



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOPORTE HEMATOPOYÉTICO DE  
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE TEJIDOS**

**DENTALES**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MATAMOROS DE MARIA Y CAMPOS DIANA ROSA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALTA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM**

**MÉXICO, CD.MX., NOVIEMBRE, 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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOPORTE HEMATOPOYÉTICO DE  
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE TEJIDOS**

**DENTALES**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MATAMOROS DE MARIA Y CAMPOS DIANA ROSA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALTA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM**

**MÉXICO, CD.MX., NOVIEMBRE, 2016**



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 22 de agosto de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MATAMOROS DE MARIA Y CAMPOS DIANA ROSA** con número de cuenta **302044232**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOPORTE HEMATOPOYÉTICO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE TEJIDOS DENTALES"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**:

Presidente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
Vocal: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Suplente: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ  
Suplente: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 05 de octubre de 2016

*M. del Coro Arizandi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la oportunidad otorgada.

Al CONACyT, por el sustento recibido durante la permanencia en el programa del posgrado.

Al IMSS, por el apoyo ofrecido para este proyecto (2014-3602-24).

A los miembros del comité tutor: Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dr. Edelmiro Santiago Osorio, Dr. Juan José Montesinos, por la asesoría brindada para la realización del presente trabajo.

## **Agradecimientos Adicionales**

### ***Por introducirme en el mundo de las MSCs:***

Dr. Juan José Montesinos Montesinos

Dra. Marta Elena Castro Manreza

### ***Por su asesoría en el soporte hematopoyético:***

M en C. Guadalupe Fajardo Orduña

Dra. Patricia Flores Guzmán

### ***Por su estímulo al inicio de esta aventura:***

Dra. Ana María García Bores

Dr. José Guillermo Avila Acevedo

### ***Por sus consejos:***

Q. Martina Flores Jiménez

### ***Por su grata compañía:***

A los miembros del Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales; Erika, Pilar, Lupe y Adrián.

### ***Y también:***

A Miguel, Ricardo, Mario, Leonardo, Paulina, Mauricio, Lucrecia y José Luis.

# ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| Índice de Figuras .....  | I   |
| Índice de Tablas.....  | II  |
| Lista de Abreviaturas.....   | III |
| 1. RESUMEN .....   | 1   |
| 2. ABSTRACT .....  | 2   |
| 3. INTRODUCCIÓN.....   | 3   |
| 3.1 La Médula Ósea.....  | 3   |
| 3.1.1 Sistema hematopoyético .....                                       | 4   |
| 3.1.2 Sistema estromal.....  | 5   |
| 3.2 Nicho hematopoyético .....   | 7   |
| 3.3 MSCs: participación en el nicho hematopoyético .....                 | 8   |
| 3.4 Transplante de células progenitoras hematopoyéticas.....             | 8   |
| 3.5 Proliferación y expansión de HPCs <i>in vitro</i> .....              | 9   |
| 3.6 Participación de MSCs en la recuperación temprana de pacientes ..... | 9   |
| 3.7 Fuentes alternativas de MSCs.....                                    | 11  |
| 3.8 Tejidos dentales .....   | 12  |
| 3.9 MSCs de tejidos dentales.....  | 14  |
| 4. ANTECEDENTES .....  | 15  |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....                                       | 16  |
| 6. HIPÓTESIS .....   | 17  |
| 7. OBJETIVOS.....  | 17  |
| 7.1 General.....   | 17  |
| 7.2 Particulares .....   | 17  |
| 8. METODOLOGÍA.....  | 18  |
| 8.1 Obtención de muestras.....   | 18  |
| 8.1.1 Selección de pacientes .....                                       | 18  |
| 8.1.2 Obtención de los tejidos .....                                     | 18  |
| 8.2 Obtención de MSCs.....   | 19  |
| 8.2.1 MO.....  | 19  |
| 8.2.2 Tejidos dentales .....   | 19  |



