



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular
y Medicina Traslacional



Estudio Comparativo de Viabilidad y Proliferación de Células Mesenquimales de Pulpa, Papila Apical y Folículo Dental

Arely Montserrat González González

Tesis que para obtener el título de Cirujano Dentista

Director de Tesis:
Mtra. Rosario Morales de la Luz

Asesores:

Dr. Raúl Rosales Ibáñez

Mtro. José T. Cano Brown

PAPIIT IN221325

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2016



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.



REPORTE DE INVESTIGACIÓN

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes o marco teórico.....	1
3. Planteamiento del problema.....	17
4. Justificación.....	18
5. Objetivos.....	19
6. Material y métodos.....	19
6.1. Tipo de estudio.....	19
6.2. Población de estudio.....	20
6.3. Selección y tamaño de muestra.....	20
6.4. Criterios de inclusión.....	20
6.5. Criterios de exclusión.....	20
6.6. Criterios de eliminación.....	20
6.7. Variables independientes.....	21
6.8. Variables dependientes.....	21
6.9. Definición operacional de variables y escala de medición.....	21
7. Metodología.....	22
8. Recursos materiales.....	34
9. Resultados.....	34
10. Discusión.....	43
11. Conclusiones.....	45
12. Bibliografía.....	46



1. Introducción

La medicina regenerativa es una área multidisciplinaria destinada a la recuperación morfológica y funcional de tejidos y órganos severamente lesionados (Valdespino-gómez, 2014). En 2007, Daar y Greenwood, señalaron que la medicina regenerativa tiene como objetivo "la reparación, sustitución o regeneración de células, tejidos u órganos para restaurar el deterioro de una función" (Bajada, Mazakova, Richardson, & Ashammakhi, 2008).

Dentro del área odontológica, se reparan los tejidos lesionados utilizando biomateriales, sin poder recuperar la integración ni la capacidad funcional de lo reparado, sin embargo, el uso de células troncales de tipo mesenquimal abre un nuevo camino para la medicina regenerativa en esta área.

Aunque este tipo de células se han logrado aislar de muchos otros tejidos adultos, como médula ósea y músculo esquelético, recientemente se ha logrado su aislamiento en tejidos bucales, lo cual brinda una fuente de mayor facilidad de acceso.

La importancia de estudiar a las células de tipo mesenquimal radica en que tienen la capacidad de diferenciarse en distintos linajes y mucho se ha aprendido en los últimos años sobre su localización, la metodología para su obtención, aislamiento, los medio de cultivo para expandirlas, su fisiología, su identificación en el laboratorio mediante inmunocaracterización y los mecanismos que regulan su diferenciación.

Todo esto ha generado que las investigaciones dirijan sus objetivos hacia el estudio de su potencial uso en la medicina y la ingeniería regenerativa tisular (Barry & Murphy, 2004) así como su aplicación en el tratamiento de diversas patologías de gran importancia y prevalencia.

2. Marco teórico

Antecedentes

Es principalmente en el área de las ciencias de la salud, donde en las últimas dos décadas se han logrado diversos avances biológicos y clínicos en la investigación de las llamadas "*Stem Cells*", (Dominici et al., 2006) término que aparece en la literatura científica desde 1868, en los trabajos del biólogo alemán Ernst Haeckel,



quién al ser partidario de la teoría de la evolución de Darwin, dibujo árboles filogenéticos para representar la evolución de los organismos por descendencia a partir de ancestros comunes. A estos árboles les llamo “*Stammbaüme*” (Del alemán; árboles de la familia o árboles troncales).

En este contexto, Haeckel usó el término “*Stammzelle*” (célula troncal) para describir al organismo unicelular ancestral, del cual se supone que todos los organismos multicelulares han evolucionado y que además, con la demostración de la existencia de células troncales hematopoyéticas, las estableció como prototípicas; capaces de proliferar casi indefinidamente, es decir, con capacidad de auto-renovarse y de dar lugar a células especializadas, lo que se conoce como diferenciación. (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007)

Al intentar traducir el término del inglés al español; donde “*cell*” significa célula y “*stem*” significa tronco, su traducción literal será “célula troncal”, aunque también se conocen como célula madre o célula progenitora. (René, Juárez, Cortés, & Meraz, 2007)

Las células troncales se identificaron por primera vez en el sistema hematopoyético, aunque el concepto se ha extendido a muchos otros tejidos donde se ha demostrado su presencia (Weissman, Irving L Anderson & Gage, 2001) como; epidermis, tracto gastro-intestinal, pulpa dental, retina, músculo esquelético, hígado, páncreas, cerebro, entre otros. (Mayorquín & Sahagún, 2011)

De átomo a célula troncal

Toda la materia está debidamente organizada y parte de un elemento que se asocia a otros, los cuales aumenta la complejidad de la estructura.

Si analizamos esta organización desde el punto de vista biológico, podemos describir los siguientes niveles:

Nivel atómico. Constituido por los átomos, principalmente carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo, los cuales forman la materia viva.

Nivel molecular. Al unirse dos o más átomos, se originan las moléculas, las cuales constituyen la materia, llamándose específicamente biomoléculas. Las biomoléculas pueden ser inorgánicas, como el agua, las sales minerales o los gases, u orgánicas, como los glúcidos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.



Nivel celular. Toda célula está formada por los niveles inferiores, el molecular y el atómico. La complejidad de este nivel es mucho mayor, ya que la célula es una unidad anatómica y funcional, lo cual significa que es la estructura más pequeña con la capacidad de sobrevivir por sí misma.

Nivel pluricelular. Si varias células se asocian pueden llegar a constituir un organismo completo. En este nivel se encuentran definidos los siguientes conceptos:

- Tejidos: Se forman por grupos de células que tienen el mismo aspecto y la misma función.
- Órganos: Constituidos por varios tejidos y realizan una función específica.
- Sistemas: Conjunto de órganos de estructura similar que cumplen funciones muy parecidas. Por ejemplo el sistema muscular.
- Aparatos: Conjunto de órganos que pueden tener estructuras diferentes pero coordinados para realizar una función determinada.

La renovación de las poblaciones celulares se debe a la existencia, en todos los tejidos y órganos, de una población de células que no están terminalmente diferenciadas, probablemente comprometidas a uno o más tipos de células, y que tienen todavía una capacidad proliferativa ilimitada, estas células son las células troncales. (Baker, 2008)

A partir de una célula, el cigoto, que se forma a través de la fecundación del óvulo por el espermatozoide, inicia el desarrollo embrionario durante el cual, además de la multiplicación en el número de células, se lleva a cabo la diferenciación, formando dos grandes poblaciones celulares: las células germinales (óvulo y espermatozoide) y las células somáticas que forman los órganos y tejidos.

Las células germinales dan lugar a un nuevo individuo; las células somáticas, que forman parte de dicho individuo, no formarán nuevos individuos en condiciones normales. La diferenciación celular es la llave del desarrollo de los organismos multicelulares, ya que da lugar a todas las células especializadas (diferenciadas) durante el desarrollo de un organismo, y de manera predominante durante el desarrollo embrionario.

El desarrollo comprende los procesos que llevan a un organismo a adquirir su tamaño, forma, característica fisiológica, patrones conductuales, etc. Y alcanzar la etapa adulta de su ciclo vital, el cual termina con la muerte.



Durante la etapa temprana embrionaria ocurren, predominantemente y en forma simultánea en un proceso continuo, las 3 fases principales del desarrollo: diferenciación celular, crecimiento y morfogénesis.

De estas 3 fases, la diferenciación celular es la base del crecimiento y la morfogénesis, y se puede definir como el conjunto de procesos que determinan que las células de un organismo, que tiene los mismos genes (genotipo), expresen fenotipos distintos (el fenotipo es la manifestación de las características morfológicas, fisiológicas, etc.; codificadas en los genes que se expresan en cada célula) para dar lugar a células especializadas.

Es decir, a partir de células totipotenciales (cigoto) y por mecanismos de regulación genética y de interacciones celulares se van restringiendo las potencialidades de desarrollo en las células del embrión para constituir las células especializadas, que han perdido capacidad pluripotencial, y formar los órganos y tejidos.

Una de las características de la diferenciación es la formación de células especializadas o restringidas en su capacidad de desarrollo, que va acompañada de una pérdida en su capacidad proliferativa, para adquirir una multiplicación limitada a un número reducido de células hijas comprometidas a un camino específico de diferenciación. Esto impone limitaciones al organismo y tiende a reducir su ciclo vida significativamente, ya que todas las células diferenciadas tienen como meta cumplir sus funciones especializadas y entrar a una muerte programada (apoptosis).

Entonces, las células troncales son la base para formar a estos tejidos, órganos, sistemas y aparatos, a través de la diferenciación celular, basados en la regulación de la expresión génica.

Morfológicamente, son células pequeñas (50-70 μm), se le conoce como fibroblastoides debido a que son alargadas y estrechas. En su interior puede localizarse un núcleo y nucléolo, al núcleo lo rodean partículas de cromatina que lo delimitan y diferencian. El cuerpo celular contiene compartimentos celulares; el aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y polirribosomas.

Sin embargo, las células troncales no poseen características morfológicas que las distinguen del resto de las células del tejido a las que pertenecen, su definición se basa en términos funcionales. (Mayani, 2009) En general, se define como una célula que tiene la capacidad de dividirse (auto renovación) indefinidamente, durante toda la vida de un individuo y que bajo las condiciones apropiadas puede dar origen (diferenciarse) a diferentes linajes con características y



funciones especializadas como lo son los miocitos, neuronas o hepatocitos. (Rodríguez, 2005)

Clasificación de las células troncales

Las células madre se pueden clasificar de tres formas:

A) Según su potencial y capacidad de diferenciación, (Smith, 2006):

Totipotentes: Del latín "*totus*" que significa completo, hace referencia al potencial de generar a todo un individuo, tanto tejidos embrionarios como extraembrionarios, son células capaces de diferenciarse en cualquier estirpe celular; es decir, originan los "tejidos propios" del embrión, como el ectodermo, endodermo y mesodermo (hojas blastodérmicas), y los "tejidos extraembrionarios": saco vitelino, alantoides, amnios y corion (membranas extrafetales). Estas células tienen su origen cuando el espermatozoide fertiliza el ovocito, formando la célula diploide que se conoce como cigoto. (René et al., 2007)

Pluripotentes: Proviene del latín *plures* que significa "muchos o varios", y tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de tejido humano, excepto en tejido extraembrionario. Estas células pueden dar origen a precursores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo.

Para incluirse dentro de esta categoría, la célula debe ser capaz de diferenciarse a progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria; demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células en las que se ha diferenciado; y, finalmente, que se produzca un establecimiento claro y persistente de éstas en el tejido blanco, tanto en presencia como en ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta. (Niño & Carlos, 2005; Valero-palencia et al., 2011a)

Multipotentes: Del latín *multus*, "muchos". Estas células se encuentran en la cima de la jerarquía celular y proliferan para producir células diferenciadas que forman algún tejido *in vivo*. Pueden dar origen a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencialidad a tejidos derivados de una misma capa embrionaria; es decir, derivados del ectodermo, mesodermo o endodermo.



Una vez desarrolladas, estas células se renuevan durante toda la vida del individuo y pueden dividirse repetidamente para repoblar un tejido, a diferencia de las células troncales totipotenciales y pluripotenciales, las cuales solo están presentes en la etapa embrionaria. (Aguilera, 2015)

Oligopotentes: Del griego *oligo* y significa "poco". Son células con la capacidad de diferenciarse en un subconjunto de tipos celulares más reducido que el grupo anterior. Estas células son capaces de formar dos o más linajes dentro de un tejido, como una célula madre neural, que puede crear un subconjunto de neuronas y las células unipotentes que forman un único linaje, como las espermatogonias. (Matos Rojas, Bertholdo, & Castillo, 2012)

Unipotentes: Del latín *unus* que significa "uno", son las células troncales específicas de un tejido, lo que significa que corresponden a las células que se diferencian a lo largo de una sola línea celular, debido a que sufren una restricción en la expresión de su genoma; en comparación con las pluripotenciales, tienen mayor grado de diferenciación y producen tipos celulares característicos del tejido en el cual se observan *in vivo*.

