutos a temperatura ambiente.

- **Ensayo con QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit (SIGMA-ALDRICH)**

La fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio.

La fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente distribuida que hidroliza el enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico liberando fosfato inorgánico. Está presente en riñón, hígado, intestino y hueso.

Como sustrato de la fosfatasa alcalina se utiliza un compuesto artificial: p-Nitrofenil-fosfato que, al poseer un resto orgánico con un grupo fosfato unido, puede ser reconocido por la enzima.

Kit QuantiChrom™ fosfatasa alcalina Ensayo BioAssay Systems está diseñado para medir la actividad ALP directamente en muestras biológicas sin tratamiento previo. El método utiliza fosfato de p-nitrofenilo que se hidroliza por ALP en un producto de color amarillo (absorbancia máxima a 405 nm). La velocidad de la reacción es directamente proporcional a la actividad de la enzima.

Procedimiento.

Preparación de la muestra:

Las muestras se lavaron 2 veces con PBS y se permeabilizaron en 0,5 ml de 0,2% Tritón X-100 en agua destilada por agitación durante 20 min a temperatura ambiente.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Posteriormente se preparó la solución de trabajo del QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250) para cada muestra de la siguiente manera:

Tampón de Ensayo: 193 μ L

Mg de acetato: 5 μ L

pNPP líquido: 2 μ L

Procedimiento mediante placa de 96 pocillos:

Se colocó 200 μ L de agua destilada (H₂O) y 200 μ L de calibrador de tartrazine en pocillos separados de una placa de 96 pocillos con fondo plano.

Se colocó 5 μ L de la muestra en pocillos diferentes.

Se le agregó 195 μ L de la solución de Trabajo a las muestras. El volumen final de reacción en los pocillos de muestra debe ser de 200 μ L.

Para determinar la actividad de fosfatasa, los ensayos se evaluaron en 3 tiempos, día 7, 14 y 21. Con 2 grupos: células inducidas y células no inducidas.

Inmediatamente después de colocada la solución de trabajo se realizaron 2 lecturas de la Dispersión Óptica mediante lector de ELIZA (Thermo Labsystems Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 405nm a tiempo 0 y tiempo a 4 minutos, en la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de FES Iztacala.

RESULTADOS

Cultivo primario y caracterización morfológica de las células mesenquimales de papila apical.

Una vez obtenido el cultivo primario con técnica de disgregación mecánica, el explante fue observado diariamente bajo microscopia óptica para observar la confluencia celular.

Se observó que después de 2 semanas de realizado el cultivo de la papila apical se comenzaron a mostrar las primeras células con morfología en forma de huso. **(Fig. 16)**

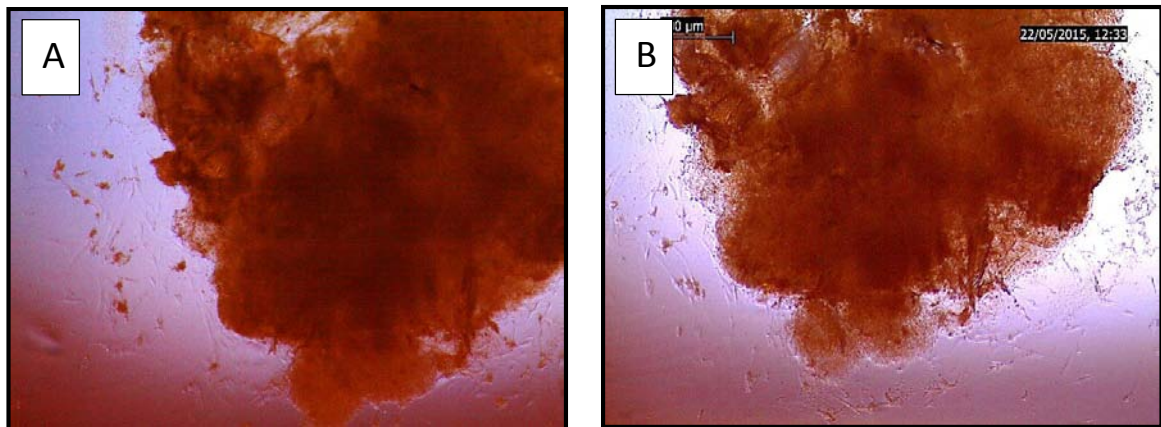


Fig. 16. A y B: Explantes del cultivo primario de papila apical mantenidas con medio de cultivo y mantenidos con CO₂ al 5%, se observa la aparición de las primeras células con morfología fibroblastoide alrededor del explante durante la segunda semana del cultivo. (Obj 4X)

Las células de los explantes de papila apical de terceros molares mostraron un óptimo crecimiento, bajo los cuidados establecidos: cambio de medio de cultivo 2 veces por semana con 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) incubados con CO₂ al 5%.

En el cultivo primario, se observaron la formación de colonias a partir de la 5ta semana y una confluencia al 80%. **(Fig. 17).**

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

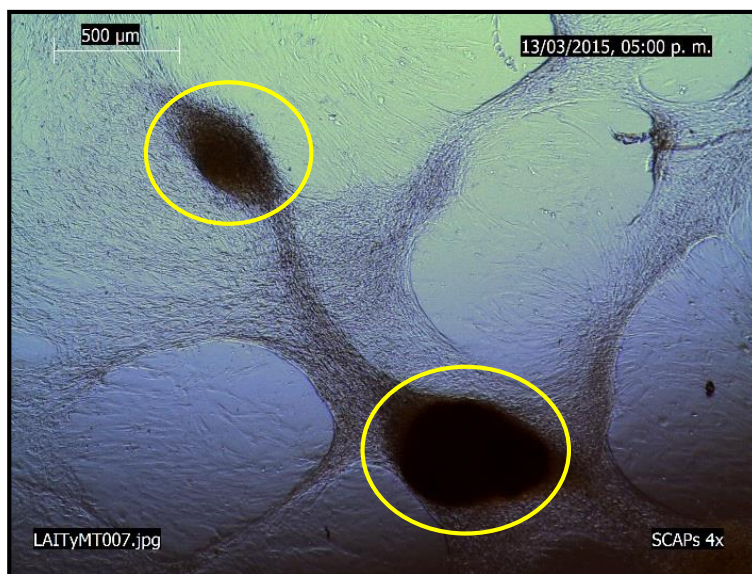


Fig. 17. Aparición de Unidades formadoras de colonias de papila apical, durante la quinta semana de cultivo (señaladas con círculos amarillos; obj. 4X)

Expresión de marcadores antigénicos de superficie celular para la identificación de las células mesenquimales de papila apical a través de la purificación mediante Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) con anticuerpo anti-CD44 MicroBeads, human (Miltenyi Biotec) y análisis de Inmunofluorescencia con anti-CD44⁺ y anti-CD34⁻

La identificación de células mesenquimales de las líneas celulares de papila apical se realizó mediante purificación celular con Magnetic Activated Cell Sorting (**MACS**), las células positivas fueron sembradas en portaobjetos, para posteriormente realizar el análisis inmunocitoquímico, utilizando el anticuerpo anti-CD44, y con el marcador de superficie para células hematopoyéticas con anticuerpo CD34 y tinción de núcleo con DAPI, para el control negativo.

Las células aisladas de papila apical de terceros molares inmaduros humanos, del segundo y tercer pasaje, se expresaron *positivas* a los marcadores de superficie celular CD44, confirmando así la presencia de células mesenquimales, en cuanto al marcador específico para células hematopoyéticas, el CD34 no se expresó en las células mesenquimales de papila apical. (**Fig. 18**).