|       |   |    |
|-------|---|----|
| 8.3   | Caracterización .....   | 20 |
| 8.3.1 | Morfología .....  | 20 |
| 8.3.2 | Inmunofenotipo .....  | 20 |
| 8.3.3 | Capacidad de diferenciación.....                                | 21 |
| 8.4   | Evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético .....      | 21 |
| 8.4.1 | Obtención de la población enriquecida en CD34+ CD38- Lin- ..... | 21 |
| 8.4.2 | Preparación de los co-cultivos.....                             | 22 |
| 8.4.3 | Proliferación .....   | 23 |
| 8.4.4 | Formación de CFC.....   | 23 |
| 8.4.5 | Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-.....         | 23 |
| 8.4.6 | Formación de LTC-IC .....                                       | 23 |
| 8.5   | Análisis estadístico .....                                      | 24 |
| 8.6   | Diagrama Metodológico .....                                     | 24 |
| 9.    | RESULTADOS .....  | 25 |
| 9.1   | Caracterización .....   | 25 |
| 9.1.1 | Morfología.....   | 25 |
| 9.1.2 | Inmunofenotipo .....  | 26 |
| 9.1.3 | Capacidad de diferenciación.....                                | 28 |
| 9.2   | Capacidad de soporte hematopoyético .....                       | 30 |
| 9.2.1 | Proliferación .....   | 30 |
| 9.2.2 | Formación de CFCs.....  | 32 |
| 9.2.3 | Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-.....         | 35 |
| 9.2.4 | Formación de LTC-IC .....                                       | 37 |
| 10.   | DISCUSIÓN .....   | 39 |
| 10.1  | Caracterización .....   | 39 |
| 10.2  | Capacidad de soporte hematopoyético .....                       | 41 |
| 11.   | CONCLUSIONES.....   | 46 |
| 12.   | PERSPECTIVAS.....   | 47 |
| 13.   | LITERATURA CITADA .....   | 48 |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Sistema hematopoyético .....  | 5  |
| <b>Figura 2.</b> Fuentes de MSCs empleadas para la expansión de HPCs de SCU.....               | 12 |
| <b>Figura 3.</b> Anatomía del diente .....   | 14 |
| <b>Figura 4.</b> Morfología de las MSCs de las diversas fuentes. ....                          | 25 |
| <b>Figura 5.</b> Nivel de expresión de marcadores de superficie mostrados en histogramas ..... | 27 |
| <b>Figura 6.</b> Capacidad de diferenciación adipogénica osteogénica y condrogénica .....      | 28 |
| <b>Figura 7.</b> Imágenes representativas de los co-cultivos .....                             | 30 |
| <b>Figura 8.</b> Cinética de proliferación.....  | 31 |
| <b>Figura 9.</b> Morfología de las principales colonias .....                                  | 32 |
| <b>Figura 10.</b> Incremento en veces de las colonias totales.....                             | 33 |
| <b>Figura 11.</b> Incremento en veces de progenitores eritroides y mieloides .....             | 34 |
| <b>Figura 12.</b> Imágenes representativas de los porcentajes de células CD34+CD38- .....      | 35 |
| <b>Figura 13.</b> Porcentaje de células con inmunofenotipo CD34+CD38-.....                     | 36 |
| <b>Figura 14.</b> Incremento en veces de células con inmunofenotipo CD34+CD38-.....            | 37 |
| <b>Figura 15.</b> Incremento en veces de LTC-IC .....  | 38 |

## Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Trabajos más relevantes del uso de MSC de MO.....            | 10 |
| <b>Tabla 2.</b> Porcentaje de expresión de los marcadores de superficie..... | 26 |