Se les nombra progenitoras, según el tipo de órgano o tejido al que dieron origen, o en el que se encuentran *in vivo*, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas de linajes específicos (eritrocitos, linfocitos, monocitos, etc.), células progenitoras nerviosas, células progenitoras de la córnea y células columnares indiferenciadas del intestino. (René et al., 2007)

B) Según el tejido de origen, en embrionarias o adultas, (Mata-miranda, Vázquez-zapién, & Sánchez-monroy, 2013):

Células embrionarias: Son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna del blastocisto y se pueden replicar continuamente en un estado indiferenciado. Se diferencian hacia todos los linajes de células *in vivo* y a muchos tipos de células *in vitro*. (Jiang et al., 2002)

Células somáticas: también llamadas adultas, postnatales o mesenquimales (Perdomo, n.d.): son células que corresponden a progenitores multipotenciales, pueden renovarse constantemente y dar lugar a células especializadas capaces de reparar lesiones tisulares y de renovar células seniles.

Así mismo presentan una gran versatilidad biológica, fundamentada en su capacidad de alterar drásticamente el fenotipo en respuesta a los cambios del microambiente en donde se desarrollan. (Acevedo Toro & Cortés Márquez, 2008).



Clásicamente se ha definido como una célula especializada dentro de la organización de las células de un tejido específico de un organismo ya desarrollado, con capacidad de diferenciación restringida, es decir, de generar únicamente células del tejido que representa, a las que debe reemplazar de forma natural. (Jiang et al., 2002)

C) Según su capacidad de re-población tisular *in vivo*, (Rodríguez, 2005; Valero-palencia et al., 2011b):

Las células madres se clasifican según el tiempo que les toma restaurar un tejido lesionado en: células con un corto periodo de regeneración, con un periodo de regeneración a mediano plazo o con un largo plazo de regeneración.

Los tejidos del cuerpo van sufriendo un desgaste natural a lo largo de la vida y para mantener un adecuado funcionamiento el organismo posee una capacidad de renovación y en algunos tejidos es continua, como en el caso de células sanguíneas, las células germinales, la epidermis y los epitelios que revisten los órganos como el tubo digestivo o el riñón. En estos tejidos hay dos tipos de células: unas células diferenciadas que viven generalmente unos días; y unas células madres que generan en cada ciclo celular una célula especializada para reemplazar la célula muerta, y otra célula que permanece indiferenciada para conservar la fuente de células madre.

Sin embargo, en el organismo también hay tejidos formados por células "permanentes", tejidos en los que en un momento determinado podríamos considerar que su pérdida es irremplazable, como es el caso del sistema nervioso, corazón o tiroides. Se trata de células bien diferenciadas, muy especializadas, generalmente incapaces de dividirse y, en ningún caso, capaces de formar otro tipo celular diferente.

Estos tejidos constituidos por células permanentes, al ser dañados puede inducir su regeneración a partir de células troncales quiescentes; es decir, células madres que se encuentran ocultas o arrestadas y que pueden activarse ante determinados estímulos para dividirse y dar lugar a células hijas que se diferencian reemplazando así las células perdidas por la lesión. Ejemplo de esto es el músculo esquelético, cuyas células, aunque no se dividen, se pueden regenerar a partir de mioblastos.

Aunque no todos los tejidos son capaces de regenerarse ante una lesión; la destrucción de tejido muscular cardíaco durante los infartos de miocardio o de



tejido nervioso en los infartos cerebrales, o degeneración progresiva de ambos tejidos durante en enfermedades degenerativas o simplemente con el envejecimiento, no son procesos reparables por los mecanismos naturales de renovación. (Valero-palencia et al., 2011a)

Células troncales

Las propiedades de las células troncales humanas, tanto de origen embrionario (totipotentes), como de tejidos adultos (multipotentes) representan uno de los más espectaculares logros de las ciencias biológicas

Sin embargo, las células de origen embrionario presentan una serie de controversias y su utilización con propósitos terapéuticos tiene implicaciones técnicas y sobre todo éticas, debido a que su uso involucra el formar y destruir embriones humanos a voluntad. Quienes se oponen a la investigación de células madre no quieren que los fetos y los óvulos fertilizados sean utilizados con fines de investigación, argumentan que un óvulo fertilizado es fundamentalmente un ser humano con derechos e intereses que necesitan ser protegidos. (Whittaker, 2005)

Por lo anterior, la utilización de las células troncales mesenquimales ha tomado gran importancia, ya que no presentan retos éticos y muchas veces se obtienen de tejidos de desechos. (Valencia, Espinosa, & Nario, 2013)

Células troncales mesenquimales

Son importantes para la homeostasis del organismo adulto, donde los órganos pueden poseer un mecanismo para reemplazar a las células cuando éstas mueran, ya sea por desgaste, apoptosis o daño. (Fuchs, Tumber, & Guasch, 2004)

Los diversos tejidos en el adulto son reemplazados a lo largo de la vida por estas poblaciones de células troncales, específicas para un linaje en particular, con la única propiedad de que pueden dividirse simétrica o asimétricamente, para producir una célula troncal idéntica y una célula progenitora parcialmente comprometida; esta última, aún cuando no esté totalmente diferenciada, tendrá una capacidad restringida de desarrollo, por lo cual, se conoce como "tejido específicas", pues son capaces de originar sólo células progenitoras correspondientes a su tejido de origen. (Hernández Ramírez, n.d.)

Para cumplir la demanda del tejido en regeneración, el número de células troncales y el proceso de diferenciación de éstas, deben ser cuidadosamente



regulados; por lo tanto, se han desarrollado señales de retroalimentaciones complejas para mantener una reserva apropiada de células precursoras indiferenciadas y de progenies diferenciadas.

Así, una célula troncal puede permanecer inactiva y no entrar al ciclo celular, esto puede ser importante para retener una reserva de células que pueden ser usadas en tiempos de estrés.

En algunos tejidos, como el cerebro, puede que una célula troncal sufra apoptosis y no contribuya a un futuro desarrollo; donde la división de las células diferenciadas (neuronas y células de la glía) es muy escasa. De manera general, un balance dinámico entre señales de proliferación, sobrevivencia y diferenciación, asegura que se mantenga un equilibrio apropiado de células troncales y células diferenciadas a lo largo de la vida adulta del individuo. (René et al., 2007)

Estas células progenitoras mesenquimales son un grupo de células madres adultas que fueron caracterizadas por primera vez por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las cultivó en monocapa, él las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide y como unidades formadoras de colonias (CFU-Fs), capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como lo son los osteocitos, condrocitos y adipocitos. (Escobar-Gómez, Jódar, & Hawkins, 2009; Uccelli, Moretta, & Pistoia, 2008)

A este tipo de células se les han establecido diversos nombres; Células de Estroma Medular, Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides, Precusores Estromales ó Células Adultas Progenitoras Multipotentes o MAPCs (Multi-Potent Adult Progenitor Cells). (A. Arévalo, M. Páez, D, 2007)

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. (A. Arévalo, M. Páez, D, 2007)

1. Deben ser adherentes al plástico cuando se mantiene en los contenedores adecuados y bajo condiciones de cultivo estándar.
2. El 95% de la población de células troncales mesenquimales, deben expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105, los cuales se miden por citometría de flujo y deben carecer en un 2% de la expresión de antígenos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II.



3. Son capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos, en respuesta a estímulos específicos condiciones estándar de cultivo. (A. Arévalo, M. Páez, D, 2007; Dominici et al., 2006; Taran et al., 2014)

Fuentes de obtención

Las fuentes de obtención de estas células son muchos tejidos especializados del cuerpo, incluyendo cerebro, médula ósea hígado, piel, tracto gastrointestinal, retina y córnea, inclusive en tejidos de la cavidad oral, como la pulpa y ligamento periodontal. (Shi S, 2005). Dichas células troncales tejido-específicas varían en el grado de potencialidad, a pesar de que aún faltan por identificar, para la mayoría de los tejidos, los posibles marcadores retenidos exclusivamente por poblaciones particulares de células troncales en el adulto; como la falta, en algunos casos, de estudios de marcadores genético que impliquen el funcionamiento de las células troncales en el mantenimiento de estos tejidos.

Su importancia en odontología comenzó debido principalmente a Gronthos, autor que en el año 2000, aisló por primera vez células troncales mesenquimales de origen dental, provenientes de la pulpa, logrando hacer analogía con el hueso y células troncales mesenquimales de médula ósea, encontrando colonias clonogénicas multipotentes con la misma capacidad de autorenovación y diferenciación. (Luis González, 2011)

Recientemente, se han identificado como fuentes accesibles de células mesenquimales a diversos tejidos bucales. (G T-J Huang, Gronthos, & Shi, 2009). (Morsczeck C, 2008)

Células mesenquimales de tejidos bucales

Los tejidos bucales de los que se han aislado células mesenquimales son los siguientes:

1. Pulpa dental. Aisladas por Gronthos en el año 2000. Por analogía con las células madre de la médula, se consideró que había una comunidad de células multipotenciales en el tejido pulpar de dientes maduros. (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000)

Las células troncales que se encuentran en el tejido pulpa van de 1 por cada 100 de todas las células, cifra que disminuye conforme aumenta la edad del sujeto. Sin embargo, son de fácil acceso y pequeña



morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular para tejido óseo. (Graziano, d'Aquino, Laino, & Papaccio, 2008)

2. Dientes temporales exfoliados. Contienen una población de células multipotenciales diferentes a las aisladas de pulpa dental de dientes permanentes, ya que a diferencia de estas, no pueden generar el complejo dentino-pulpar. Fueron Aisladas exitosamente por Hyun Nam, Gene Lee en el 2009. Estas células presentaron potencial odontogénico y expresaron marcadores epiteliales.(Nam & Lee, 2009) y son consideradas con mayor plasticidad por ser un tejido más inmaduro, aunque presentan una clara desventaja al solo poder obtenerse de dientes temporales con raíces completas, lo cual dificulta su aislamiento.
3. Ligamento periodontal. Tejido conectivo que rodea a las piezas dentarias, que se somete a una adaptación continua para mantener la integridad estructural de los tejidos. Presentan propiedades muy similares a las células derivadas de médula ósea ya que poseen plasticidad (capacidad de diferenciación) para osteoblastos, adipocitos, condrocitos y neurocitos. Son una población única de células troncales. (Maeda, Wada, & Fujii, 2011) y fueron aisladas por Seo en el 2004.(Seo et al., 2004)
4. Papila dental. Tejido blando situado en los ápices de los dientes permanentes en formación. Entre la papila apical y la pulpa dental, existe una zona abundante en células mesenquimales. Y aunque el interés por su estudio data desde 1987 (A. Shteyer, D. Gazit, L Binderman, 1987), su caracterización *in vitro* fue realizada por Sonoyama en el 2006. (Sonoyama et al., 2006), aunque es uno de los tejidos bucales, junto con folículo dental, en los que menos se han realizado estudios experimentales. (Werkstoffkunde, 2007)
5. Folículo dental. Es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen dentario en formación. El folículo dental se diferenciará en el ligamento periodontal y es precursor osteoblastos y los cementoblastos, además, muestran capacidad para diferenciarse en adipocitos y neuronas. (Yao, Pan, Prpic, & Wise, 2008) Fue aislado por primera vez de terceros molares superiores en 2005. (C. Morsczeck, 2005)



Embriología e Histología de Pulpa, Papila Apical y Folículo Dental

La odontogénesis se inicia en la sexta semana de vida intrauterina y se puede estudiar en dos fases:

1. Morfogénesis o morfodiferenciación: Constituirá el patrón para formar la corona del diente y luego la formación del patrón que constituirá la raíz dentaria.
2. Histogénesis o citodiferenciación: Formación de los tejidos dentarios. El esmalte, la dentina y la pulpa a partir de los patrones de la corona y la raíz dentaria.

La formación del patrón coronario también se puede dividir en etapas, las cuales que son:

1. Estadio de brote o yema: Producto de la proliferación de las células de la lámina dentaria el germen dentario está constituido por células periféricas cuboides y células centrales o internas poligonales.

2. Estadio de Casquete: En la novena semana del desarrollo embrionario el brote crece en sus caras laterales formando una nueva estructura denominada casquete, en este estadio el germen dentario está constituido por:

- Órgano del esmalte: De origen ectodérmico, dará origen al esmalte dentario, conformado por epitelio dental externo, epitelio dental interno y retículo estrellado.

- Esbozo de la Papila dentaria: De origen ectomesenquimático, se ubica por debajo del órgano del Esmalte y dará origen al complejo dentinopulpar.