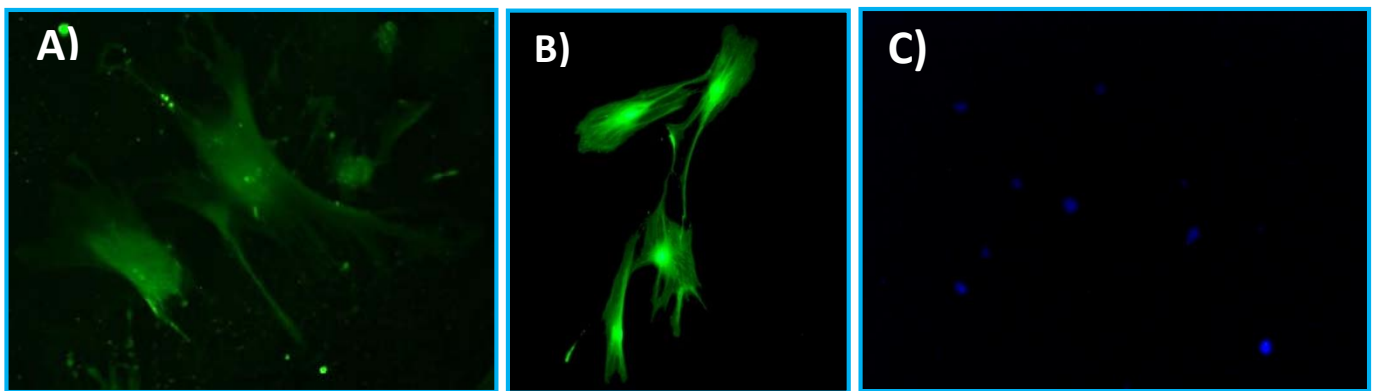


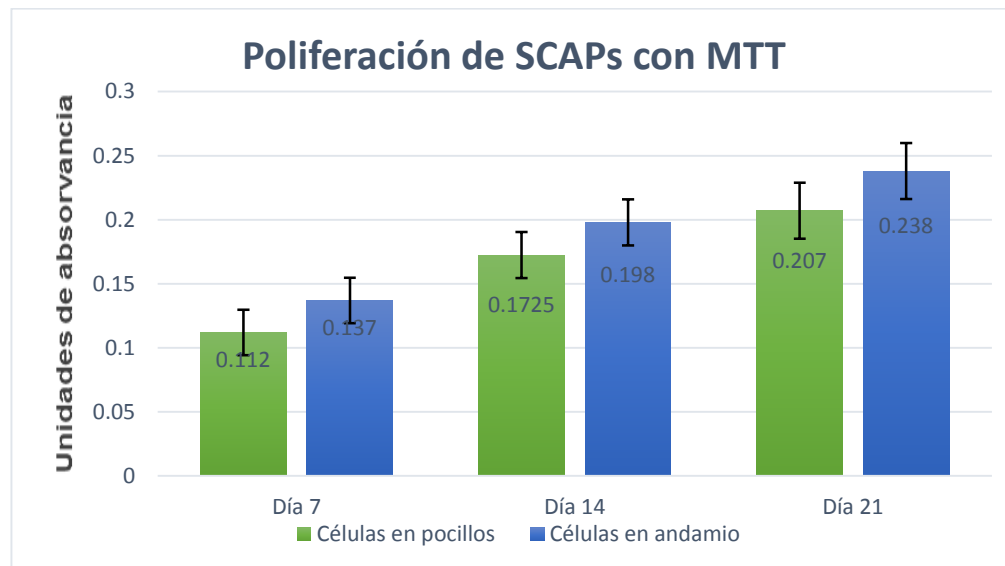
Fig. 18: Identificación de SCAPs. Imágenes de microscopía de fluorescencia de SCAPS para marcadores anti-CD44 (A) 2do pasaje. (B): 3er pasaje (10x obj,) la población purificada de SCAP mostraron positividad al anticuerpo CD44, con morfología de huso (C) 10x obj. Negativo para CD34 y tinción de núcleos con DAPI. Microfotografías obtenidas en la unidad de biomedicina de la FESI (UBIMED)

Ensayos in vitro de andamios quitosano/poli-lisina y células cultivadas en pocillos.

Los andamios quitosano/poli-lisina, en proceso de patente, así como la caracterización de los andamios está en poder del autor Rodríguez-Lorenzo *et al.*, desarrollados en el Consejo Superior Investigación Científica, Madrid, España.

Ensayo de Proliferación celular con MTT

Este método se utilizó para medir viabilidad y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido y el color es leído con un lector de ELISA. Los resultados muestran que la proliferación y la viabilidad de las SCAPs no fueron alteradas en presencia de los andamios de quitosano/poli-lisina en comparación a las células cultivadas en pocillos. Esto probablemente por el componente (poli-lisina) que favorece a la adhesión celular. **(Grafica 1)**



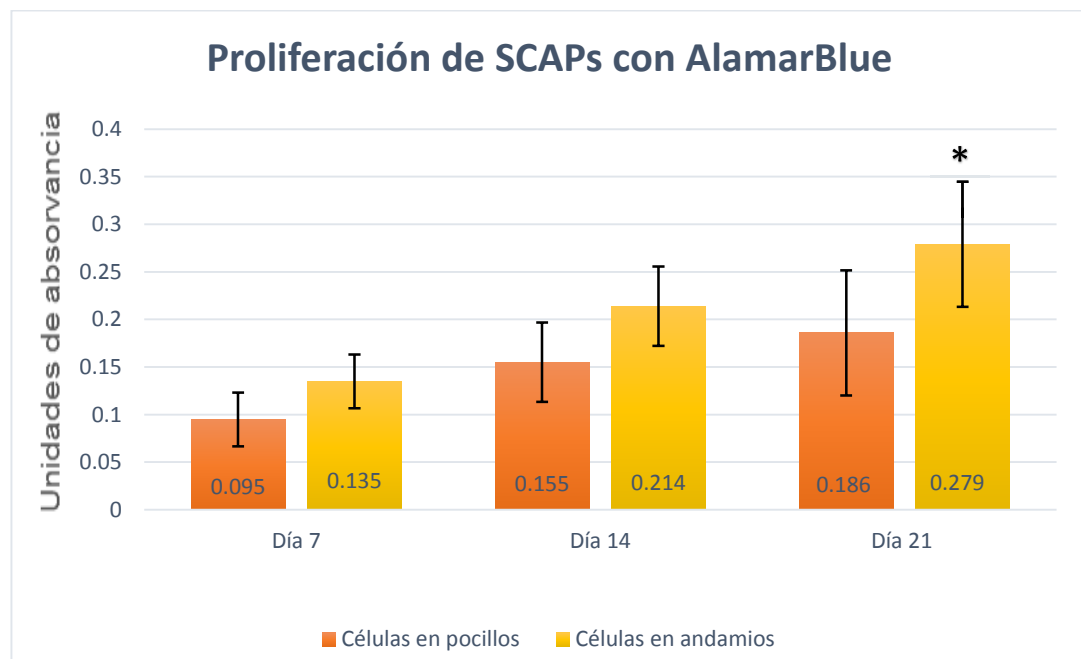
Grafica 1: Proliferación celular mediante ensayo MTT en 2 grupos: SCAPs en pocillos y SCAPs en andamios de Quitosano/Poli-lisina. Se observa una proliferación mayor con respecto al día 7 al día 21, en los 2 grupos, los resultados también indican proliferación celular ligeramente mayor en el andamio, esto probablemente por el componente poli-lisina. Sin embargo, el grupo experimental andamio presentó una proliferación celular ligeramente mayor ($M=0.19100$ $SD: 0.5086$) que el grupo control ($M=0.1638$, $SD: 0.0480$). $t(2)=0.672$ $p=0.945$. Concluyendo con esto que estadísticamente la proliferación no fue significativa en el grupo andamio.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Ensayo de Proliferación Celular con Alamar Blue.

Los resultados muestran la actividad metabólica de SCAPs cultivadas en andamios de quitosano/poli-lisina y cultivadas en pocillos. La gráfica muestra la absorbancia de AlamarBlue a 570nm y la actividad metabólica evaluada en tres tiempos (día 7, 14 y 21). En todos los tiempos la proliferación fue mayor en los andamios sobre las células solas, pero es en el día 21 donde se observa una diferencia estadística significativa.

(Grafica 2).



Grafica 2. La actividad metabólica de SCAPs fue evaluada a tres tiempos (día 7, 14 y 21). Mediante ensayo con Alamar Blue, en 2 grupos: SCAPs en pocillos y SCAPs en andamios de Quitosano/Poli-lisina.

El grupo experimental andamio presentó una viabilidad celular mayor (M= 0.2093 SD: 0.0721) que el grupo control (M= 0.1453, SD: 0.0462). $t(2)= 4.1283$ $p= 0.0539$. Los datos indican que existe una diferencia estadística entre los dos grupos experimentales.

El asterisco indica la diferencia estadística en la proliferación celular correspondiente al día 21 del grupo con andamio.

Viabilidad por ensayo de vida y muerte (Live & Dead) de SCAPs.

Las células vivas mediante tinción verde fluorescente con calceína-AM para indicar la actividad esterasa intracelular y en etidio rojo fluorescente homodímero-1 para indicar la pérdida de la integridad de la membrana plasmática como lo muestran las imágenes 10x de microscopía de fluorescencia (**Fig.19**).