## Lista de Abreviaturas

|         |  |
|---------|--|
| Ang     | Angiopoyetina  |
| ALP     | Fosfatasa alcalina                                       |
| ALCAM   | Molécula de adhesión celular de leucocitos activados     |
| BSP     | Sialoproteína ósea                                       |
| CAM     | Molécula de adhesión celular                             |
| CAR     | Células reticulares abundantes en CXCL-12                |
| CD      | Grupo de diferenciación                                  |
| CFC     | Célula formadora de colonias                             |
| CFC-E   | Célula formadora de colonias eritroides                  |
| CFC-M   | Célula formadora de colonias mieloides                   |
| CMN     | Células mononucleares                                    |
| CXCL-12 | Ligando de quimiocina 12                                 |
| CXCR4   | Receptor de quimiocina 4                                 |
| EICH    | Enfermedad injerto contra el hospedero                   |
| FGF     | Factor de crecimiento de fibroblastos                    |
| Flt3-L  | Ligando de tirosina fetal 3                              |
| G-CSF   | Factor estimulador de colonias de graulocitos            |
| GM-CSF  | Factor estimulador de colonias granulocitos y macrófagos |
| GW      | Gelatina de Wharton                                      |
| HC      | Célula hematopoyética                                    |
| HLA     | Antígeno leucocitario humano                             |
| HPC     | Célula progenitora hematopoyética                        |
| HSC     | Célula troncal hematopoyética                            |
| IFN     | Interferón   |
| ICAM    | Molécula de adhesión intercelular                        |
| IL      | Interleucina   |

|          |   |
|----------|---|
| LIF      | Factor inhibidor de leucemia                                    |
| Lin      | Linaje  |
| LP       | Ligamento periodontal   |
| LTC-IC   | Células iniciadoras de cultivos largo plazo                     |
| MCAM     | Molécula de adhesión celular de melanoma                        |
| M-CSF    | Factor estimulador de colonias de macrófagos                    |
| MEPE     | Fosfoglicoproteína de matriz extracelular                       |
| MO       | Médula ósea   |
| MSC      | Célula troncal mesenquimal                                      |
| NOD/SCID | Ratón diabético no obeso con inmunodeficiencia severa combinada |
| PCNA     | Antígeno nuclear de células en proliferación                    |
| PD       | Pulpa dental  |
| PDGF     | Factor de crecimiento derivado de plaquetas                     |
| PDGFR    | Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas        |
| PTH      | Hormona paratiroidea  |
| SCF      | Factor de célula troncal  |
| SCU      | Sangre de cordón umbilical                                      |
| SDF      | Factor derivado del estroma                                     |
| SPM      | Sangre periférica movilizada                                    |
| SSEA4    | Antígeno embrionario estadio-específico 4                       |
| TA       | Tejido adiposo  |
| G        | Gingiva   |
| TCH      | Trasplante de células hematopoyéticas                           |
| TGF      | Factor de crecimiento transformante                             |
| TNF      | Factor de necrosis tumoral                                      |
| TPO      | Trombopoyetina  |
| VCAM     | Molécula de adhesión celular-vascular                           |

VEGF      Factor de crecimiento endotelial-vascular

# 1. RESUMEN

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se producen todas las células de la sangre, ocurre en la médula ósea (MO) y es finamente regulado por las células del estroma destacando las células troncales mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés, *Mesenchymal Stem Cells*). Cuando se pierde la regulación de este proceso resulta en enfermedades hematológicas que son tratadas con fines curativos mediante el trasplante de células troncales hematopoyéticas (TCH). Lamentablemente no se consigue localizar un donador compatible para todos los pacientes, por lo que se ha optado por el uso de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical (SCU), sin embargo el número de ellas presente en esta fuente no es el adecuado para el trasplante en adultos, por lo que es necesario su expansión *in vitro* utilizando capas alimentadoras de MSCs provenientes de MO. De hecho, estas células se han aplicado en protocolos clínicos de TCH, para la recuperación rápida de los niveles hematopoyéticos posterior al TCH, debido a su capacidad de soporte hematopoyético. No obstante, la obtención de MO es invasiva para el donador, por lo que se han buscado fuentes alternativas de MSCs para su uso en la terapia celular.