- Esbozo de Saco o Folículo Dentario. De origen ectomesenquimático que rodea a todo el germen dentario, dará origen a los tejidos de soporte del diente (Periodonto).

3. Estadio de Campana Inicial: Esta etapa se inicia alrededor de las 14 a 18 semanas de vida intrauterina y en ella se muestran cambios importantes en la estructura del germen dentario, tales como la conformación de la morfología coronaria, aparición de nuevas capas, aparición del brote del germen dentario del diente permanente e inician los cambios que se corresponden con el inicio de la citodiferenciación. En este estadio se observan las siguientes estructuras en el germen dentario:

- Órgano del esmalte: Epitelio dental externo, Retículo estrellado, Estrato intermedio, Epitelio dental interno, Asas cervicales y Membrana basal.

- Papila dentaria



- Saco o Folículo dentario: Capa celulovascular y Capa fibrilar.

4. Estadio de Campana Avanzada: Es la última etapa en el proceso de morfodiferenciación coronario y es donde logra evidenciarse el proceso de citodiferenciación (diferenciación de odontoblastos y ameloblastos), por consecuente el inicio de formación de los tejidos duros del diente.

Después de esta cuarta etapa, el germen dentario queda constituido de la siguiente forma:

- El órgano del esmalte se reduce a nivel de los bordes incisales o en el caso de los dientes posteriores, en las zonas donde estarán las futuras cúspides, convirtiéndose en una estructura parecida a un epitelio, de allí a que su nombre cambie a Epitelio Reducido del Órgano del Esmalte.
- A nivel del tercio medio del germen dentario se mantiene el Retículo Estrellado y el Epitelio Dental Externo.
- A nivel de la unión entre el Epitelio Dental Interno y el Epitelio Dental Externo se inicia la formación del modelo radicular, por lo que la estructura anteriormente llamada en el estadio anterior Asa Cervical, se convierte en Vaina Radicular de Hertwig. (Ferraris, 2009)

Perspectivas de las medicina regenerativa con células troncales de tejidos bucales

En la ingeniería tisular convencional, la aplicación de las células troncales *in vitro*, es bajo la influencia de un estímulo que conduce a la regeneración de tejidos, aunque una aplicación mucho más innovadora, es la implantación de estas células *in vivo*, para lo que hace falta más información y estudios.

Actualmente, la aplicación clínica de estas células, propiamente en la odontología, se ve obstaculizada por diversas causas; por ejemplo, al querer regenerar un diente se presentan problemáticas como la de los tiempos de erupción dental, la morfología específica, el color del diente generado, y la hasta ahora imposible regeneración del esmalte dental humano. (Werkstoffkunde, 2007)

Ahora bien, en perspectiva, la visión de las restauraciones dentales naturales generados a partir de células madre, o la regeneración autólogas basadas en células madre de los tejidos es lo que hace interesante investigación con células madre para la odontología. Por ejemplo en periodoncia, el tejido sería construido



en el laboratorio mediante el cultivo de células mesenquimales provenientes del ligamento periodontal e implantado quirúrgicamente. Se podrán restaurar defectos mandibulares de de células procedentes de terceros molares extraídos previamente, con ayuda de andamios y de la misma forma tratar trastornos temporomandibulares y labio y paladar hendido. (D. Jucht, R. Rujano, M. Romero, 2014)

Los estudios confirman que a partir de estudios en animales de experimentación y en humanos, las células mesenquimales de tejidos orales podrán ser aplicadas en muchas aéreas, aunque estas investigaciones no van solo orientadas a la regeneración de los propios tejidos bucales, gracias a que las células mesenquimales de estos tejidos, yacen bajo en concepto de tener la capacidad de diferenciarse a cualquier estirpe celular, presentando la potencialidad de reemplazar a todas las células de cada tejido y órganos como el corazón, páncreas y sistema nervioso, que históricamente se han considerado incapaces de regenerarse. (Kirschstein, 2001; Rosenthal, 2003; Soler, Gigoux, Tagle, & Bernhardt, 2007)

Ciclo Celular *In vitro*

Para comprender su funcionamiento es necesario saber cómo viven y mueren en su hábitat natural, sin embargo, las células son tan pequeñas y complejas que esto solo se puede lograr mediante un cultivo celular, es decir, el proceso mediante el cual se logra que células obtenidas de algún organismo, se reproduzcan bajo condiciones controladas y se puedan estudiar con ayuda microscopios.

El ciclo celular, ya sea *In vivo* o *in vitro*, es la base para la reproducción de los organismos, ya que su función no es solamente originar nuevas células, sino asegurar que el proceso se realice en forma correcta y con la regulación adecuada. (Alberts Bruce, 2011)

En las células mesenquimales, las células originadas son genética, estructural y funcionalmente idénticas, tanto a la célula materna como entre sí, a menos que hayan sufrido mutaciones. Las células nuevas heredan un duplicado exacto de la información "hereditaria" (genética) de la célula "materna" (madre). Para que esto se lleve a cabo es necesario que la célula coordine un conjunto complejo de procesos citoplasmáticos y nucleares. (Cooper, 1999)

Cuando se inició la técnica de mantenimiento celular *in vitro*, para así facilitar los estudios experimentales, se creía que cualquier población celular de mamíferos



podía crecer indefinidamente si se proporcionaban las condiciones apropiadas al medio de cultivo. Sin embargo, las células tienen una capacidad de proliferación limitada (excepto las germinales y tumorales).

En 1961 Hayflick y Moorhead hicieron la primera aportación en el campo de la investigación del envejecimiento *in vitro*. Estos autores obtenían fibroblastos humanos fetales procedentes de biopsias de pulmón y los cultivaban. Definieron las etapas por las cuales pasaban los cultivos celulares, fases que en la actualidad se han extendido a todos los tipos celulares *in vitro*. (L. Hayflick, 1961)

Fase I. Es el momento de establecimiento del cultivo celular primario. Se experimenta durante las primeras horas de que son sembradas, donde se encuentran en pequeñas agrupaciones y van presentando cambios en su morfología asociados a la adherencia a la superficie.

Fase II. Es el periodo más largo y comprende el crecimiento multiplicativo por mitosis de las células (crecimiento exponencial).

Fase III. Cuando las células cubren la superficie de cultivo, el contacto de unas con otras, hace que disminuya el número de divisiones, fase estacionaria o de senescencia por agotamiento y las células ya no se dividen.

Fase IV. Si las células no son recolectadas, comienza la fase denominada "de muerte celular"; durante esta etapa las células comienzan a desprenderse de la superficie, dejando huecos en la monocapa, hasta que esta se destruye completamente

En el caso de los fibroblastos fetales en cultivo crecen a un ritmo constante de divisiones mitóticas (Fase II), pero con el tiempo se reduce el ritmo de divisiones y cesa completamente tras un rango de 45-55 divisiones (Fase III).

Esto se traduce a que existe un número finito de duplicaciones que puede sufrir una célula eucariota antes de entrar en senescencia, concepto conocido como el "límite de Hayflick". (López-Díazguerrero, Martínez, & Königsberg, 2005). Esta evidencia empírica, se puede basar en que los telómeros se harán ligeramente más corto con cada nueva división celular hasta que acortan a una longitud crítica.

3. Planteamiento del problema

El número limitado de tejidos y órganos disponibles para trasplantes incrementa la necesidad de buscar regenerarlos, lo cual evoca el interés por la ingeniería tisular, donde la terapia de regeneración de tejidos es un tema que se ha abordado en los últimos años.



La ingeniería tisular combina andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. Dentro del punto que abarca a las células, actualmente se siguen encontrando fuentes de obtención, sin embargo, las células troncales hematopoyéticas quizá sigan siendo la base biológica para pacientes que padecen de patologías como leucemias y aplasias medulares, la obtención de donantes compatibles con el receptor y los costos que implican estos procedimientos han creado la necesidad de buscar fuentes alternas para la obtención de éste tipo de células.

Ya que se tiene a los tejidos bucales identificados como fuentes de fácil acceso con alta plasticidad a tejidos especializados, donde la pulpa dental ha sido el tejido más estudiado, aunque se trata de buscar la fuente de obtención con mayor índice de proliferación y viabilidad, para que en determinado momento se pueda llegar a estudios *in vivo* con el tejido bucal ideal para la medicina regenerativa de acuerdo a los dificultades y a las patologías que se desean abordar.

Pregunta de Investigación

¿Las células madre de pulpa dental, tendrán un índice de proliferación mayor que papila apical y folículo dental?

4. Justificación

Los tejidos bucales representan una fuente de células mesenquimales de fácil acceso. Se han estudiado sobre todo las células que provienen de terceros molares y dientes supernumerarios, lo que plantea que se pueden obtener bajo condiciones que lejos de representar un daño colateral al paciente, están siendo indicadas como medidas para la propia salud del individuo, como lo son las extracciones indicadas para tratamientos de ortodoncia.

Dentro de esta gran e inigualable ventaja, las características que estas células presentan, son óptimas gracias a su proliferación *in vitro* y a su conocida plasticidad hacia distintos tejidos especializados. Por lo que es importante tener una estandarización las técnicas de obtención y cultivo, así como, ir estudiando sus índices de viabilidad y proliferación para los futuros trabajos de investigación, ya sean *in vitro* o *in vivo*.



5. Objetivos

General

- Evaluar el inmunofenotipo, la viabilidad y proliferación de las células de Pulpa Dental, Papila Apical y Folículo Dental.

Específicos

- Aislar y cultivar células de Pulpa Dental, Papila Apical y Folículo Dental.
- Definir o caracterizar el inmunofenotipo de las células Pulpa Dental, Papila Apical y Folículo Dental.
- Determinar la viabilidad de las células de Pulpa Dental, Papila Apical y Folículo Dental mediante la prueba *LIVE/DEAD*.
- Establecer la viabilidad de las células de Pulpa Dental, Papila Apical y Folículo Dental por medio de la prueba Alamar Blue.
- Definir la proliferación de las células de Pulpa Dental, Papila Apical y Folículo Dental, utilizando la prueba MTT.
- Examinar el nivel de apoptosis de las células a través de la prueba de TUNEL, por técnica visual y de absorbancia.
- Comparar los promedios de viabilidad y proliferación de las células de Pulpa Dental, Papila Apical y Folículo Dental

6. Material y métodos

6.1. Tipo de estudio

- Descriptivo
- Longitudinal(De tendencia)
- Comparativo



6.2. Población de estudio

En la realización de este estudio se emplearon tres tipos de tejido bucal; Pulpa dental, Papila Apical y Folículo Dental obtenidos de pacientes que acudieron a consulta en la clínica odontológica de Cuauhtepc, que requirieron de remoción de terceros molares por distintos diagnósticos dentales.

6.3. Selección y tamaño de muestra

La selección de los paciente que donen piezas dentales que contienen las muestras de los tejidos bucales que pueden ser utilizados para este estudio, serán principalmente de la clínica Cuauhtepc, una de las ocho clínicas dentales periféricas que son coordinadas directamente por la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, misma que pertenece a la Universidad Autónoma de México.

Para poder las muestras necesarias, el paciente será valorado previamente para lo que deberá llenar historia clínica, consentimiento informado de donación, leer y firmar un aviso de privacidad. (Anexos)

6.4. Criterios de inclusión

- Órganos dentarios, sin lesiones cariosas, de pacientes del sexo masculino y femenino, de entre 16 y 20 años de edad de sujetos sanos.

6.5. Criterios de exclusión

- Órganos dentarios de paciente menores de 16 años y mayores de 20 años.
- Órganos dentarios de paciente que padezcan enfermedades sistémicas y/o infecciosas.
- Órganos dentarios que tengan lesiones cariosas.

6.6. Criterios de eliminación

Las muestras que durante el procedimiento quirúrgico no sean depositadas inmediatamente en medio de transporte proporcionado por el laboratorio, deberán ser eliminadas para disminuir al mínimo el riesgo de contaminación en el cultivo celular.



6.7. Variables independientes

En este estudio se valoró el comportamiento de células procedentes de pulpa dental, papila apical y folículo dental obtenidas de terceros molares.

6.8. Variables dependientes

En el estudio se evaluó la proliferación celular, la viabilidad celular y la apoptosis de tres diferentes tejidos bucales, (Pulpa, papila apical y folículo dental).

6.9. Definición operacional de variables y escala de medición

Proliferación celular: variable cuantitativa que se determinó mediante la prueba MTT y valoró la cantidad de células que crecieron *in vitro*. Se reporta en unidades de densidad óptica.