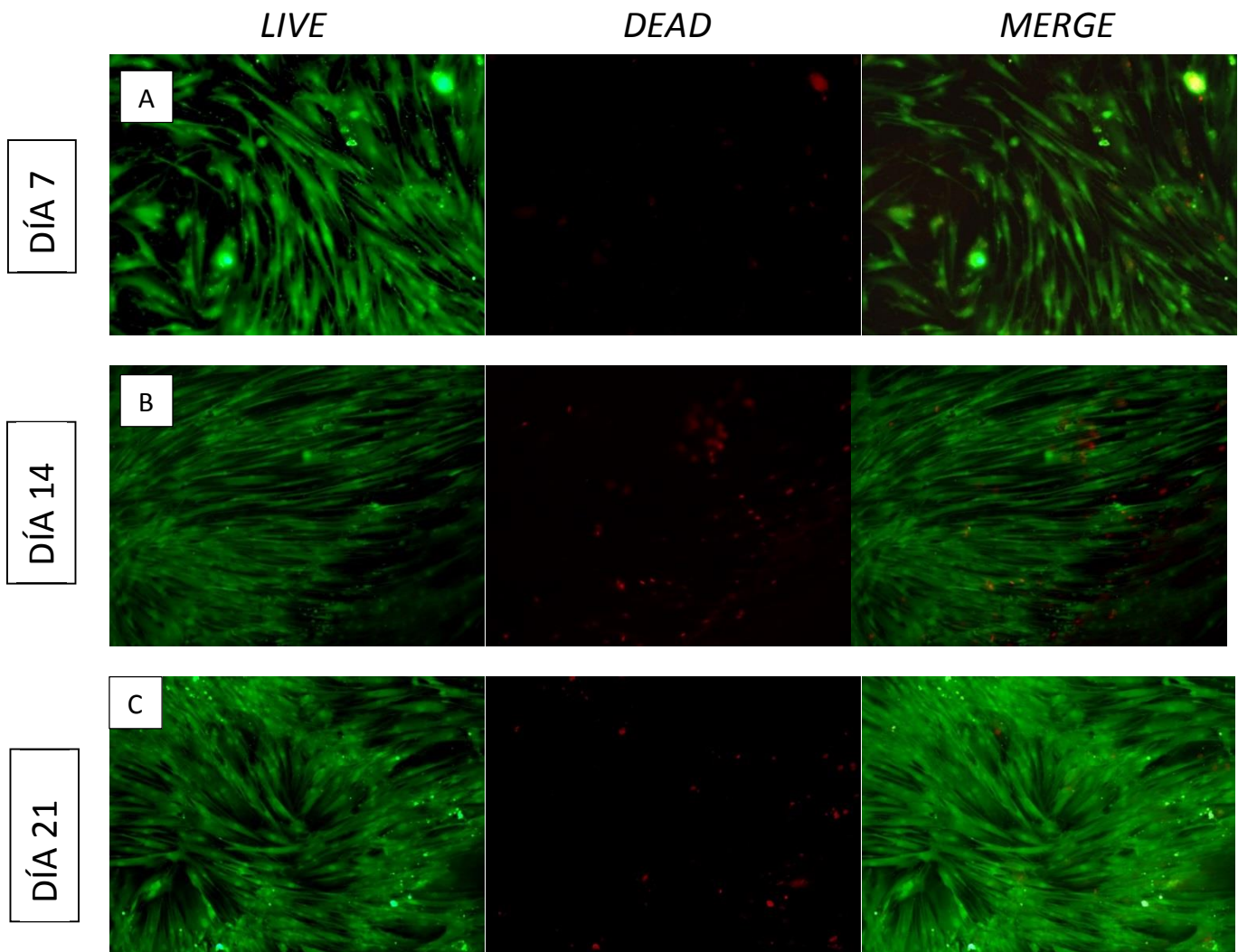


Fig 19: Evaluación de la viabilidad celular (SCAPs) con *Live & Dead*, en tres tiempos. (A) Día 7. (B) Día 14. (C) Día 21. En los tres tiempos se puede observar mayor cantidad de células viables (verdes) en comparación a las muertas (rojas).

Viabilidad de células mesenquimales cultivadas en andamios de quitosano/poli-lisina con Live & DAPI.

Las Imágenes 10x de microscopía de fluorescencia de SCAPS muestran células vivas adheridas a la matriz del andamio mediante tinción verde fluorescente con calceína-AM para indicar la actividad esterasa intracelular y tinción de núcleos con DAPI, evaluadas a 3 tiempos (Día 7, 14 y 21). Las imágenes muestran mayor cantidad de células adheridas en el andamio en el día 21 con respecto al día 7 y día 14. **(Fig. 20)** estos resultados nos indican que el andamio es biocompatible y posee propiedades que permiten la adhesión y proliferación celular.

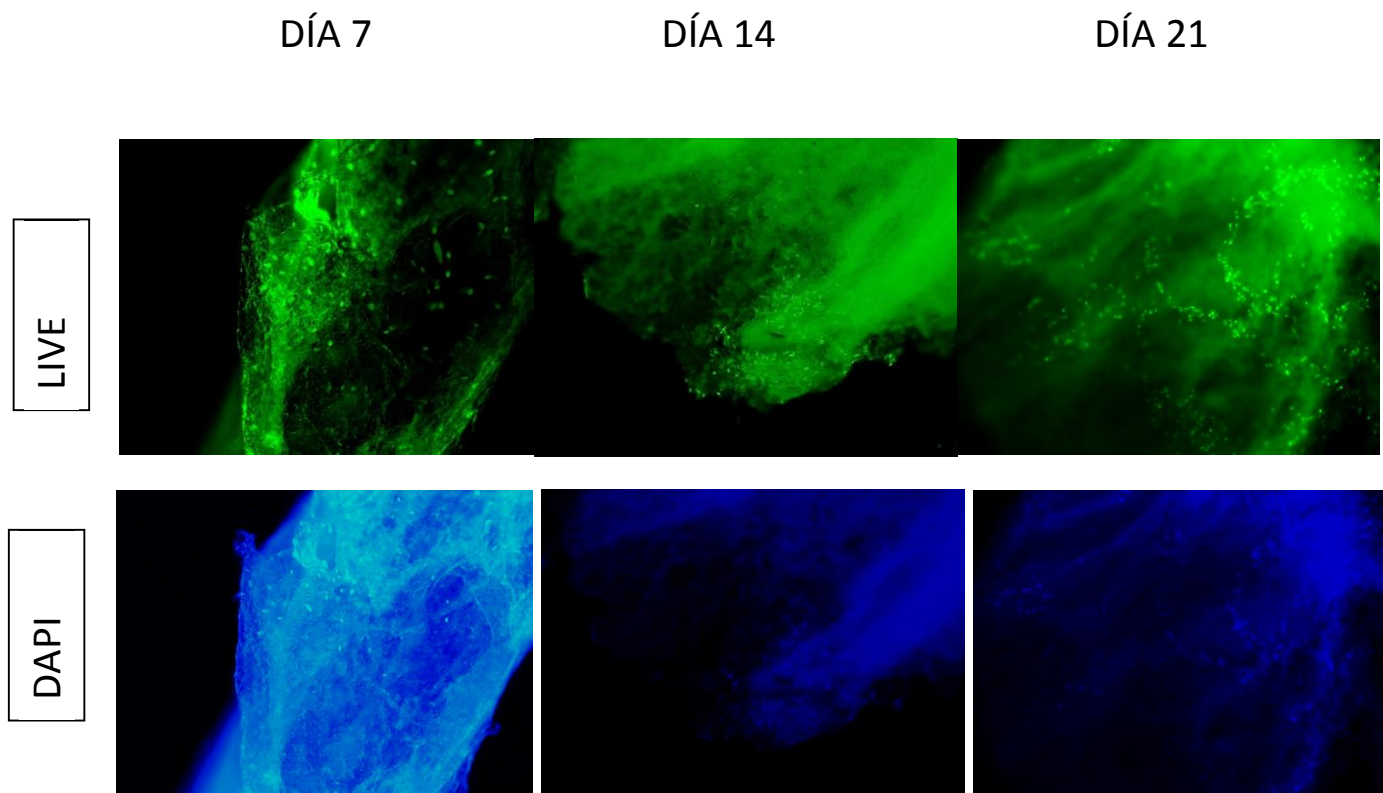


Fig. 20: Las microfotografías (obj. 10X) mediante calceína-AM Y DAPI muestran células viables y adheridas a la matriz del andamio principalmente en el día 21.

Comparación de la viabilidad de SCAPs en pocillos y andamios de quitosano/poli-lisina con calceína-AM.

En la comparación de imágenes de la viabilidad celular, mediante tinción verde fluorescente con calceína-AM en pocillos y andamios de quitosano/poli-lisina, se puede apreciar que la cantidad de células en pocillos es aparentemente mayor, debido a la morfología celular se aprecia en forma de huso en comparación a las células en los andamios se observa en forma oval, (**Fig. 21**) sin embargo, cabe mencionar que el andamio es una estructura tridimensional y las microfotografías fueron tomadas a un plano.