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs provenientes de fuentes alternativas a la MO como gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD). Con este fin, se determinó la capacidad de estas células para favorecer la expansión de células progenitoras hematopoyéticas (HPCs, por sus siglas en inglés *Hematopoietic Progenitor Cells*) de SCU. Se obtuvieron MSCs de tejidos dentales mediante digestión enzimática o cultivo por explante. Las MSCs se expandieron para determinar su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación. Se evaluó su capacidad de soporte hematopoyético en co-cultivos con células de SCU enriquecidas en el inmunofenotipo CD34+CD38-Lin- en ausencia o presencia de citocinas durante 14 días. Al término, se evaluó la proliferación de células hematopoyéticas. La expansión de HPCs se determinó mediante el incremento en células formadoras de colonias (CFCs), células con inmunofenotipo CD34+CD38- y células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC).

Las MSCs de tejidos dentales mostraron morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica similar a MO, sin embargo, se observó una capacidad de diferenciación adipogénica disminuida en comparación con MO. Además, se observó en los co-cultivos que las MSCs de tejidos dentales incrementaron la proliferación de células hematopoyéticas, así como la expansión de CFC de forma similar a MO. Aunado a ello, se observó que MSCs de tejidos dentales incrementaron la expansión de células con inmunofenotipo CD34+CD38- y LTC-IC de forma comparable a MO. Estos resultados indican que las MSCs de tejidos dentales pueden ser una fuente apropiada para la obtención de dichas células como alternativa a MO y además, podrían ser usadas para la expansión de HPCs de SCU en sistemas *in vitro* e incluso a futuro para su uso en protocolos de aplicación clínica para el TCH.

## 2. ABSTRACT

Hematopoiesis is a process leading to the continuous production of all types of mature blood cells, which take place in the bone marrow (BM). This process is regulated by stromal cells and mainly by mesenchymal stem cells (MSCs). Hematologic disorders occur when this regulation is lost and some of them can be treated with hematopoietic stem cell transplant (HSCT) for curative purposes. When patients are not compatible with donors, hematopoietic cells from umbilical cord blood (UCB) could be used; however, the number of such cells for treatment of adult patients is not adequate. In this case, *in vitro* expansion of hematopoietic cells using BM-derived MSC as feeder layers is mandatory. Additionally, BM-MSCs have been used successfully for better hematopoietic recovery in HSCT. Nevertheless, obtaining MSCs from BM is an invasive process for donors, because of that, alternative MSCs sources have been used in an investigative way for their application in cell therapy.

The aim of this study was to determine the hematopoietic support capacity of MSCs derived from gingiva (G), periodontal ligament (PDL) and dental pulp (DP) for the expansion of hematopoietic progenitor cells (HPCs) from UCB. For this purpose, we have obtained MSCs from dental tissues by enzymatic digestion or explant cultures. MSCs were expanded for morphological and immunophenotypic analysis and to evaluate differentiation and hematopoietic support capacities. To evaluate hematopoietic support capacity, an enriched CD34+CD38-Lin- subpopulation from UCB cells was co-cultured over feeder layers of MSCs from the mentioned sources. After 14 days of culture in presence or absence of cytokines, proliferation and expansion of early and late hematopoietic progenitors was quantified.

MSCs derived from dental tissues displayed morphology and immunophenotype similar to that of BM-MSCs. In all cases, MSCs showed osteogenic and chondrogenic differentiation; however, adipogenic potential was low in MSCs from dental tissues. MSCs from the four sources have similar capacities to increase proliferation and expansion of HPCs in terms of colony forming cells (CFC; late progenitors), CD34+CD38-Lin- cells and long term culture initiated cells (LTC-IC; early progenitors). Our results indicate that dental tissues may prove to be an appropriate source for obtaining MSCs as alternative to BM and may be used for *in vitro* systems designed for the expansion of HPCs from UCB or in clinical application for hematopoietic recovery in HSCT.



## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1 La Médula Ósea

La médula ósea (MO) se localiza dentro de las cavidades de los huesos largos y planos, representa el 5% del peso total de los individuos y es el órgano encargado de la hematopoyesis (Gartner y Hiatt, 1997), proceso dinámico que involucra la autorenovación de la célula troncal hematopoyética (HSCs, por sus siglas en inglés: *hematopoietic stem cells*), la generación de células maduras y su movilización al torrente sanguíneo (Weissman, 2000), las cuáles se encargan de realizar funciones indispensables para la supervivencia como el transporte de gases, la coagulación y la respuesta inmune.