Viabilidad celular: variable cuantitativa que se determinó mediante la prueba Alamar Blue y valoró la viabilidad celular *in vitro*. Se reporta en unidades de densidad óptica.

Viabilidad celular: variable cualitativa que se determinó mediante la prueba LIVE/DEAD y valoró la viabilidad celular *in vitro*. Se reporta en nivel de fluorescencia.

Apoptosis: variable cuantitativa que se determinó mediante la prueba de TUNEL por la técnica de absorbancia y valoró el nivel de apoptosis *in vitro*. Se reporta en unidades de densidad óptica.

Apoptosis: variable cualitativa y cuantitativa que se determinó mediante la prueba de Tunel por técnica visual y de absorbancia, para valorar el nivel de apoptosis *in vitro*. Se reporta por nivel de fluorescencia y en unidades de densidad óptica.



7. Metodología

Obtención de muestras de tejidos bucales

1. El paciente fue valorado como donador a través de una Historia Clínica, donde cumplió con todos los criterios de inclusión, ya antes mencionados, para él estudio experimental.
2. El laboratorio otorgó a los asistentes del acto quirúrgico, tubos de 15 ml con solución de transporte*, dentro de una hielera.
3. Para el acondicionamiento del paciente antes de obtener las muestras, se debe solicitó al paciente la realización de su cepillado normal y un enjuague de un minuto con Clorhexidina al 0.12%.
4. El profesional a cargo realizó el procedimiento quirúrgico indicado.
5. En el momento de la extracción propiamente dicha, las muestras fueron colocadas inmediatamente en los tubos con solución de transporte.
6. El tubo se identificó perfectamente con los datos del paciente y se colocó en el interior de la hielera, donde permaneció a aproximadamente 4°C, durante dos horas y hasta su llegada al laboratorio.

*Los tubos de punta de 15 ml, otorgados por el laboratorio contienen medio de transporte; agua inyectable (Cloruro de sodio al 0.9%, Baxtr) con medio antibiótico-antimicótico (estreptomina, penicilina y anfotericina B, Sigma-Aldrich) al 10%, para su preservación profiláctica.

Generación de cultivos primarios

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído, recibe el nombre de Cultivo Primario, el cual puede generarse a través de dos técnicas:

Técnica por digestión enzimática

Preparación de la solución enzimática:

2 mg de Colagenasa (Colagenase from clostridium histolyticum, Sigma-Aldrich) y 1 mg de Dispasa (Dispase II, Sigma-Aldrich), por mililitro de PBS (Dulbecco's phosphate Buffered Saline, Biowest).

1. Las muestras estuvieron contenidas en tubos de 15 ml de punta cónica hasta que se llevaron bajo campana de flujo laminar.
2. Para separar los tejidos de interés, las muestras se colocaron en cajas petri separadas, donde se identificaron los tejidos de interés y fueron disgregados mecánicamente con hoja de bisturí #15 y con ayuda de una cucharilla de 2 mm de diámetro o pinzas de curación.
3. Los tejidos disgregados se sumergieron en 100 μ l de solución enzimática, previamente preparada y contenida en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se incubó durante dos horas a 37°C.
4. Se desactivó la enzima agregando medio de cultivo, el cual contiene medio D-MEM (*Low-Glucose*, Biowest), adicionado con Suero Bovino Fetal (Biowest) al 10% y solución abiótica-antimicótica al 1%.
5. Esta solución fue centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
6. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* (sedimento que contiene las células) en un mililitro de medio de cultivo.
7. Se cultivó con micropipetas en caja de cultivo "T" o tipo Falcon de 25 cm² agregando 5 ml de medio de cultivo y se incubó en ambiente húmedo al 95%, CO₂ al 5%, a una temperatura de 37°C.
8. El medio fue cambiado cada 3 días, hasta alcanzar una confluencia del 80%.



Técnica por Explante

1. Las muestras fueron llevadas a campana de flujo laminar y se identificaron los tejidos de interés (Pulpa, Papila y Folículo dental) y se colocaron en cajas petri separadas, donde los tejidos fueron disgregados con hoja de bisturí #15 sobre cajas petri y con ayuda de una cucharilla de 2 mm de diámetro o pinzas de curación.
2. Los trozos de tejido miden un aproximado de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ y se denominan Explantes, los cuales se colocaron en caja de cultivo "T" o tipo Falcon, de forma equidistante y con un espacio de separación de 5 mm entre cada uno.
3. Se agregaron 5 ml de medio de cultivo y se dejó en incubación en ambiente húmedo al 95%, CO_2 al 5% y a una temperatura de 37°C .
4. El medio fue cambiado cada 3 días, hasta alcanzar una confluencia del 80%.

Generación de pases celulares

Para realizar las pruebas necesarias en esta investigación, se requiere de un número de células considerable, lo cual se logrará mediante pases celulares, realizados entre el día 15 y 21 de la generación del cultivo primario.

Punto en el cual las células se observan extendidas sobre toda la superficie de la caja y si no son recolectadas, en un momento determinado, al llegar a una confluencia máxima dentro de la caja de cultivo, la proliferación de las células se inhibirá por contacto y entrarán en apoptosis.

Cosecha y siembra de células

Las células ya formaron una monocapa (Tabla 1) y se deben generar pases bajo campana de flujo laminar:

1. Se retira el medio de cultivo, se lavó con 2 ml de PBS durante 2 minutos, tres veces y se agregaron 5 ml de Tryple Express (TrypLE™ Express Enzyme (1X), *no phenol red*), dejándolas incubar durante 4 minutos a 37°C .



2. Una vez separadas las células del plástico, se desactivó la acción de la enzima que compone al Tryple Express, colocando 2 ml de medio de cultivo.
3. Se obtuvieron las células de la caja de cultivo y fueron llevadas a un tubo de 15 ml para centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente.
4. Para la obtención del *pellet*, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo.
5. Se sembró en caja tipo Falcon ahora de 75cm², se incubaron durante 10 minutos a 37°C y posteriormente se agregaron 15 ml de medio de cultivo,
6. El cultivo se mantuvo en incubación, con humedad al 95%, CO₂ al 5% y a 37°C.

Los cultivos se observan periódicamente por medio de microscopio óptico invertido y se cambio el medio de cultivo cada 3 días, hasta alcanzar una confluencia de al menos el 80% y para generar el segundo pase, se realizó el mismo procedimiento, ahora en caja de 175 cm² y se cubriendo las células con 25 ml de medio de cultivo.

Sembrado para pruebas de viabilidad y proliferación

Cuando las células estuvieron contenidas en una caja tipo Falcon de 175 cm² confluyente; se realizó la siembra de aproximadamente 5000 células para cada prueba, de acuerdo a la siguiente tabla:

Ensayo	Placa de pocillos para sembrado
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	96
AB (<i>Alamar Blue</i>)	96
LIVE/DEAD	12
TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>)	12

El conteo se realiza bajo el microscopio óptico invertido utilizando azul tripán y cámara de Neubauer.

Para realizar el conteo celular se deben cosechar las células de la caja de cultivo:

1. Se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se agregaron 5 ml de Tryple Express dejándolas incubar durante 4 minutos a 37°C.
2. Se desactivó la acción del Tryple Express, colocando 5 ml de medio de cultivo y se recolectaron los 10 ml con ayuda de una pipeta, para ser llevadas a un tubo de 15 ml y centrifugarlas durante 10 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente.
3. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de medio de cultivo.
4. Se tomaron 10 μ l de azul tripan, 10 μ l de la solución celular y se colocaron en un tubo cónico eppendorf de 1.5 ml para resuspenderlos.
5. De esta solución celular y azul tripan de 20 μ l se tomaron 10 μ l para colocarlos en la cámara de Neubauer.
6. Para su visualización se situaron bajo el microscopio, a un aumento 20x para contar las células dentro de los límites de los cuadrados delimitados con el número 1. (Fig. 1)

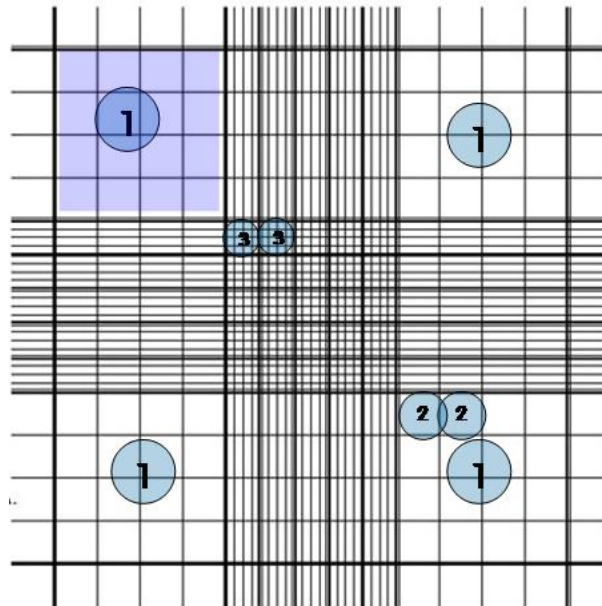


Fig. 1 Recuadros de cámara de Neubauer.

Fuente: www.celoromics.com (2015)



Las células se contabilizaron con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular en 1 ml} = \frac{\text{Total de células contadas} \times 10\,000}{\text{Número de cuadros}}$$

7. Se determinó la cantidad de microlitros que deben sembrarse por pocillo con la siguiente fórmula:

$$\text{Número total de células} - 1000 \mu\text{l}$$

$$5000 \text{ Células} - x \mu\text{l}$$

8. Se sembró el número de microlitros obtenidos en placas con el número de pocillos determinado de acuerdo al ensayo a realizar, según la Tabla anterior.
9. Cada placa de cultivo fue perfectamente identificada con el nombre de la prueba y el día de sembrado.
10. Las pruebas fueron leídas y valoradas a 3, 5 y 14 días.*

* NOTA: Para facilitar la realización de las pruebas, las células fueron recolectadas y sembradas de manera que en el día 14 se analicen todas las placas de cultivo.

Ensayo de MTT

El 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2.5-difeniltetrazolium (MTT) es un ensayo colorimétrico utilizado para la evaluación de actividad metabólica o viabilidad celular con base en la función de oxidación-reducción realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa; las células que respiran activamente convierten las sales de tetrazolio (de color amarillo), a su producto de formazán (de color púrpura), el cual es solubilizado y su concentración se puede determinar por densidad óptica.

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

MTT *Cell Proliferation Kit I* (Roche):

Preparación de una solución de MTT de acuerdo al número de muestras:

Volumen total para cada pocillo: 70 μ l

64 μ l de medio de cultivo sin rojo fenol* + 6 μ l de reactivo de MTT.

*El rojo fenol impediría una correcta lectura.

1. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS para colocar 70 μ l de solución de MTT en cada muestra y se dejó incubando por 3 horas a 37°C.
2. Se añadieron 100 μ l de isopropanol (tampón de lisis) para disolver el producto de formazán púrpura y se dejó incubando durante la noche.
3. Al día siguiente la cantidad total en cada pocillo fue de 170 μ l de MTT, cantidad se separó en dos pocillos de una placa de 96 pocillos, 85 μ l en cada pocillo utilizando una punta diferente para no alterar el volumen.
4. Las muestras fue leída en un lector de placas a una longitud de onda de 540 nm.

La absorbancia relativa se correlaciona directamente con el número de células, es decir, el color más púrpura indica más células viables.

Alamar Blue (AB)

El ensayo *Alamar Blue* está diseñado para medir cuantitativamente la viabilidad celular. Donde las células vivas reducen la resazurina que es de color azul oscuro poco fluorescente, por medio de la actividad mitocondrial a resorufina, la cual es de color rosa fluorescente y el aumento de fluorescencia resultante se puede medir con un lector de microplacas o un fluorómetro. Las células muertas no tienen capacidad metabólica y no reducirán el colorante.

Alamar Blue® (AB) Assay for Assessment of Cell Proliferation:

Preparación de una solución de AB de acuerdo al número de muestras:

Volumen total para cada pocillo: 100 μ l



299 μ l de medio de cultivo sin rojo fenol* + 1 μ l de reactivo de AB.

*El rojo fenol impediría una correcta lectura.