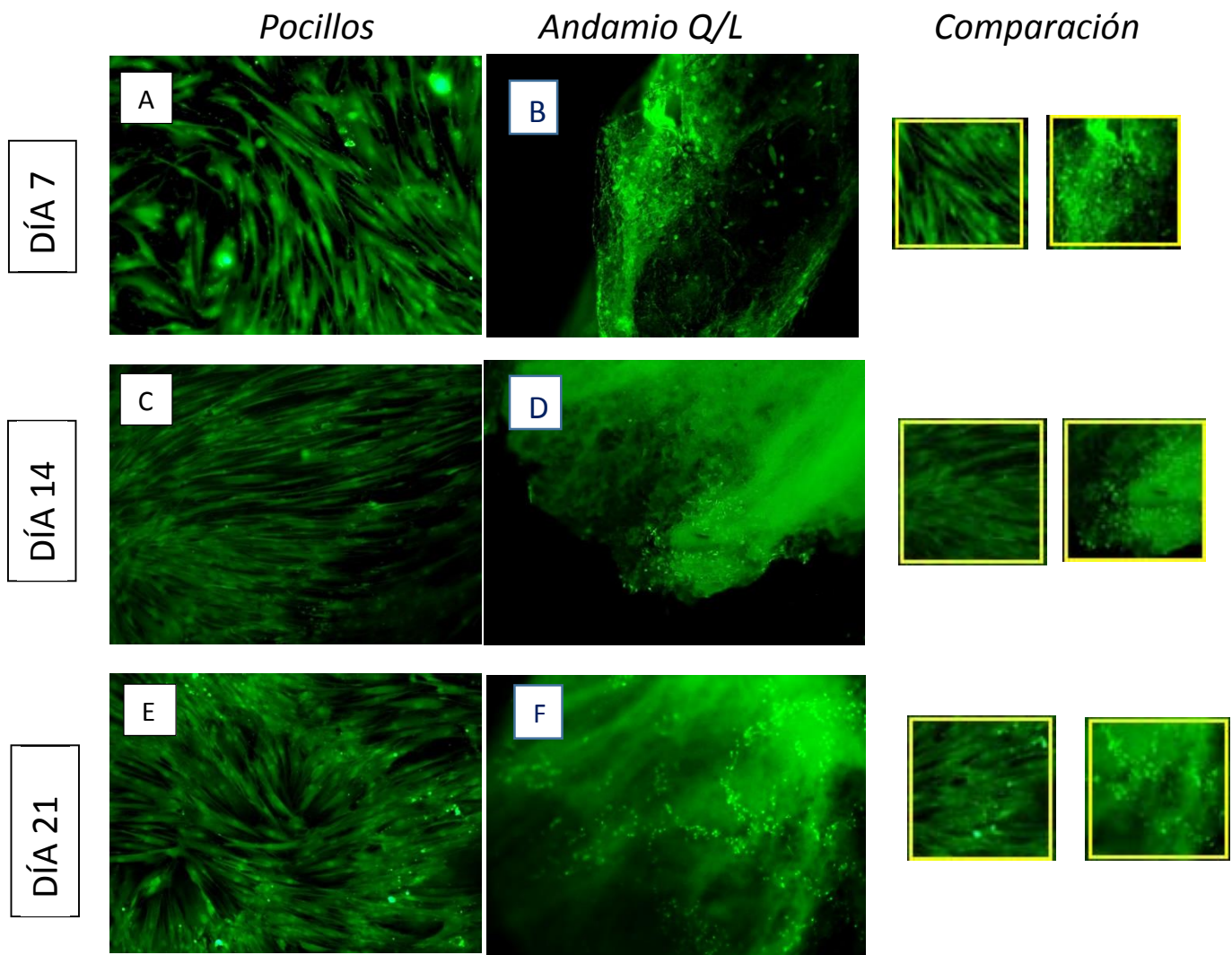
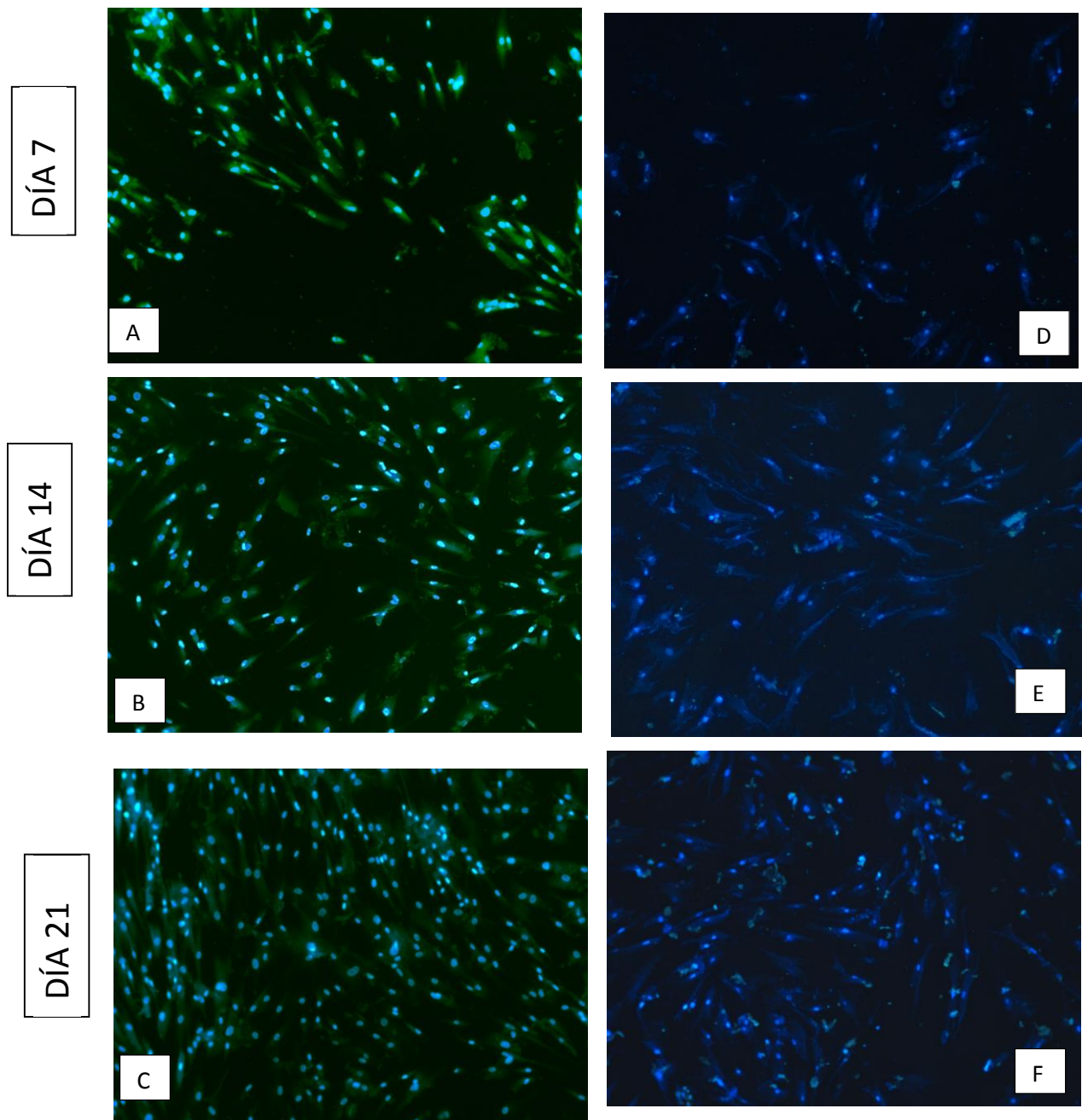


Fig 21: Comparación de la viabilidad celular de SCAPs con calceína-AM, en tres tiempos. (A, C Y E) células en pocillos, (B, D Y F) Células en andamios. En recuadros amarillos de las zonas más representativas

Ensayo Eddu Proliferation con Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488

Los resultados muestran células en fase S del ciclo celular (**Fig 22: A-C**; citoplasma verde, núcleos azules), lo que significa que están en proliferación. Contrariamente a las células que se les agrego DMSO, en las cuales se observa un citoplasma no delimitado y tinción de algunos núcleos (**Fig 22: D-F**) como lo muestran las imágenes 10x de microscopía de fluorescencia.



Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares

Fig. 22: Ensayo con Edu Proliferation (A-C) Grupo tratado con Medio de cultivo y con Kit EdU Alexa Fluor. (D-F) Grupo control con DMSO.

Diferenciación al linaje osteogénico.

Para evaluar su multipotencialidad las SCAPs fueron sometidas a inducción y diferenciación hacia el linaje osteogénico, en tres tiempos (ver metodología).

Se realizó tinción con Von Kossa y Rojo de Alizarina a tres tiempos (día 14, 21 y 28) para evaluar depósitos cálcicos, así como actividad de Fosfatasa Alcalina por absorbancia a los días 7, 14 y 21, adicionalmente se evaluó con un marcador intermedio a tardío como Osteopontina al día 21.

Tinción de depósitos cálcicos con Von Kossa.