La MO está formada por islas de tejido hematopoyético y células adiposas rodeadas de sinusoides intercalados dentro de una malla de hueso trabecular. La superficie interna de las cavidades de los huesos y la superficie externa de las espículas de hueso esponjoso dentro de las cavidades, están recubiertas de una capa de tejido reticular conjuntivo (osteoblastos y osteoclastos). Los huesos son alimentados por una o más arterias y al disminuir de calibre, los capilares se anastomosan formando sinusoides compuestos de una sola capa de células endoteliales con una membrana basal discontinua, sin embargo, a pesar de estar muy vascularizado, no presenta drenaje linfático. Además la MO se encuentra inervada tanto por nervios mielinizados como no mielinizados (Travlos, 2006).

Histológicamente, la MO está constituida por dos zonas principales: el estroma mieloide y el parénquima mieloide. El primero es la zona estructural que brinda sostén y apoyo al parénquima alrededor de la MO. El segundo es la región compuesta por las propias células que dan origen al tejido hematopoyético (Travlos, 2006). Por lo tanto, en la MO existen dos sistemas celulares: el hematopoyético, constituido por las células hematopoyéticas en formación y el estromal, constituido por células formadoras del estroma medular que regulan la localización y fisiología de las células hematopoyéticas.

### **3.1.1 Sistema hematopoyético**

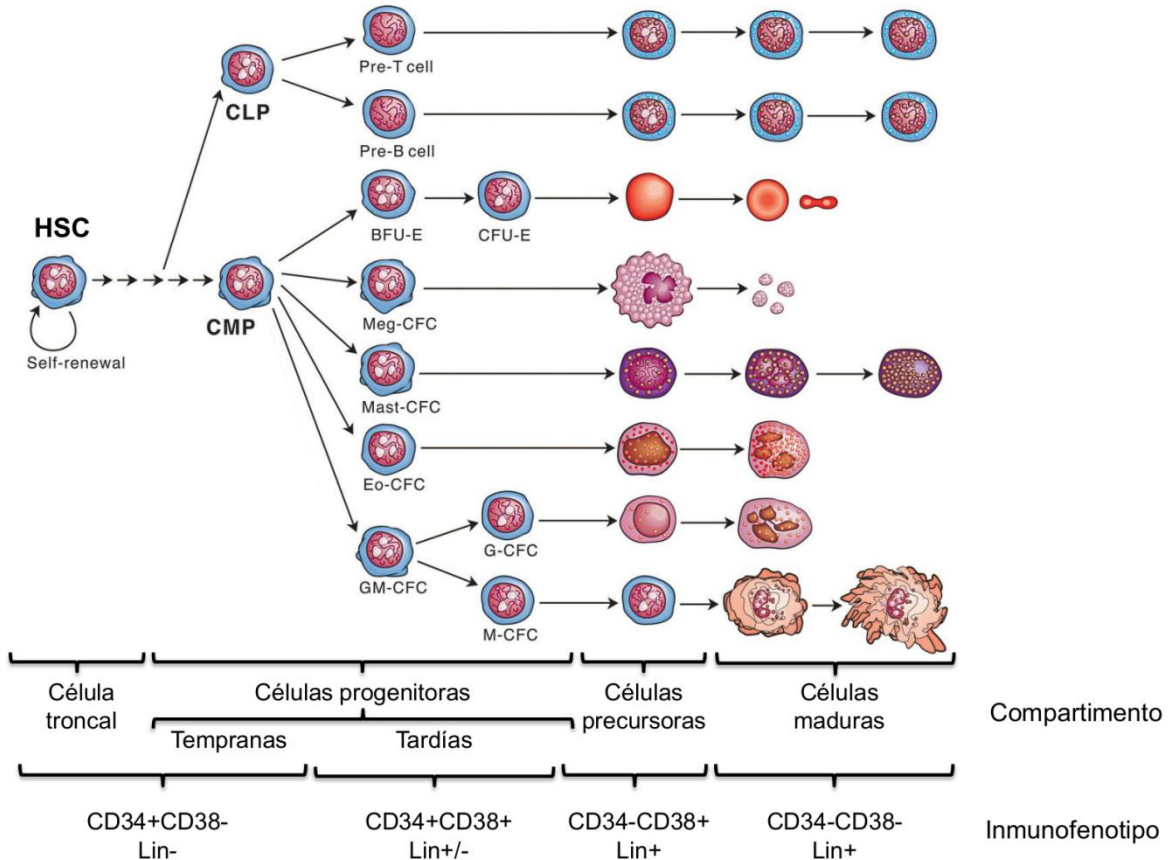
Está compuesto por las células pertenecientes al linaje hematopoyético y se encuentra dividido jerárquicamente en cuatro compartimentos dependiendo del grado de madurez de las células y del tipo de linaje que éstas generan (Mayani *et al.*, 2007). Dichos compartimentos se esquematizan en la figura 1.