1. Se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se colocaron 100 μ l de AB (preparado anteriormente) en cada pocillo y se dejó incubando durante la noche.
2. Al día siguiente se deberán separar estos 300 μ l en 3 pocillos, lo que es igual a colocar 100 μ l en cada pocillo.
3. Las muestras se leerán en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm.

La absorbancia relativa se correlaciona directamente con el número de células, es decir, un rosa brillante indica mayor proliferación.

Ensayo *LIVE/DEAD*

Es una técnica que provee un ensayo de viabilidad celular de fluorescencia de dos colores (células vivas con calceína AM y de células muertas con hemodimero de etidio -1 o EthD-1), con dos sondas que miden parámetro de celda de la actividad esterasa intracelular, así como la integridad de la membrana plasmática.

El Kit de *LIVE/DEAD*® *Cell Viability Assays*, (ThermoFisher):

Preparación de la solución *LIVE/DEAD*:

Volumen total de 1 ml o 1000 μ l:

997.5 μ l de PBS + .5 μ l de calceína AM + 2 μ l de EthD-1

1. Retiró el medio de cultivo de los pocillos, se lavó con PBS y se agregaron 100 μ l de solución a cada muestra.
2. Se dejó incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz.



3. Se observaron las células bajo microscopio de fluorescencia.

Emisión 494/517 nm / Excitación 517/617 nm

Las imágenes obtenidas mostrarán células vivas en color verde, por la calceína AM, la cual nos indica actividad esterase e integridad de la membrana plasmática y las células muertas de color rojo, por el etidio, que indica pérdida de integridad de la membrana plasmática.

Troncalidad

La inmunocaracterización o inmunomarcaje consiste en marcar estructuras específicas detectadas mediante anticuerpos en la técnica inmunocitoquímica. Es decir, consiste en la utilización de anticuerpos marcados para revelar, mediante microscopía, la presencia "in situ" de antígenos.

Los anticuerpos pueden estar unidos, directa o indirectamente a moléculas fluorescentes, a enzimas o a partículas de oro coloidal, de modo que las estructuras marcadas deben ser reconocidas con el tipo de microscopio adecuado, en este caso, será a moléculas fluorescentes por lo que deberán leerse en un microscopio de inmunofluorescencia.

Las células deberán estar sembradas en pocillos de 12 o 24 y puede realizarse a las 24 o 48 horas después del sembrado.

Reactivos:

- PBS Tween 1x (Pierce™ 20X PBS Tween™ 20 Buffer Sigma-Aldrich)
 - Dilución en PBS 1x a una concentración 2:100 ml
- Formalina Neutra 10% (*Formalin solution, neutral buffered, 10%* Sigma-Aldrich)
- Triton (Triton™ X-100 Sigma-Aldrich)
- Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Bovine Serum Albumin Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo CD44 (Anti-CD44 antibody [Hermes-1] abcam)
 - Dilución en BSA a una concentración 1:1000 ml
- Colorante (Alexa Fluor® 488 dye ThermoFisher)
 - Dilución en PBS 1x a una concentración 1:100 ml
- Agua Destilada (Hycel)



Protocolo:

1. Se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS *Tween* 3 veces por 2 minutos.
2. Para fijaron las células se colocaron 100 μ l de formalina sobre la muestra y esperó por 20 minutos.
3. Se retiró la formalina y se lavó nuevamente con PBS *Tween* 3 veces durante 2 minutos.
4. Para permeabilizar se colocaron 100 μ l de triton y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Se retiró el triton y se colocan 100 μ l BSA en cada muestra, dejando incubar por 30 minutos.
6. La BSA se retiró y se lavó nuevamente con PBS *Tween* 3 veces por 2 minutos para colocar 100 μ l de anticuerpo y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente.
7. El anticuerpo CD44 fue retirado y se lavó con PBS *Tween* 3 veces por 2 minutos para poder colocar el colorante (Alexa Fluor 488), el cual fue incubado en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Finalmente se lavó cada muestra con agua destilada y fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia.

Pruebas de Apoptosis con TUNEL

TUNEL, por su nombre en inglés; *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*, es un método para detectar fragmentación en el ADN, marcando el extremo terminal de ácidos nucleicos que resultan de las cascadas de señalización apoptóticas, que son identificadas gracias a la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal o TdT, que cataliza la adición de dUTPs. Es decir, que se basa en la incorporación de dUTPs modificados por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en los extremos 3'-OH del ADN fragmentado, creando un sello.

Este ensayo también puede marcar las células que han sufrido daños severos en el ADN y puede ser realizado mediante técnica visual y/o por absorbancia.



La técnica visual se logra mediante fluoróforos o haptenos, en este caso biotina o bromo, que pueden ser detectados directamente o indirectamente con estreptavidina o anticuerpos, para lo que se puede utilizar biotin-dUTP o BrdUTP respectivamente.

TUNEL Alexa 488(Thermo-Fisher):

Reactivos dentro del Kit del ensayo TUNEL:

- Reacción Buffer TdT (Componente A)
- Mezcla de nucleótidos EdUTP (Componente B)
- TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) (Componente C)
- Click-iT® reactivo buffer (Componente D)
- Click-iT® aditivo de reacción buffer (Componente E)

Otros Reactivos:

- PBS(*Dulbecco's phosphate Buffered Saline*, Biowest)
- Formalina Neutra 10% (*Formalin solution, neutral buffered*, 10% Sigma-Aldrich)
- Triton (Triton™ X-100 Sigma-Aldrich)
- Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Bovine Serum Albumin Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo CD44 (*Anti-CD44 antibody* [Hermes-1] abcam)
 - Dilución en BSA a una concentración 1:1000 ml
- Colorante (Alexa Fluor® 488 dye ThermoFisher)
 - Dilución en PBS 1x a una concentración 1:100 ml
- Agua Destilada (Hycl)

Técnica visual

Para este ensayo se deberán tener las células sembradas placas de 12 pocillos, de acuerdo a la Tabla 1.

1. Se retiró el medio de cultivo desechándolo en un vaso de precipitados, cada muestra, se lavó con PBS y se fijaron las células con formalina neutra al 10% durante 15 min a temperatura ambiente
2. La formalina fue retirada y se colocó Triton, dejándolo incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.
3. Se retiró Triton y se lavó con Agua destilada



4. Se colocaron 100 μ l de solución Buffer TdT (Componente A) y se dejó incubando durante 10 min a temperatura ambiente.
5. El Componente A fue retirado y se procedió a preparar el coctel de reacción de acuerdo al número de muestras.
6. Se agregarán 100 μ L del coctel de reacción buffer TdT, que se preparó en el paso anterior, la solución deberá expandirse totalmente sobre la superficie del pocillo y se Incubar durante 60 minutos a 37°C.
7. El coctel de reacción fue retirado y se lavó con BSA
8. Fue preparado el aditivo del reactivo buffer (Componente E) para cada muestra y agregado a cada pocillo para ser Incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz.
9. La solución de los pocillos fue removida y cada pocillo lavado con BSA durante 5 minutos para ser observado bajo el microscopio de fluorescencia.
10. Para una visualización completa de las células y como control, se debe realizó una tinción con DAPI.

Técnica por absorbancia

Para este ensayo se deberán se sembraron las células en placas de 96 pocillos, de acuerdo a la Tabla 1.

1. Se retiró el medio de cultivo de las células y se lavó con PBS para fijarlas con formalina neutra.
2. Para permeabilizar, se retiró la formalina y se lavó con PBS y se colocaron 50 μ l de triton, incubado durante 20 minutos a temperatura ambiente.
3. El triton fue retirado, se lavó dos veces con agua destilada, y se agregaron 50 μ L de reacción buffer TdT (Componente A), incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. La reacción buffer fue retirada y se procedió a la preparación del coctel de reacción de acuerdo al número de muestras



5. El coctel de reacción fue agregado a cada pocillo y se Incubaron durante 60 minutos a 37°C.
6. Se removió el coctel de reacción y se lavó con BSA al 3% durante 2 minutos.
7. El aditivo de reacción buffer fue preparado de acuerdo al número de muestra, se agrego inmediatamente y se dejo incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
8. El coctel de reacción fue removido y se lavó cada pocillo con BSA por 5 minutos para poder ser leídas en un lector de placas a una longitud de onda de 519 nm.

8. Recursos materiales

- Centrifuga *Refrigerated SIGMA 3-16K Centrifuge*
- Incubadora BINDER KBF240 Cooled Incubator/climatic chamber
- Microscopio invertido para cultivos celulares y de tejidos Leica DMI1
- Microscopio de fluorescencia ZEISS HXP 120 C (Software ZEN LITE 2012)
- Campana de flujo laminar (Cabina de Seguridad Biológica) Clase II Bio II Advance de Telstar
- Lector de placas Thermo Labsystems Multiskan Ascent
- Balanza analítica Mettler Toledo

9. Resultados

Obtención de las muestras

Las células mesenquimales fueron obtenidas exitosamente de tejidos bucales. Fue mediante cirugías de terceros molares de pacientes jóvenes sanos.

La Pulpa Dental se encontró en pacientes de 18 a 20 años, la Papila Apical y Fólículo Dental se encontraron en pacientes de 16 a 18 años.

Obtención de células mesenquimales de cada una de las fuentes sembradas.

Pulpa, Papila Apical y Folículo Dental, fueron fuentes viables para la obtención de células mesenquimales, las técnicas de disgregación mecánica y digestión enzimática mostraron buenos resultados.

Las células fueron observadas diariamente bajo microscopía óptica para evaluar morfología fibroblastoide y adherencia a la superficie plástica, según los criterios de la ISCT. (Dominici et al., 2006)

Las primeras células del cultivo primario aparecieron entre los primeros 7 días, llegando a estar en confluencia entre los 15 y 20 días, donde incluso se formaron Unidades formadoras de colonias.

Las células obtenidas de esas tres fuentes presentaron un crecimiento óptimo durante el estudio realizado, bajo condiciones adecuadas de humedad y CO₂.