Los resultados de la tinción con Von Kossa de las SCAPs inducidas muestran mayor cantidad de depósitos cálcicos (depósitos negros) en los días 14, 21 y 28 del grupo experimental con respecto al grupo control. **(Fig. 23)**

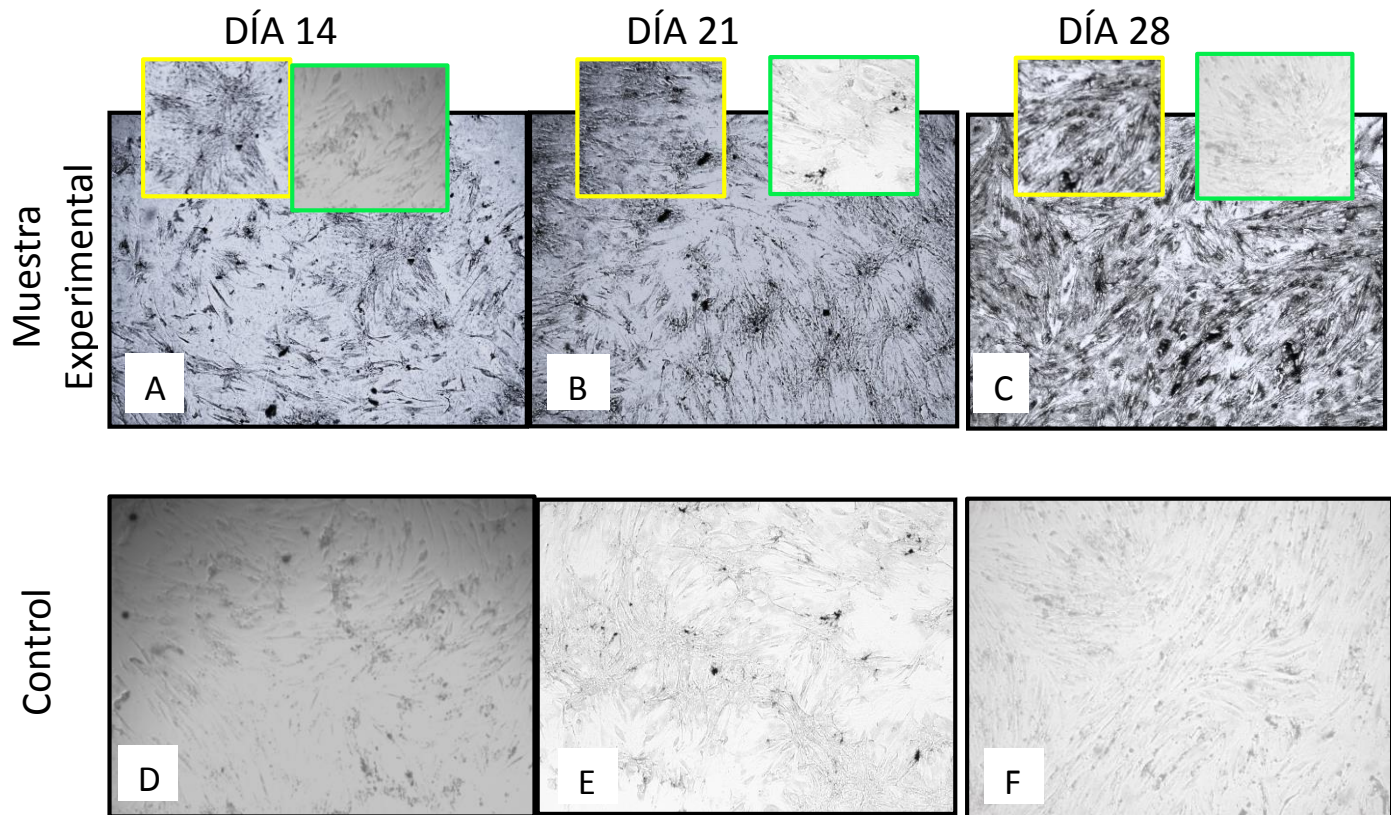


Fig. 23: Diferenciación osteogénica, la tinción positiva se observa mediante los depósitos negros de mineralización (A-C), obsérvese el incremento gradual del día 14 al día 28. (D-F) Grupo control. En recuadros amarillos, zonas más representativas de la mineralización del grupo experimental, recuadros verdes zonas más representativas de la mineralización del grupo control

Tinción de depósitos cálcicos con Rojo de Alizarina.

Los resultados de la tinción con Rojo de Alizarina muestran depósitos de calcio (manchas rojizas) a partir del 14 de diferenciación, incrementando gradualmente al día 28 originados como resultado de una diferenciación positiva, en comparación a los grupos control. **(Fig.24)**

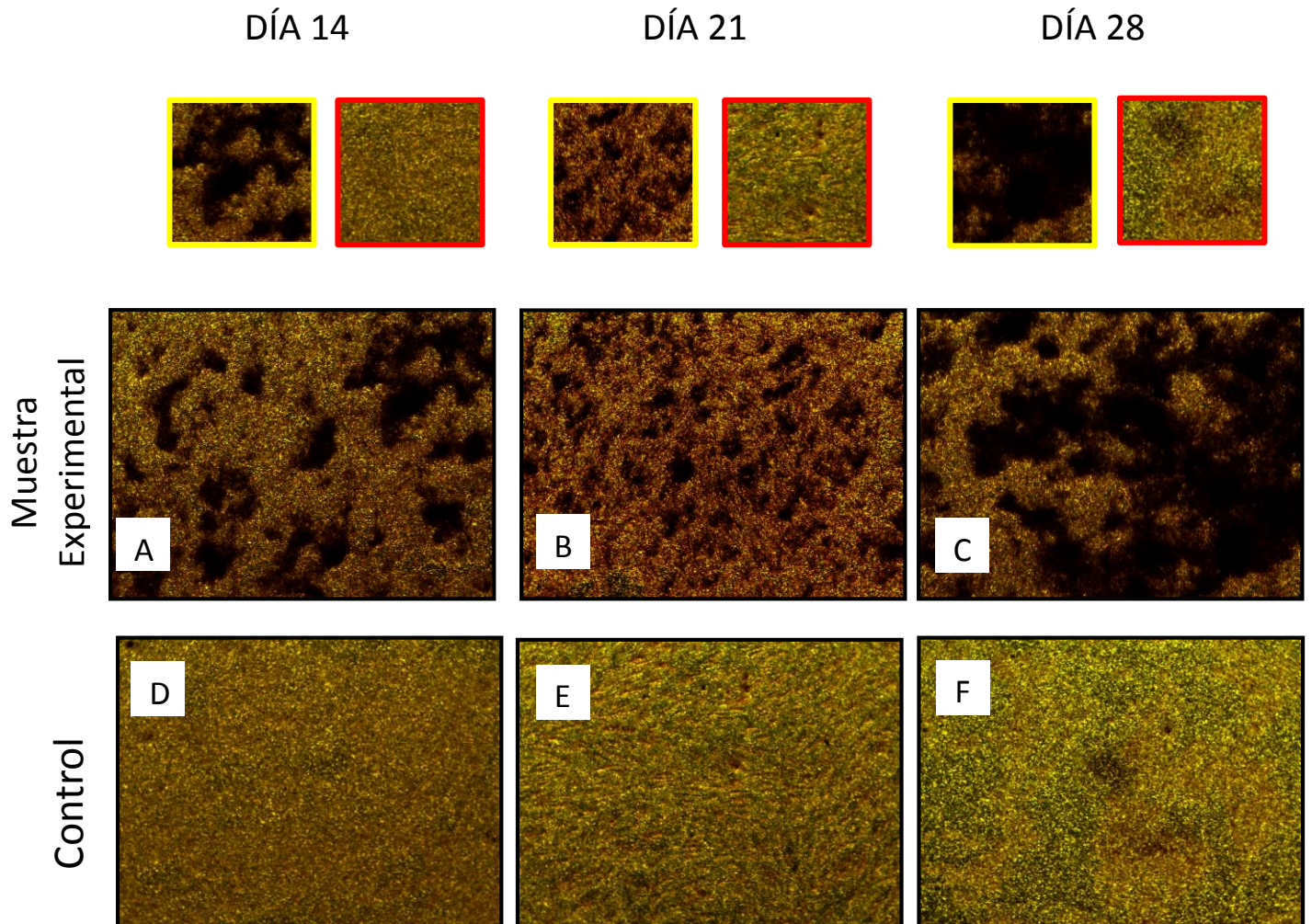
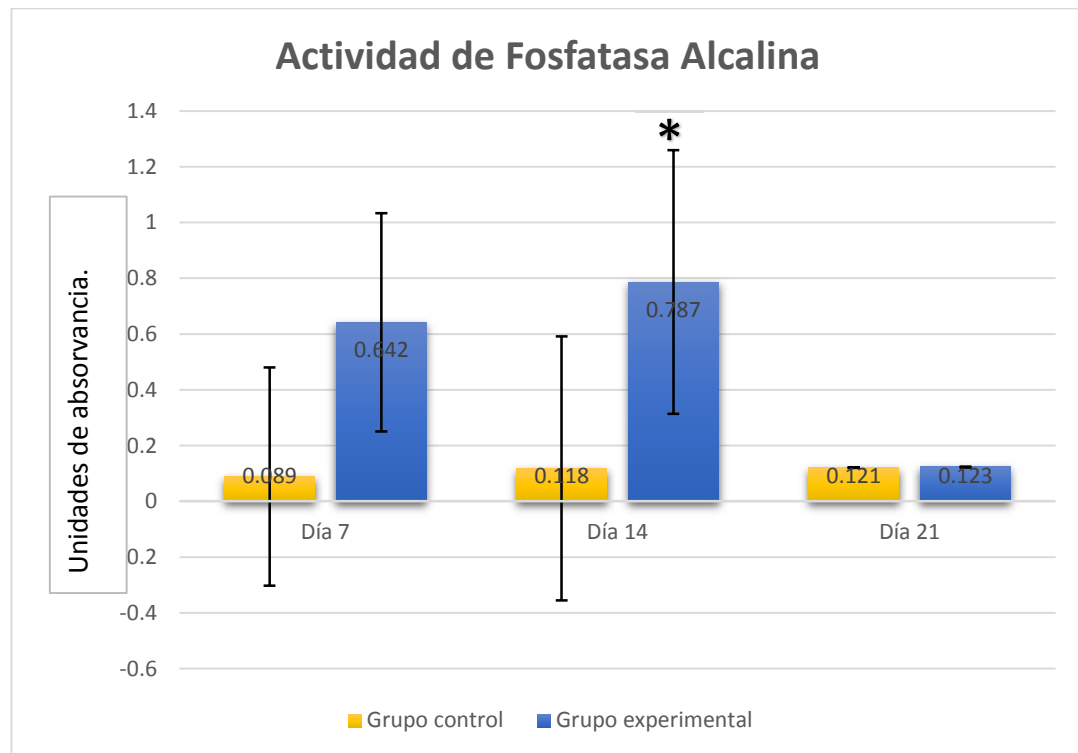