El primer compartimento lo conforman las HSCs. Estas células poseen la capacidad de autorenovarse (generar al menos una célula con las mismas características que su predecesora) y son multipotenciales (pueden generar a más de un tipo de célula dentro de un mismo linaje). Las HSCs son las de mayor jerarquía y pueden dar lugar a progenitores tanto del linaje linfoide como del mieloide. Aunque morfológicamente no se diferencian de un linfocito, éstas expresan marcadores característicos como CD34, CD117, CD49F, CD90, CD133 y carecen de la expresión de marcadores específicos de linaje (Wognum *et al.*, 2003). Además, dichas células tienen la capacidad de reconstituir la hematopoyesis completa en un ratón SCID. Dependiendo del tiempo de reconstitución, se han identificado tres subpoblaciones de HSCs: HSCs de corto plazo, si la reconstitución es menor a 6 meses y no son capaces de reconstituir a un segundo ratón; HSCs de mediano plazo, si la reconstitución es mayor a 6 meses pero menor a 12 meses y reconstituyen a corto plazo en un segundo recipiente; y HSCs de largo plazo si la reconstitución es mayor a 12 meses y reconstituyen a largo plazo a un segundo trasplante (Ema *et al.*, 2013).

El siguiente compartimento lo conforman las células progenitoras hematopoyéticas (HPCs por sus siglas en inglés: *hematopoietic progenitor cells*), las cuales han perdido la capacidad de autorenovación y de recapitular la hematopoyesis en modelos murinos. Pueden ser multipotenciales, bipotenciales o monopotenciales, pero al igual que las HSCs, aún no poseen una morfología característica, por lo cual, aquello que las distingue del compartimento anterior es que aunque conservan el marcador CD34, pierden los marcadores de troncalidad (CD117, CD49F, CD90 y CD133) y empiezan a expresar CD38 y marcadores de linaje (Kondo *et al.*, 2003).

El tercer compartimento lo comprenden las células precursoras, las cuales ya están comprometidas hacia un linaje en particular. Estas células ahora poseen una morfología distintiva y ya no expresan CD34, todavía expresan CD38 y los marcadores del linaje al cual se están diferenciando (Pelayo y Vadillo, 2011).

El cuarto compartimento pertenece al de las células maduras y en éste las células ya se encuentran en circulación, poseen una morfología y expresión de marcadores particulares del linaje al que pertenecen (Mayani *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Sistema hematopoyético. Se observan los distintos compartimentos del sistema hematopoyético conforme a su jerarquía, potencial de diferenciación y compromiso hacia un linaje en particular (de izquierda a derecha). Siendo la HSC la célula de mayor jerarquía, mayor potencial de diferenciación y la más inmadura, siguiendo las células progenitoras, las células precursoras y las células maduras. Así mismo se observa el inmunofenotipo general de cada uno de los compartimentos. Imagen obtenida de: [http://hemo-blog.blogspot.mx/2010\\_04\\_01\\_archive.html](http://hemo-blog.blogspot.mx/2010_04_01_archive.html).