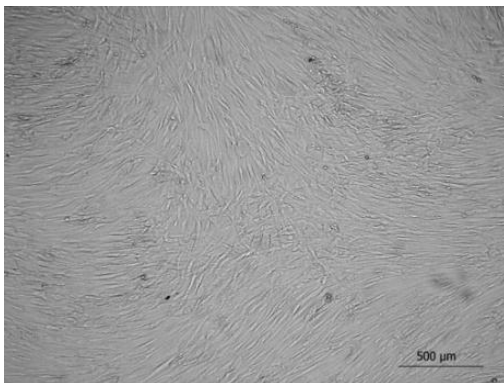


Fig. 4 Cultivo de Células de Pulpa Dental

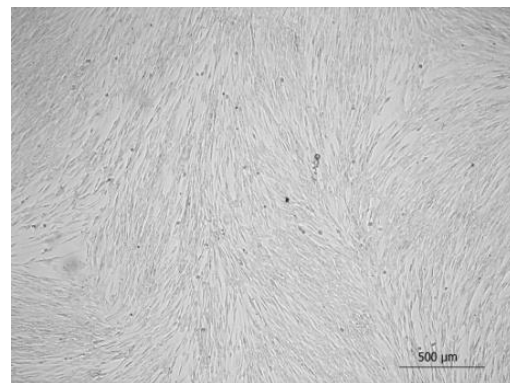


Fig. 5 Cultivo de células de Folículo Dental

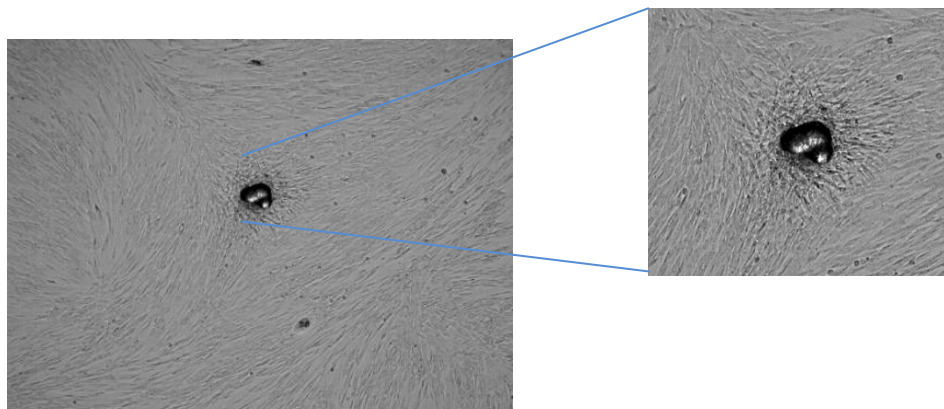


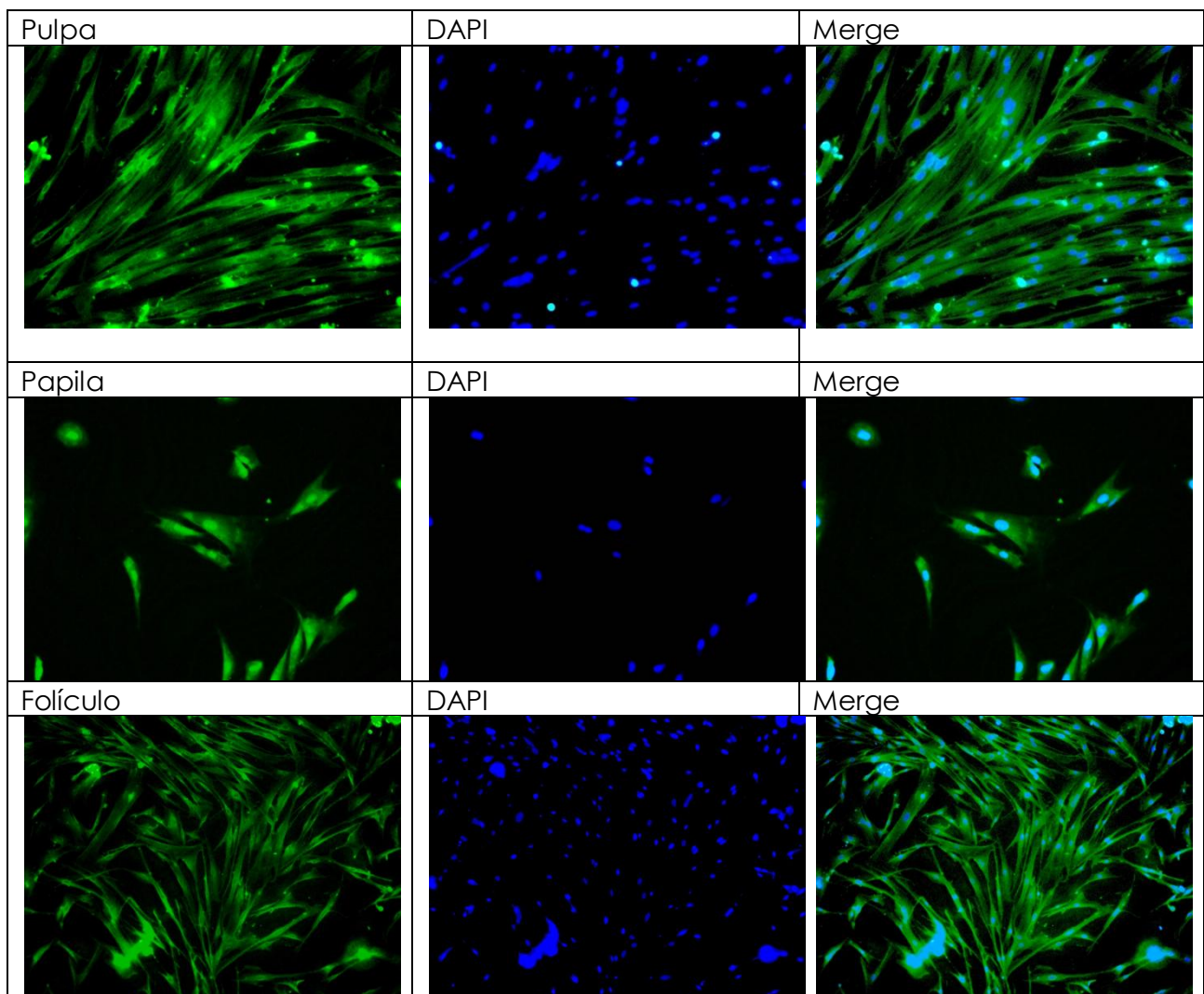
Fig. 6 Cultivo de células de Papila Apical con apreciación de una Unidad Formadora de Colonias (CF-U)

Troncalidad

Para comprobar la presencia de células mesenquimales en los cultivos, se realizó el inmunofenotipaje.

Los receptores de membrana de las células aisladas de las tres fuentes bucales, Pulpa, Papila Apical y Folículo dental, obtenidas en los cultivos celulares, expresaron marcadores de superficie positivos para el anticuerpo CD 44, que es una de las moléculas utilizadas para la tipificación de células mesenquimales. (A. Arévalo, M. Páez, D, 2007)

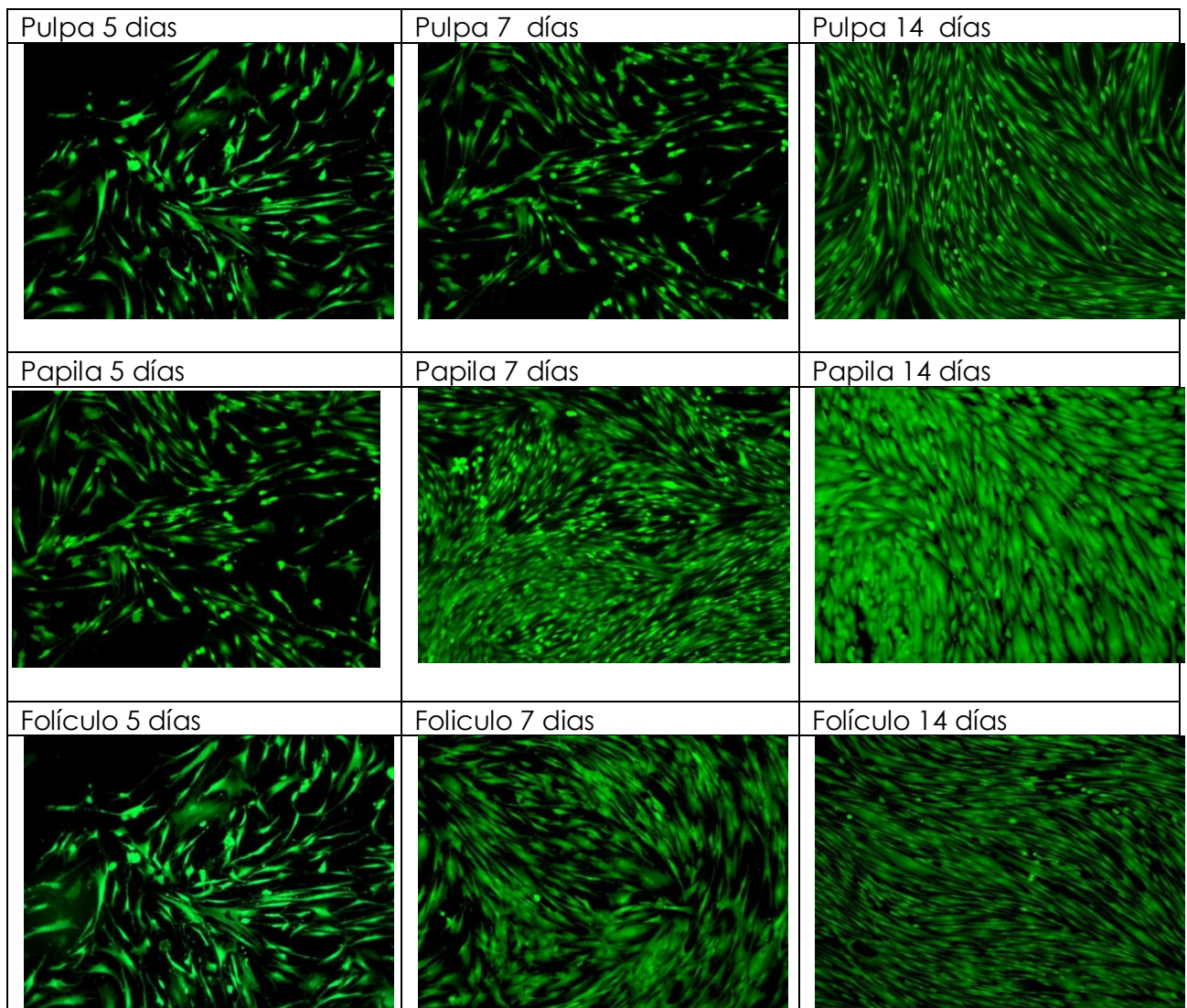
La fluorescencia se puede observar gracias al anticuerpo secundario que se adjunta al anticuerpo primario (CD44), que en este caso fue Alexa Fluóor 488 y entonces, en verde se observa la membrana celular y en azul la tinción de los núcleos, con DAPI.



Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia. (UBIMED, FESI)

Ensayo LIVE/DEAD

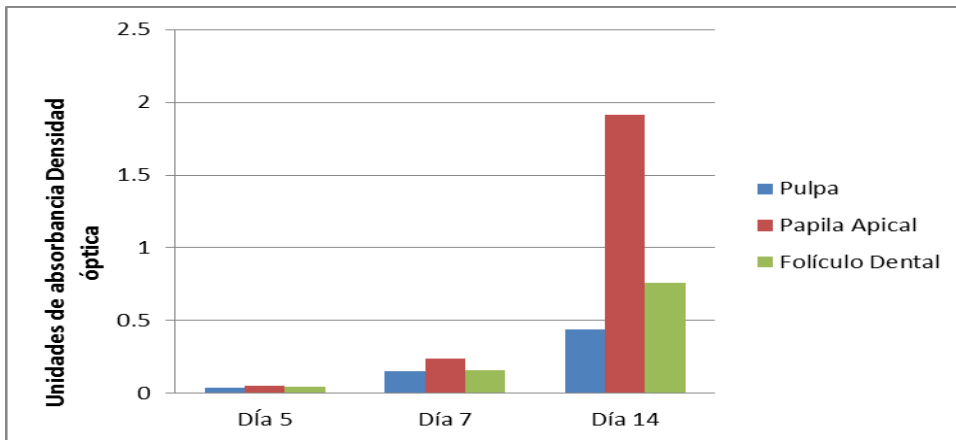
Las células deben ser viables para la realización de los ensayos *in vitro* mediante la actividad esterasa intracelular mediante calceína-AM en color verde altamente fluorescente, sin observar células muertas de color rojo, ya que el Etidio hubiera penetrado la membrada y teñido el núcleo.



Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia. (UBIMED, FESI)

MTT

El ensayo tiene la finalidad de medir cuantitativamente la proliferación celular. El formazán producido por el proceso de respiración de las células, nos indica la cantidad de células vivas. La cuantificación se leyó mediante lector de placas, obteniendo resultados favorables para los tres tejidos analizados.

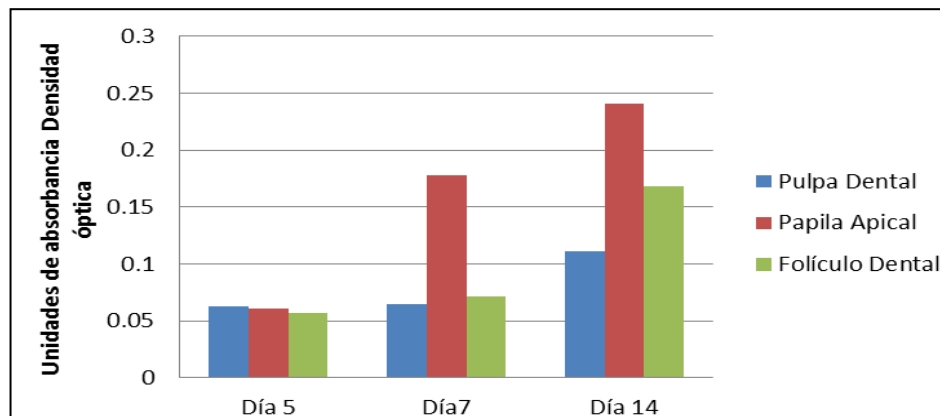


Gráfica 1. Absorbancia de MTT a 540nm. Proceso de respiración evaluada al día 5, 7 y 14.

La proliferación de Pulpa, Papila Apical y Folículo Dental aumento a partir del día 7 de forma exponencial. La proliferación de Papila Apical fue tres veces mayor que la de Pulpa y dos veces mayor que Folículo Dental

Alamar Blue

El ensayo de Alamar Blue evaluó la viabilidad de las células de manera cuantitativa, donde los tres tejidos mostraron incremento durante los días evaluados.