Fig. 24: Diferenciación osteogénica. Tinción con rojo de alizarina (A-C) Formación de depósitos de calcio, en los diferentes tiempos (día 14, 21 y 28, respectivamente) (D-F) Grupo control. En recuadros amarillos, zonas más representativas de la mineralización del grupo experimental, recuadros verdes de las zonas más representativas de la mineralización del grupo control.

Actividad de Fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina es un marcador temprano en la diferenciación osteogénica, en este estudio la fosfatasa alcalina se expresa en un estadio temprano de la diferenciación osteogénica con una absorbancia entre 0.6 y 0.7 para el día 7 y casi 0.8 para el día 14, con una absorbancia muy baja para el día 21, como se aprecia en la **Grafica 3**.



Grafica 3: Actividad de fosfatasa Alcalina (ALP). Después de los 7 días de diferenciación, la expresión de fosfatasa alcalina fue significativamente incrementada en comparación al control, alcanzando su máximo en el día 14, y posteriormente al día 21 se observó la disminución de la expresión de fosfatasa alcalina, por lo tanto el grupo experimental que se mantuvo con medio osteogénico presentó actividad de fosfatasa alcalina significativamente mayor ($M= 0.5173$, $SD: 0.3491$) que el grupo control ($M= 0.1093$, $SD: 0.0176$). $t(2)= 2.022$ $p=0.033$.
Con asterisco el incremento más significativo en la expresión de fosfatasa alcalina.

Marcador de superficie con Osteopontina al día 21

La Osteopontina es un marcador medio-tardío en la diferenciación osteogénica, la osteopontina (OP) es una glicoproteína secretada por una variedad de tejidos, incluyendo el hueso, tejidos dentales, renales y vasculares. No obstante, son sintetizadas y secretadas predominantemente por osteoblastos y osteocitos y está asociada con la remodelación ósea. En este estudio solo se evaluó la expresión al día 21 en el cual se expresó positivamente. **(Fig. 25)**

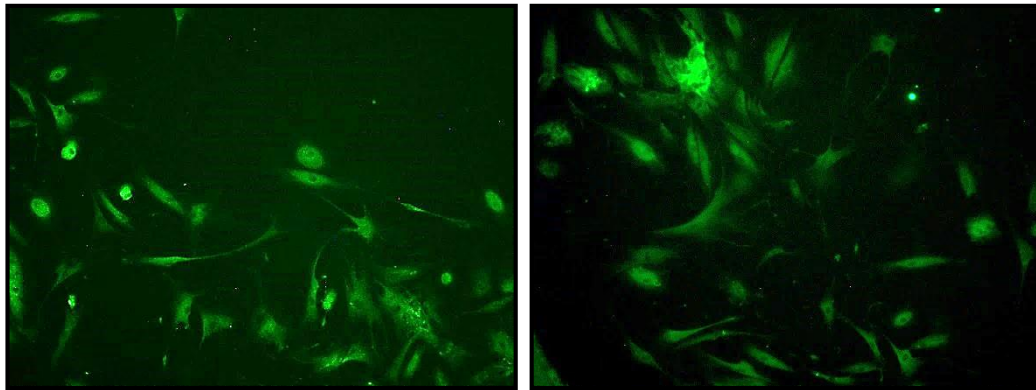


Fig. 25: Se observa la positividad en el día 21 de la inducción osteogénica mediante Inmunofluorescencia con anticuerpo primario osteopontina y anticuerpo secundario Alexa 488.

Discusión

Las células mesenquimales de papila apical (SCAPs) son una población única de células mesenquimales localizadas en el ápice de las raíces inmaduras, con la capacidad de autorenovarse y con capacidad multipotente. Las SCAPs han sido aisladas de dientes permanentes inmaduros humanos durante la formación de la raíz. La papila apical surge durante un estadio temprano del desarrollo del órgano dentario y juega un papel importante en la formación de la dentina radicular y la pulpa dental (9, 27, 30, 36). Las SCAPs son una excelente fuente de células para la generación del complejo dentino-pulpar (9, 36).

El objetivo de este estudio fue aislar y cultivar células mesenquimales de papila apical de terceros molares inmaduros humanos, para caracterizar su inmunofenotipo, determinar su proliferación en andamios de quitosano/poli-lisina y diferenciación al linaje osteogénico. Para lograr este objetivo, se definieron las características del órgano dental a utilizar, que en este caso fueron recolectados 10 terceros molares inmaduros de pacientes jóvenes entre 17 y 19 años de edad en la clínica odontológica de Cuauhtepac. Para obtener Células Mesenquimales derivadas de papila apical se llevó a cabo el cultivo con la técnica de disgregación mecánica y explante. Durante la segunda semana del cultivo se observó la confluencia celular, con morfología en forma de huso y durante la quinta semana se observó CFU-F, (unidad de formación de colonias, fibroblástica), características reportadas para las células mesenquimales por Friedenstein *et al.* (2) Sonoyama *et al.*, en sus estudios, reporto la presencia de CFU-F durante la 2^{da} y 3^{ra} semana de cultivo mediante técnica de digestión enzimática (9, 30).

Gronthos *et al.*, (4,5) reportó a las moléculas CD44 y el STRO-1 como marcadores positivos de superficie específicos de las células mesenquimales de origen dental. Sonoyama *et al.*, (9, 30) fue el primer autor en caracterizar a las SCAPs, entre sus resultados de inmunocaracterización demostró positividad a marcadores de superficie como STRO- 1, CD146, CD24, CD166, CD73, CD90, CD105, CD106, CD29 y

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

ALP, pero negativo a CD18, CD14, CD34, CD45, CD 150. Resultados que coinciden con Yao Li et al. (43, 45), Bakopoulou *et al.*, (31, 32) Chen *et al.*, (33), Chang *et al.*, (46) Binbin Qu *et al.*, (47). Schneider *et al.*, (37) en la presente investigación se obtuvieron resultados con CD44 como marcador positivo y CD34 como marcador negativo, sin embargo habría que realizar más estudios de inmunocaracterización, para demostrar qué marcador de superficie es el apropiado para la caracterización de SCAPs.