### **3.1.2 Sistema estromal**

A este sistema pertenecen todas aquellas células que ayudan a soportar la hematopoyesis. Esto quiere decir, aquellas células que le brindan a las células hematopoyéticas (HCs por sus siglas en inglés: *hematopoietic cells*) en diferenciación, todas las señales necesarias para que la hematopoyesis ocurra. Las células que llevan a cabo esta importante tarea son: las células endoteliales, las células reticulares, los osteoblastos, los osteoclastos, los adipocitos, las células nerviosas, los macrófagos y la célula troncal mesenquimal (MSCs, por sus siglas en inglés: *mesenchymal stem cells*).

**Células reticulares:** son las células estromales más abundantes de la MO. Estas células producen moléculas de matriz extracelular como vimentina, fibronectina, colágenas tipo I, III y IV, heparán sulfato y ácido hialurónico que interactúan con las moléculas de superficie de las HCs estimulando la expresión de moléculas de adhesión. Además, las células reticulares liberan citocinas como IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11 GM-CSF, M-CSF, SCF e

IFN- $\beta$ . También producen quimiocinas como SDF-1 que regula la migración de células CD34+, inhibe la transición de fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de las mismas y suprime la apoptosis. En conjunto, todas estas moléculas actúan sobre receptores de las HCs desencadenando cascadas de señalización que regulan la expresión diferencial de genes reguladores de la autorenovación, maduración, proliferación, supervivencia, diferenciación y migración (Mayani *et al.*, 2007).

**Macrófagos:** son las segundas más abundantes del estroma de la MO y se encuentran ampliamente distribuidas. Los macrófagos regulan la hematopoyesis mediante la expresión de citocinas como GM-CSF, M-CSF e interleucinas IL-1, IL-3, IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  (Taichman *et al.*, 1996). Asimismo, ayudan al mantenimiento del nicho endosteal y la permanencia de la HSC en el mismo (Winkler *et al.*, 2010).

**Osteoblastos:** estas células producen citocinas que inducen la proliferación, el mantenimiento y la activación de las HSCs y HPCs como GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6, LIF, PTH, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  y TNF $\beta$  (Taichman y Emerson, 1998). También, se ha documentado que mantienen la proliferación de células CD34+ y producen factores como SDF-1 y Ang-1 que permiten a las HSCs dirigirse hacia la MO. Además, regulan la reabsorción de hueso induciendo la expansión, maduración y activación de osteoclastos (Mayani *et al.*, 2007).

**Células endoteliales:** son necesarias para el tráfico de la MO al torrente sanguíneo. Además secretan factores importantes para el mantenimiento de la HSCs como el ligando de c-kit y expresan la molécula de adhesión E-selectina que promueve proliferación de la HSCs (Calvi y Link, 2014).

**Células nerviosas:** coordinan los ciclos circadianos de las HSCs e intervienen en la movilización de éstas en respuesta G-SCF (Frisch *et al.*, 2008). Las células de Schwann son la principal fuente de TGF $\beta$  activa en la MO, la cual es esencial para el estado de inactividad de las HSCs (Yamazaki *et al.*, 2011).

**Adipocitos:** se ha propuesto que estas células tienen un efecto inhibitorio de la hematopoyesis, ello debido a que se ha observado que dicho proceso disminuye con la edad mientras que el número de adipocitos se incrementa (Deans y Moseley, 2000). Sin embargo, aunque menos que otras células del estroma, también contribuyen a la hematopoyesis produciendo citocinas como IL-6, IL-8 y leptina que son importantes para la proliferación y diferenciación. Además, los adipocitos secretan adiponectina la cual influye en la proliferación y el mantenimiento de las HSCs (DiMascio *et al.*, 2007).

**Osteoclastos:** contribuyen a la hematopoyesis a través de la degradación de la matriz ósea que resulta en la liberación de iones de calcio y citocinas como TGF $\beta$  que regulan la función de las HSCs. Además inducen la movilización de las HSCs vía G-CSF (Calvi *et al.*, 2014).