Gráfica 2. Absorbancia de Alamar Blue a 570nm evaluando el proceso oxido-reducción de la respiración celular a 5, 7 y 14 días.

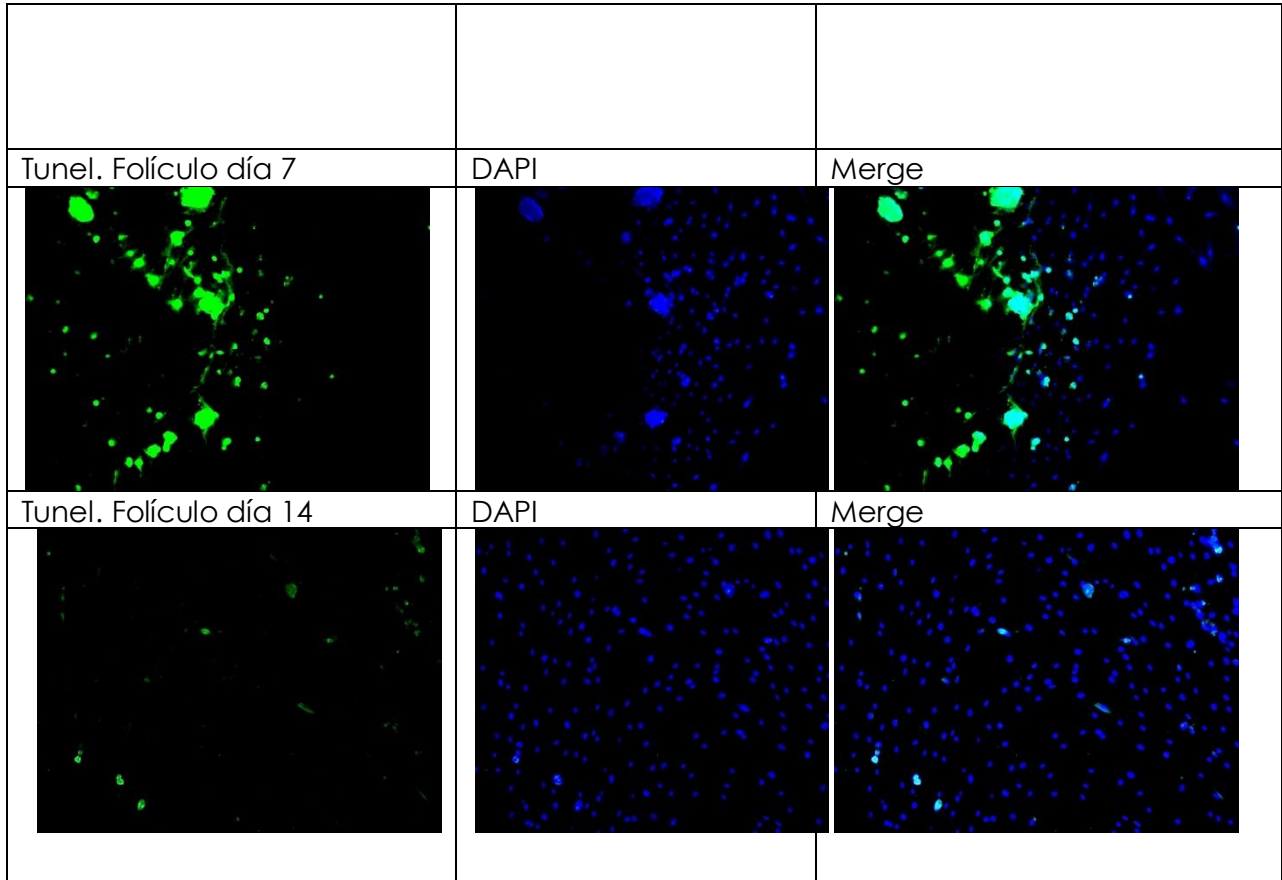
En general se obtuvo un incremento significativo entre el día 7 y día 14, En Papila Apical se observó un aumento entre el día 5 y 7, en general presento una viabilidad mayor a Pulpa y Folículo dental. De la misma forma, Folículo presento mayor viabilidad que Pulpa.

Tunel

Es un método para detectar fragmentación en el ADN, marcando el extremo terminal de ácidos nucleicos que resultan de las cascadas de señalización apoptóticas. Mediante la técnica visual se obtuvieron las siguientes imágenes.

Tunel. Pulpa día 5	DAPI	Merge
Tunel. Pulpa día 7	DAPI	Merge
Tunel. Pulpa día 14	DAPI	Merge

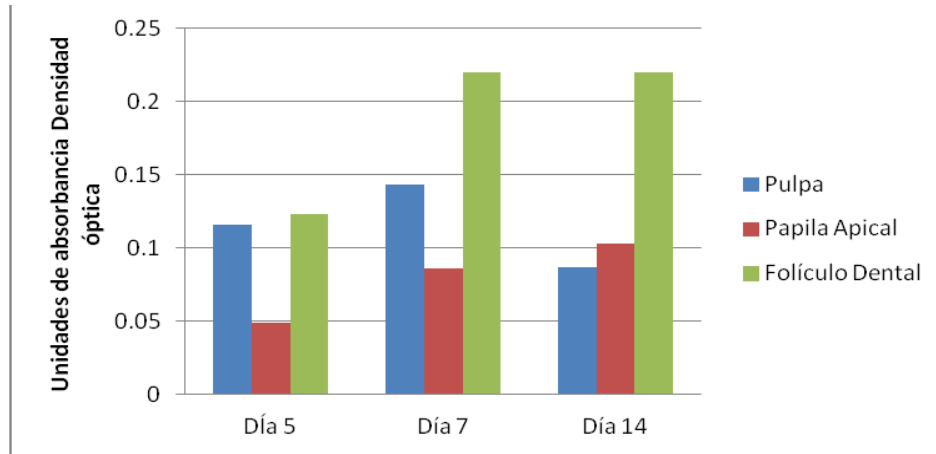
Tunel. Papila día 5	DAPI	Merge
Tunel. Papila día 7	DAPI	Merge
Tunel. Papila día 14	DAPI	Merge
Tunel. Folículo día 5	DAPI	Merge



Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia. (UBIMED, FESI)

Tunel por absorbancia

Se evaluó de manera cuantitativa a las células programadas para morir, donde en comparación, Folículo fue el tejido con mayor índice de apoptosis, seguido de Pulpa y Papila.

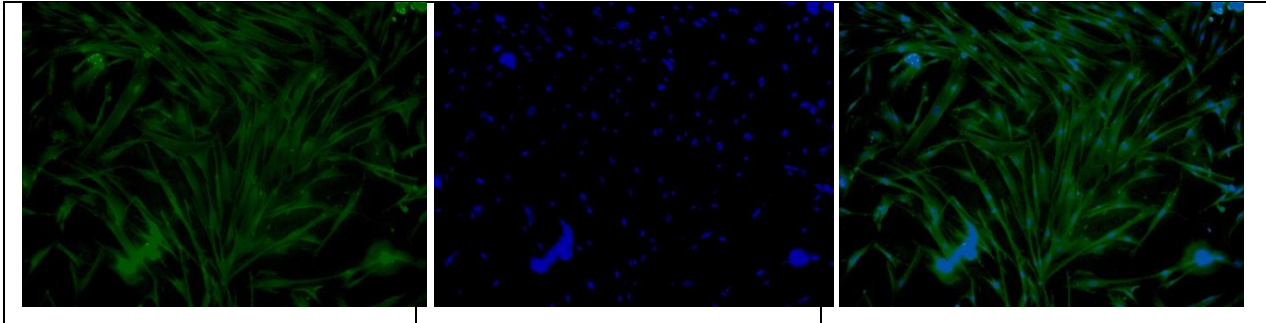


Gráfica 3. Absorbancia de TUNEL a 519 nm evaluando procesos químicos celulares a 5, 7 y 14 días.

Troncalidad

La inmunocaracterización o inmunomarcaje marca estructuras específicas detectadas mediante anticuerpos, en este caso, utilizando anticuerpo CD44, el cual nos muestra que son células mesenquimales.

Pulpa	DAPI	Merge
Pulpa	DAPI	Merge
Folículo	DAPI	Merge



Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia. (UBIMED, FESI)

Las células se observan en verde debido a que el anticuerpo primario se unió a la superficie de la membrana, lo cual indican que son positivas para CD44, para su visualización se utilizó el colorante secundario Alexa Fluor 488.

10. Discusión

Las células troncales mesenquimales pueden encontrarse en cavidad oral en diversos tejidos, entre ellos la pulpa, la Papila Apical y el folículo dental (Chen et al., 2012) y en los últimos años se han hecho diversos estudios sobre su capacidad de diferenciación hacia diversos linajes.

El objetivo de este estudio fue aislar, cultivar células madres mesenquimales de pulpa y folículo dental humano, caracterizar su inmunofenotipo, valorar su viabilidad, proliferación y apoptosis *in vitro*.

En nuestros resultados se observó a la Papila Apical, como el tejido que presenta mayor Viabilidad y Proliferación *in vitro* sobre Folículo Dental, mismo que arrojó resultados de viabilidad y proliferación por encima de Pulpa dental, lo cual concuerda con diversos estudios realizados sobre células troncales mesenquimales de tejidos bucales.

Estos resultados pueden explicarse por su histología, ya que el folículo corresponde a un tejido conectivo de características laxas y al igual que Papila Apical son tejidos que darán lugar a otros tejidos bucales, es decir, durante la odontogénesis, las células ectomesenquimales que están más cerca de los márgenes interiores del órgano del esmalte se diferencian en papila apical y las células ectomesenquimales más cerca de los márgenes exteriores forman al folículo dental, el cual dará lugar al esmalte. La dentina y la pulpa se derivan de la papila apical, mientras que el cemento, ligamento periodontal y el hueso alveolar, son todos derivados del folículo dentario.



En particular, es bien sabido que la papila dental se deriva de la ectomesenquima inducida por la lámina dental superposición durante el desarrollo del diente y es un tejido que se convierte en el desarrollo de la pulpa dental después de haber sido encerrado por el tejido de la dentina producida por odontoblastos que provienen de este órgano. La parte apical de la papila dental durante la etapa de desarrollo de las raíces no se ha descrito mucho en la literatura y la mayor información sobre el desarrollo del diente proviene de estudios con modelos animales. (George T-J Huang et al., 2008)

Por otra parte, el folículo dental es un tejido conectivo blando, de origen mesenquimal, que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen dentario en desarrollo (Rodríguez-Lozano et al.; d'Aquino, 2011). Se forma durante la etapa de copa de la odontogénesis, a partir de una población de células progenitoras del ectomesénquima que derivan de las crestas neurales.

Recientemente se ha estudiado como una fuente rica en células troncales mesenquimales que puede persistir durante la vida adulta en caso de dientes impactados, principalmente en terceros molares, de donde puede extraerse y descartarse como desecho biológico en la atención dental (Honda et al., 2010; d'Aquino; Angiero et al., 2012). Algunos de los usos de estas células han sido para desarrollar modelos de regeneración de tejido periodontal in vivo. Por ejemplo Guo et al, en 2012 demostró en su estudio, que incluso en pasaje 30 estas células podían ser utilizadas mezcladas con hueso bovino cerámico en modelo animal.(Brizuela C et al., 2013)

Y ya que la pulpa presenta un tejido conectivo de características más fibrosas y al estado de desarrollo de los distintos tejidos, el folículo dental y la Papila Apical estarían en un estado de desarrollo embrionario en comparación al tejido pulpar.(Brizuela C et al., 2013)

En la hipótesis planteada en nuestro estudio, suponíamos a la pulpa dental superior a otras fuentes de tejidos bucales recientemente encontradas debido a que según varios estudios, las células de la Pulpa posee células mesenquimales indiferenciadas que derivan del ectodermo de la cresta neural, constituyendo una verdadera reserva celular, poseen capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos según el estímulo que actúe sobre ellas (Murray et al., 2008, Yen & Yelick, 2011, Suzuki et al., 2011).