Estudios por Sonoyama *et al.*, (9,30) Bakopoulou *et al.*, (32) Chen *et al.*, (33) han demostrado que la proliferación de SCAPs es de 2 a 3 veces mayor en comparación a las células de la pulpa dental y ligamento periodontal. Por otro lado Trevino *et al.* (38) Shresha *et al.* (53) han confirmado su capacidad de proliferación y viabilidad celular en diferentes tipos de andamios. En este estudio se demostró la proliferación por medio de ensayos por absorbancia con MTT y Alamar Blue de SCAPs señalando proliferación celular ligeramente mayor mediante el ensayo Alamar Blue al ser sembradas en andamios de quitosano/ poli-lisina en comparación a las células sembradas en pocillos de cultivo. Esto sugiere que la composición del andamio favorece a la adhesión celular. (51)

Los resultados con la técnica de Live & Dead sugieren que las células cultivadas en pocillos, aparentemente, en cantidad son mayor en comparación a las cultivadas en los andamios, sin embargo cabe recordar los resultados de proliferación y viabilidad con MTT y Alamar Blue que miden la actividad metabólica celular, los cuales demostraron que existe mayor actividad celular en los andamios que en los pocillos, además estos resultados son más confiables, debido a que las microfotografías fueron tomadas a un solo plano y el andamio es una estructura tridimensional.

Nuestros resultados con la técnica de Live & Dead indican que el andamio es viable y no citotóxico, en las células sembradas en pocillos a 3 tiempos (día 7, 14 y 21); se observa mayor cantidad de células viables con actividad esterasa (fluorescentes en verde) en comparación a las muertas con fragmentación de la membrana celular (fluorescentes en rojo), en donde se ve la escasa mortalidad celular.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

Se realizó ensayo con Edu Proliferation a 3 tiempos (día 7, 14 y 21) donde se demuestra que las SCAPs son altamente proliferativas ya que en los tres tiempos se observa que las células se encuentran en la Interfase, específicamente en la fase de síntesis (S), del ciclo celular, en esta etapa la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas. En la revisión de la literatura, no se encontró algún diseño que efectuará este tipo de ensayo.

Todos nuestros resultados de viabilidad y proliferación celular coinciden en la noción de que las SCAPs son altamente proliferativas y viables, demostrados en los estudios citados anteriormente.

La papila dental, es un tejido importante durante la odontogénesis, puesto que es el tejido formador de la pulpa dental y la dentina radicular, Kamata *et al.*, (18) y Shteyer *et al.*, (19) realizaron los primeros estudios de inducción al tejido osteogénico y odontogénico, de las células obtenidas de papila dental humana, inicialmente llamadas: *Human Dental Papilla* (HDP); sus resultados reportaron la capacidad de diferenciación al tejido osteogénico y odontogénico.

Sonoyama *et al.*, (30) Bakopoulou *et al.*, (32), Huang *et al.*, (36), Jiayuan *et al.*, (41) Park *et al.*, (57), también reportaron el potencial de diferenciación al tejido osteogénico, odontogénico, condrogénico y en menor proporción adipogénico. Zou *et al.*, (42) sugiere con su estudio, la diferenciación al tejido neurogénico, sin embargo hace falta realizar estudios *in vivo* de dicho tejido.

En este trabajo, las Células Mesenquimales de Papila Apical (SCAPs) mantenidas en un medio específico se logró la osteoinducción. Nuestros resultados demuestran el potencial de SCAPs en expresar depósitos cálcicos *in vitro* analizados por medio de tinción con Von Kossa y Rojo de Alizarina, la actividad de la fosfatasa alcalina en un estadio temprano, coincidiendo así con los resultados de Park *et al.*, (57) y presencia de Osteopontina en un estadio medio-tardío, concordando con los resultados de Kamata *et al.*, (18).

Los resultados de este trabajo demuestran que las SCAPs presentan una alta tasa de proliferación, poseen plasticidad hacia el tejido osteogénico, que se mantienen

Estudio *in vitro* de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

indiferenciadas hasta que son expuestas a señales apropiadas (medio osteoinductor), como lo han demostrado Sonoyama *et al.*, (30) Bakopoulou *et al.*, (32), Huang *et al.*, (36), Jiayuan *et al.*, (41), Park *et al.*, (57), las SCAPs tienen la habilidad de autorenovarse por periodos prolongados, Schneider *et al.* (37).

En consecuencia, existe un gran potencial de las células mesenquimales de papila apical, para su futura aplicación clínica ya que pueden ser utilizadas en Medicina Regenerativa y Odontología Regenerativa.

Shresha *et al.*, (56) en su estudio de andamios de nanopartículas de quitosano fusionalizados con dexametasona, en sus resultados con MTT demuestra una buena tasa de proliferación, en los presentes resultados de MTT Y Alamar Blue indican que el andamio de quitosano/poli-lisina propician la proliferación celular, por lo que se concluye que el andamio quitosano/poli-lisina puede ser utilizado en la ingeniería tisular, coincidiendo con los resultados de Shresha *et al.*, (56).

Conclusiones

- Las células mesenquimales multipotentes pueden ser aisladas a partir de la papila apical de terceros molares humanos en formación, de pacientes jóvenes de 17-19 años, edad en la que aún no existe el cierre del ápice dental en los terceros molares.
- La técnica de cultivo de disgregación mecánica y explante, resultó efectiva para la realización de cultivo celular de la papila apical.
- Las células derivadas de papila apical de terceros molares inmaduros humanos, contienen poblaciones celulares, entre las cuales existen células mesenquimales, que expresan marcadores como CD44, que las identifican como células mesenquimales multipotentes (SCAPs).
- La técnica de MACs, es una técnica efectiva para obtener una población homogénea de células mesenquimales de papila apical (SCAPs).
- El potencial de diferenciación de las SCAPs quedó demostrada mediante tinción con Von Kossa y Rojo de Alizarina, actividad de fosfatasa alcalina por absorbancia, inmunofluorescencia con Osteopontina, bajo condiciones específicas se logra la inducción al linaje osteogénico
- Los ensayos de viabilidad y proliferación celular de las SCAPs demostraron su potencial para su probable utilización clínica en la regeneración de tejidos.
- Los resultados indicaron proliferación ligeramente mayor en el andamio. Esto es por el componente (poli-lisina) que favorece la adhesión celular y por las propiedades del quitosano (no tóxico y biocompatible), lo que indica biocompatibilidad entre las células y el andamio.
- La utilidad de las células mesenquimales en las futuras aplicaciones clínicas depende de la accesibilidad al tejido de origen, de su tasa de proliferación y de su potencial de diferenciación.
- El presente trabajo confirma el potencial de las SCAPs para diferenciarse hacia diferentes linajes principalmente al tejido osteogénico y odontogénico.

Referencias

- 1.- Lemus, C. L., Almagro, U. Z., & León, C. C. (2006). The origin and evolution of dental implant. *Ciencias tecnológicas*, pp.1-9.
- 2.-Flores, F., Montesinos, J., & Mayani, H. (2006, Septiembre-Octubre). Células mesenquimales troncales: historia biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica*, 58, pp.498-511.
- 3.- Langer, R. & Vacanti, J. (1993). "Tissue engineering". *Science*, 260, pp. 920-927.
4. Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Gehron, R., & Shi, S. (2000, Diciembre 5). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, pp.13625–13630.
5. Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P., & Shi, S. (2002, Junio 5). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res*, 81, pp.531–535.
6. Chan, B., & Leong, K., (2008) Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J Suppl* 4, 17, pp.S467–S479.
7. Rosales, R., Alvarado, K., & Ojeda, F., (2012, Agosto). Ingeniería Tisular en Odontología. *REVISTA ADM*, 69, pp.164-167.
8. Fergal, J., & O'Brien. (2011, Marzo). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14, pp: 88-95.
9. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Takayoshi, Y., Seo, B., Chunmei, Z., Liu, H., Gronthos S., Wang, C., Shi, S., & Wang, S. (2006, Diciembre 20). Mesenchymal stem cell mediated functional tooth regeneration in swine. *PLOS ONE*, 1, pp.1-9.
10. Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, pp.1457-1465.
11. Arévalo, J., Páez, D., & Rodríguez, V. (2007, Julio-Diciembre). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA - publicación científica en ciencias biomédicas*, 5, pp.177- 184.
12. Dominici, M., Blanc, K., Mueller I., Cortenbach, I., Marini, F., & Krause, D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. (2006). The Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, pp.315-317.

13. González, L., & Font, A., (2011, Marzo). Investigación con células madre de origen dentario. Actualización. *Gaceta dental*, 223, pp.118-129.

14. Chandki, R., Kala, M., Banthia, P., & Banthia, R. (2012). From Stem to Roots: Tissue engineering in Endodontics. *J Clin Exp Dent*, 4, pp.66-71.

15. Seo, B., Miura, M., Gronthos, S., Bartold P., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey P., Wang C., & Shi, S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, pp.149-155.

16. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L., Robey P., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, pp.5807-5812.

17. Friedlander, L., Cullinan M., & Love, R. (2009) Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *International Endodontic Journal*, 42, pp.955–962.

18. Kamata, N., Fujimoto, R., Tomonari, M., Taki, M., Nagayama, M., & Yasumoto, S. (2004) Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament Cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. *J Oral Pathol Med*, 33, pp.417-423.