La capacidad de diferenciación de las células troncales mesenquimales de Pulpa quedó demostrada en estudios experimentales en ratas, donde se pudo observar su potencial terapéutico para la reparación de un infarto de miocardio inducido tras ligadura de las arterias coronarias. Siete días después, estas células fueron inyectadas intramiocárdicamente en los animales y a las 4 semanas, las ratas



sometidas a este tratamiento celular mostraron una mejora en su función cardiaca. (Fonseca Armando, Jiménez Johana, 2014)

Se ha demostrado que las células obtenidas de pulpa dental tienen el potencial de diferenciarse en varios tipos de células, incluyendo los odontoblastos, progenitores neurales, osteoblastos, condrocitos y adipocitos y son consideradas altamente proliferativas, lo cual posiciona a la pulpa dental como una fuente rica de células troncales mesenquimales, en particular considerada la fuente más accesible de células troncales postnatales y en conjunto con su multipotencial y plasticidad, presenta las características adecuadas para aplicaciones de ingeniería tisular. (L. Casagrande, 2011)

Sin embargo, lo anterior no confiere una mayor capacidad *in vitro* de proliferación y viabilidad, aunque tampoco presento niveles apoptóticos altos y no existen estudios que incluyan ensayo de Tunel dentro de la literatura, que nos pueda dar estándares de comparación para ningún tejido bucal.

En el estudio realizados por Sonoyama, se encontró que las células mesenquimales de Papila Apical representan una nueva población de las células multipotentes, con potencial de regeneración de tejido superior a la de células madre de Pulpa Dental. (Sonoyama et al., 2006)

Se encontró que la papila apical es distintivo de la pulpa en cuanto a que contiene componentes celulares y vasculares menores que los de pulpa. Las células en la papila apical proliferan de 2 a 3 veces mayor que los de celulosa en cultivos de órganos. (Sonoyama et al., 2008)

En un análisis comparativo de *in vitro* sobre el potencial de diferenciación de las células madre de la pulpa dental humana (DPSCs) y las células de la papila apical del tallo (SCAP) obtenidos de terceros molares de jóvenes donantes sanos. Estas células mesenquimales obtenidas se indujeron a linaje osteogénico y odontogénico. Sin embargo, en los resultados se aprecia que las células aisladas de Papila Apical mostraron un potencial significativamente más alto de proliferación, lo que podría ser de importancia para su uso en ingeniería tisular óseo / dental. (A. Bakopoulou, 2011)

Las células provenientes de Papila Apical mostraron una tasa de proliferación significativamente más alta y mayor capacidad de formación de colonias cuando se compararon en un estudio *in vitro* contra las células provenientes del ligamento periodontal.

En consecuencia, todo lo anterior demuestra que 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 (K. Chen, 2013)

Dentro de la medicina regenerativa aplicada a la odontología se puede afirmar que, en comparación con las células troncales obtenidas de la médula ósea, las células troncales de tejidos de cavidad bucal tienen predilección por el desarrollo odontogénico. (Apexa, 2012)

11. Conclusiones

Las células troncales mesenquimales con capacidades multipotentes pueden ser aisladas de diversos tejidos bucales y ser consideradas de fácil acceso ya que pueden ser obtenidas de terceros molares, los cuales son considerados de desecho.

Las técnicas de cultivos por disgregación mecánica y explantes, resultaron efectivas para la obtención de las células troncales mesenquimales de Pulpa, Papila Apical y Folículo dental.

Las células de Pulpa, Papila Apical y Folículo Dental demostraron que pueden ser utilizadas en la ingeniería tisular y medicina regenerativa ya que las pruebas realizadas *in vitro* demostraron que altamente viables y proliferativas.

Mediante el ensayo de Tunel se puede concluir que las células no presentan daños en el AND y que no están programadas para morir, sin embargo, en la técnica de absorbancia, los valores cuantitativos arrojaron que Folículo Dental es el tejido con mayor índice apoptótico.

12. Bibliografía

1. A. Bakopoulou, G. L. (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* , 709-721.
2. A. Przekora, G. (2015). *In vitro* evaluation of the risk of inflammatory response after chitosan/HA and chitosan/ b-1,3glucan/HA bone scaffold implantation. *Materials science & engineering* .
3. Alberts Bruce, B. D. (2011). *Introducción a la Biología Celular*, 3ª edición. México: Medica Panamericana.



4. C. Morsczeck, W. G. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *El Sevier, Matriz Biology* , 155-165.
5. Ferraris, G. d. (2009). *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. Buenos Aires, Argentina.: Editorial Médica Panamericana.
6. G. Khang, J. L. (2006). Biomaterials: Tissue Engineering and Scaffolds. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation* .
7. Gladys, V. (2011). Ingeniería de tejidos y andamios de regeneración celular. *Acta Bioclinica* .
8. J. Lee, F. K. (2014). Biomaterials for tissue engineering. *Natural Library of Medicine National Institutes of Health* .
9. K. Chen, H. X. (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* .
10. L. Baldwin, J. H. (2008). The in vivo cytokine release profile following implantation. *Cytokine* .
11. L. Casagrande, M. C. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* , 1-7.
12. R. Sridharan, A. C. (2015). Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Materials Today* .
13. Serrano, C. (2011). Biomateriales: Biología y Química en el diseño de tejidos artificiales. *Instituto de Ciencias Materiales de Madrid (CSIC)* .
14. A. Arévalo, M. Páez, D, M. R. (2007). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA*, 5(1794-2470), 177–184.
15. A. Shteyer, D. Gazit, L. Binderman, A. B. (1987). Hormone-responsive cells derived from human dental papilla: characterization in vitro and in vivo in diffusion chambers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 23(1), 15–20.
16. Acevedo Toro, P. A., & Cortés Márquez, M. M. (2008). Células madre: Generalidades, eventos biológicos y moleculares. *Iatreia*, 21(3), 292–306.
17. Aguilera, A. (2015). Tissue engineering . A new discipline in Investigación y Ciencia. *Investigación Y Ciencia*, 64, 61–68.



18. Apexa, P. (2012). Dental stem cells and their sources. *Dental and Health Sciences*, 02(04), 852–861.
19. Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B., & Ashammakhi, N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(4), 169–83. <http://doi.org/10.1002/term.83>
20. Baker, M. (2008). Thomas Graf: Cellular identify and transdifferentiation. *Nature Reports Stem Cells*. <http://doi.org/10.1038/stemcells.2008.140>
21. Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4), 568–84. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>
22. Brizuela C, C., Galleguillos G, S., Carrión A, F., Cabrera P, C., Luz C, P., & Inostroza S, C. (2013). Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *International Journal of Morphology*, 31(2), 739–746. <http://doi.org/10.4067/S0717-95022013000200063>
23. Cooper, G. . M. . (1999). *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Dress and Sinauer Associated Inc.
24. D. Jucht, R. Rujano, M. Romero, L. R. (2014). Utilización de células madre en el ámbito odontológico. Revisión de la literatura. *Acta Bioclinica*, 101–123.
25. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <http://doi.org/10.1080/14653240600855905>
26. Escobar-Gómez, F., Jódar, E., & Hawkins, F. (2009). Receptor Wnt: fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 18(2), 39–44. [http://doi.org/10.1016/S1132-8460\(09\)72053-7](http://doi.org/10.1016/S1132-8460(09)72053-7)
27. Fonseca Armando, Jiménez Johana, A. P. (2014). Células madre de Actualización Bibliográfica. *Mutimed. Revista Médica. Granma*, 18(2).



28. Fuchs, E., Tumber, T., & Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell*, 116(6), 769–778. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00255-7](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00255-7)
29. Graziano, A., d'Aquino, R., Laino, G., & Papaccio, G. (2008). Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 21–6. <http://doi.org/10.1007/s12015-008-9013-5>
30. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–30. <http://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
31. Hernández Ramírez, P. (n.d.). Medicina regenerativa II: Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 22(1). Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
32. Huang, G. T.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806. <http://doi.org/10.1177/0022034509340867>
33. 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. *Journal of Endodontics*, 34(6), 645–51. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2008.03.001>
34. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., ... Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), 41–49. <http://doi.org/10.1038/nature05812>
35. Kirschstein, R. (2001). Stem cells: scientific progress and future directions. *National Institutes of Health*, 1–222.
36. L. Hayflick, P. S. M. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 1, 583–621.
37. López-Díazguerrero, N., Martínez, C., & Königsberg, M. (2005). La



- Senescencia Replicativa Como. *Reb*, 24(2), 47–53.
38. Maeda, H., Wada, N., & Fujii, S. (2011). Periodontal ligament stem cells. *Stem Cells in Clinic* <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00024-2>
39. Mata-miranda, M., Vázquez-zapién, G. J., & Sánchez-monroy, V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología Y Reproducción Humana*, 23, 194–199.
40. Matos Rojas, I. a., Bertholdo, D., & Castillo, M. (2012). Células madre: implicaciones en el desarrollo de tumores cerebrales. *Radiología*, 54(3), 221–230. <http://doi.org/10.1016/j.rx.2011.05.014>
41. Mayani, H. (2009). Células Troncales Y Hematopoyesis. *Mensaje Bioquímico*, XXXIII, 155–170.
42. Mayorquín, R., & Sahagún, O. (2011). Diferenciación celular en el Sistema Nervioso, el caso de las células precursoras neuro-gliales. *Rev Bio Ciencias*, 1(55), 3–17.
43. Nam, H., & Lee, G. (2009). Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(1), 135–9. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.141>
44. Niño, M., & Carlos, J. (2005). Obtención in vitro y caracterización de células stem del cordón umbilical humano como alternativa de las células stem de origen embrionario para la medicina regenerativa. *Revista Latinoamericana de Bioética*, núm. 9(1657-4702), 1–26.
45. Perdomo, A. (n.d.). Metodología sobre obtención de muestra, cultivo y caracterización.
46. Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the Origin of the Term “Stem Cell.” *Cell Stem Cell*, 1(1), 35–38. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.013>
47. René, S., Juárez, L., Cortés, C., & Meraz, M. A. (2007). ¿Qué son las células troncales o “células madre”? What are stem cells or “mother cells”? *Vet. Méx.*, 38(1), 81–104.
48. Rodríguez, V. M. (2005). Células Madre: Conceptos Generales y Perspectivas de Investigación. *Universitas Scientiarum*, 10(1), 5–14.
49. Rosenthal, N. (2003). Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *The*



- New England Journal of Medicine*, 349(3), 267–274.
<http://doi.org/10.1056/NEJMra020849>
50. Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., ... Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–155.
[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
51. Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060–1060. <http://doi.org/10.1038/nature04954>
52. Soler, B., Gigoux, J. P., Tagle, P., & Bernhardt, R. Von. (2007). *Células Madre : Proyecciones de su uso en Neurología* (Vol. 1998).
53. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., ... Wang, S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. *PLoS ONE*, 1(1), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>
54. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T.-J. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*, 34(2), 166–71. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
55. Taran, R., Mamidi, M. K., Singh, G., Dutta, S., Parhar, I. S., John, J. P., ... Das, A. K. (2014). In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *Journal of Biosciences*, 39(1), 157–169. <http://doi.org/10.1007/s12038-013-9409-5>
56. Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726–736. <http://doi.org/10.1038/nri2395>
57. Valdespino-gómez, V. M. (2014). Estrategias para la regeneración de tejidos: células, inductores bioquímicos, bionanomateriales y bioconstrucciones. Alcances clínico quirúrgicos. *Cir Cir*, 82, 578–589.
58. Valencia, R., Espinosa, R., & Nario, H. (2013). Panorama actual de las células madre de la pulpa de dientes primarios y permanentes. *Rodyb*, 2, 1–33.
59. Valero-palencia, P., Nallet, A., Toledo, A., Pacheco, M., Mujica, E., & Mujica, A. (2011a). Células madre: fundamentos y experiencias de terapia celular. *Diabetes Internacional*, Vol 3.



60. Valero-palencia, P., Naitet, A., Toledo, A., Pacheco, M., Mujica, E., & Mujica, A. (2011b). Células madre: fundamentos y experiencias de terapia celular. *Diabetes Internacional*, 2, 8–16.
61. Weissman, Irving L Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). STEM AND PROGENITOR CELLS: Origins, and Transdifferentiations. *Cell and Developmental Biology*, 387–403.
<http://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152334>
62. Werkstoffkunde, B. (2007). Stem Cells – Prospects in Dentistry. *Schweizer Monatsschrift Für Zahnmedizin*.
63. Whittaker, P. (2005). Therapeutic cloning: The ethical limits. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 689–691.
<http://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.034>
64. Yao, S., Pan, F., Prpic, V., & Wise, G. E. (2008). Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. *Journal of Dental Research*, 87(8), 767–771.
<http://doi.org/10.1177/154405910808700801>