19. Shteyer, A., Gazit, D., Binderman, I., & Bab, A. (1987). Hormone-responsive cells derived from Human Dental Papilla: characterization in vitro and in vivo in diffusion chambers. *In Vitro Cell Dev Biol*, 23, pp: 15-20.

20. Morsczeck, C., Gotz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kuhn, U., Mohl, C., Sippel, C., & Hoffmann, K. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 24, pp.155- 165.

21. Kemoun, P., Laurencin, S., Rue, J., Farges, J., Gennero, I., Conte-Auriol, F., Briand, F., Gadelorge, M., Arzate, H., Nara, A., Brunel, G., & Salles, J.(2007). Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*, 329, pp.283-294.

22. Yalvac, M., Ramazanoglu, M., Rizvanov, A., Sahin, F., Bayrak, F., Salli, U., Palotás, A., & Kose, G. (2009). Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *The Pharmacogenomics Journal*, pp,1–9.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

23. Yang, H., Gao, L., & An, Y. (2013). Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. *Biomaterial*, 34, pp.7033-7047.
24. Geetanjali, B., Rupesh, K., Gupta, N. (2010) Human gingival derived mesenchymal Stem Cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal Stem Cells for cell Therapy in regenerative medicine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393, pp.377-383.
25. Huang, A., Chen, Y., Lin, L., Shieh, T., & Chan, A. (2008). Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med*, 37, pp.571–574.
26. Broccaioli, E., Niada, S., Rasperini, G., Ferreira, L., Arrigoni, E., Yenagi, V., & Brini, A. (2013, Abril). Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad: In Vitro Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. *BioResearch Open Access*, 2, pp.b107-117.
27. Gómez de Ferrariz, M., & Campos, A. (1990). *Embriología dentaria (odontogenes)*. En *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental* (113-137). BHF: editorial médica panamericana.
28. Tziafas, D., & Kodonas, K. (2010) Differentiation Potential of Dental Papilla, Dental Pulp, and Apical Papilla Progenitor Cells. *JOE*, 36, pp.781-789.
29. Huang, G. T., Gronthos, S., & Shi S. (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 88, pp.792-806.
30. Sonoyama, W, Liu, Y., & Yamaza, T. (2008) Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*, 34, pp.166–71.
31. Bakopoulou, A., Leyhausen G., Volk J., Tsiftoglou A., Garefis P., Koidis P., & Geurtsen W. (2013). Comparative characterization of STRO-1^{neg}/ CD146^{pos} and STRO-1^{pos}/CD146^{pos} apical papilla stem cells enriched with cytometry. *Archives of oral biology*, 58, pp.1556–1568.
32. Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Tsiftoglou, A., Garefis, P., Koidis, P., & Geurtsen, W. (2011). Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of oral biology*, 56, pp.709–721.

Estudio in vitro de células mesenquimales obtenidas a partir de papila apical de terceros molares humanos.

33. Chen, K., Xiong, H., Huang, Y., & Liu, C. (2013). Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs) . *Archives of oral biology*, *58*, pp.997–1006.
34. Cotti, E., Mereu, Ma., & Lusso, D. (2008). Regenerative Treatment of an Immature, Traumatized Tooth With Apical Periodontitis: Report of a Case. *JOE*, *34*, pp.611-616.
35. Kenneth, M., Geisler, T., Henry, M., & Wang, Y. (2008), Regeneration Potential of the Young Permanent Tooth: What Does the Future Hold? *JOE*, *34*, pp.S51-S55.
36. Huang, G.T.J., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., & Shi, S. (2008). The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp=dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*, *34*, pp.645–65.
37. Schneider, R., Holland, R., Chiego, D., Hu, J., Nor, E. J., & Botero, T. (2014, Julio). White Mineral Trioxide Aggregate Induces Migration and Proliferation of Stem Cells from the Apical Papilla. *JOE*, *40*, pp.931-936.
38. Trevino, E., Patwardhan, A., Henry, M., Perry, G., Dybdal, N., Hargreaves, K., & Diogenes, A. (2011, Agosto). Effect of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla in a Platelet-rich Plasma Scaffold in Human Root Tips. *JOE*, *37*, pp.1109-1115.
39. Huang, G.T., Yamaza, T., & Shea L.D. (2010). Stem/progenitor cell–mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*, *16*, pp.605–615.
40. Abe, S., Hamada, K., Yamaguchi, S., Amagasa, T., & Miura, M. (2011). Characterization of the radioresponse of human apical papilla-derived cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *2*, pp.1-10.
41. Jiayuan, W., George, T. J., Huang, Wenxi, H., Wang, P., Zhongchun, T., Qian, J., Liping, D., Zhongying, N., & Longxing, N., (2012, Mayo). Basic Fibroblast Growth Factor Enhances Stemness of Human Stem Cells from the Apical Papilla. *J Endod*, *38*, pp.614–622.
42. Zou et al. (2013). Establishment of transgene-free induced pluripotent stem cells reprogrammed from human stem cells of apical papilla for neural differentiation. *Stem Cell Research & Therapy*, *3*.

43. Li, J., Yan, M., Wang, Z., Jing, S., Li, Y., Liu, G., Yu, J., & Fan, Z. (2014, Abril 23). Effects of canonical NF- κ B signaling pathway on the proliferation and Odonto/Osteogenic differentiation of human stem cells from apical papilla. *BioMed Research International*, 2014, pp. 1-12.
44. Sun, F., Wan, M., Xu, X., Gao, B., Zhou, Y., Sun, J., Cheng, L., Klein, O.D., Zhou, X. & Zheng, L. (2014). Crosstalk between miR-34a and Notch Signaling Promotes Differentiation in Apical Papilla Stem Cells (SCAPs). *Journal of Dental Research*, 93, pp.589-595.
45. Li, Y., Yan, M., Wang, Z., Zheng, Y., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yu, J. (2014, Noviembre 27). 17beta-estradiol promotes the odonto/osteogenic differentiation of stem cells from apical papilla via mitogen-activated protein kinase pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 5, pp.1-24.
46. Chang, H., Chang, M., Wu, I., Huang, G., Huang, W., Wang, Y., Lee, S., Yeb, C., Guo, M., Chan, C., Hsien, H., & Jeng, J.(2015, Agosto). Role of ALK5/Smad2/3 and MEK1/ERK Signaling in Transforming Growth Factor Beta 1-modulated Growth, Collagen Turnover, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla of Human Tooth. *JOE*, 41, pp.1272-1280.
47. Qu, B., Liu, O., Fang, X., Zhang, H., Wang, Y., Quan, H., Zhang, J., Zhou, J., Zuo, J., Tang, J., & Tang, Z. (2014). Distal-less homeobox 2 promotes the osteogenic differentiation potential of stem cells from apical papilla. *Cell Tissue Res*, 357, pp.133–143.
48. Gao, R., Dong, R., Du, J., Ma, P., Wang, S., & Fan, Z. (2013). Depletion of histone demethylase KDM2A inhibited cell proliferation of stem cells from apical papilla by de-repression of p15^{INK4B} and p27^{Kip1}. *Mol Cell Biochem*, 379, pp.115–122.
49. Hernández, B. M., Inostroza, V. C., Carrión, A. F., Chaparro, P.A., Quintero, H. A., & Sanz, R.A. (2011). Proliferation of mesenchymal stem cells from human gingival tissue on chitosan scaffold: an in vitro study. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 4, pp.59-63.
50. Hilkens, P., Fanton, Y., & Martens, W. (2014). Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Research*, 12, pp.778–790.
51. Mazia, D., Schatten, G. & Sale, W. (1975). Adhesion of Cells to surfaces coated with polylysine. *Journal of Cell Biology*, 66, pp. 198.200.

52. Stockert, J. C., Castro A., Cañete, M., Horobin, R. & Villanueva, A. (2012). MTT Assay for cell viability: Intracelular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114, pp. 785-796.
53. Borra, C.R., Lotufo, A. M., Gagiotti, M. S., Barros, M. F. & Andrade, M. P. (2009). A simple method to measure cell viability in Proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res*, 23, pp. 255-262.
54. Pineda, M. C., & Londoño, P. C. (2009) Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación Osteogénico. *Rev. Ingeniería Biomédica*, 3, pp.58-65.
55. Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and B-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 4, pp.1-7.
56. Shresha, S., Diogenes, A., & Kisben, A. (2015, Agosto). Temporal-controlled Dexamethasone Releasing Chitosan Nanoparticle System Enhances Odontogenic Differentiation of Stem Cell from Apical Papilla. *JOE*, 41, pp.1253-1258.
57. Park, B., Hab, Y., Choi, M., Ryu, Y., Lee, S., Kim, D., Kim, J., & Byun, J. (2009). In Vitro Osteogenic Differentiation of Culture Human Dental Papilla-Derived Cells. *J Oral Maxillofac Surg*, 67, pp.507-514.