**MSCs:** son aquellas que dan origen al componente mesenquimal de las células del estroma. Pero además de mantener la población estromal, las MSCs son capaces de contribuir al microambiente hematopoyético, ya que señalizan por medio de contacto celular: ICAM 1 y 2, VCAM-1 L- selectina e integrinas; mediante la liberación de citocinas: IL-6, IL-11, M-CSF, SCF, FLT3-L TPO, VEGF y FGF y la producción de moléculas de matriz extracelular: colágenas I, III, IV y VI, laminina, trombospondina y fibronectina (Flores-Figueroa *et al.*, 2006; Minguell *et al.*, 2001).

### 3.2 Nicho hematopoyético

Los sitios especializados donde residen las HSCs se denominan nichos. El nicho es un sitio anatómicamente definido compuesto de moléculas de matriz específicas, células que lo sintetizan y enriquecido en señales de crecimiento que influyen el destino de las HSCs (Greco y Guo, 2010). Este microambiente especializado controla el estado de reposo, activación, autorenovación y diferenciación de las HSCs.

El nicho de las HSCs, lo comprenden zonas trabeculares altamente vascularizadas que le proveen el complejo ambiente molecular y celular necesario para el mantenimiento de las HSCs. Entre los osteoblastos de las trabéculas y las células endoteliales de los vasos existe una zona que contiene un cúmulo de HSCs llamado hemofera (Ugarte y Forsberg, 2013).

Así, las HSCs se encuentra en íntimo contacto con: osteoblastos que además de los factores solubles ya mencionados, expresan Jagged, el ligando del receptor de Notch en las HSCs, importante para la autorenovación y la diferenciación; osteoblastos inmaduros N-caderina+ (SNO por sus siglas en inglés: *Spindle-shaped N-cadherin osteoblasts*) que proveen anclaje a las HSCs a la zona endosteal; células endoteliales que poseen numerosas moléculas de adhesión que facilitan el tráfico y mantenimiento de las HSCs; las células perivasculares nestina+ que expresan genes de mantenimiento para HSCs; las células abundantes en CXCL-12 (CAR por sus siglas en inglés: *CXCL-12 abundant reticular cells*) que interactúan con el receptor de quimiocina 4 (CXCR4) de las HSCs manteniéndola en estado de reposo y reteniéndolas dentro de la MO; células perivasculares leptina+ que expresan altos niveles de CXCL12, fosfatasa alcalina y PDGFRA importantes para el mantenimiento del fenotipo troncal; células de Schwann productoras de TGF- $\beta$ , importante para la inactividad de las HSCs (Frisch 2008; Sottocornola 2011; Lilli *et al.*, 2011; Ugarte y Forsberg, 2013; Calvi y Link, 2014).

Además del íntimo contacto entre las HSCs y las células del nicho, existen factores solubles como SCF, TPO y SDF-1, de los cuales se ha evidenciado su importancia *in vitro* ya que evaluarlos *in vivo* no ha sido posible; sin embargo se ha propuesto que existe un gradiente de ciertos factores en el nicho producidos por las células del mismo (Heyworth *et al.*, 1997).

### **3.3 MSCs: participación en el nicho hematopoyético**

Las MSCs son una población de células caracterizadas *in vitro* por ser células adherentes al plástico, de morfología fibroblastoide y alta capacidad proliferativa, con expresión de marcadores de superficie CD105, CD90, CD73 y ausencia de marcadores de linaje hematopoyético. Además poseen capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica *in vitro* (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006).

Las MSCs son indispensables no sólo para el microambiente hematopoyético sino para el nicho de las HSCs, pues se ha mostrado que la mayoría de las HSCs se encuentran adyacentes a estas células y que la eliminación de estas células disminuye la población de HSCs hasta un 50% (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). Es por ello que las MSCs tienen un papel crucial dentro del nicho hematopoyético pues las células CAR, células nestina+ y las células perivasculares leptina+ (que son subpoblaciones de MSCs) contribuyen al mantenimiento, supervivencia y quiescencia de las HSCs. Además, las MSCs son las responsables del ensamblado y reorganización del nicho hematopoyético dentro de la cavidad de la MO (Agas *et al.*, 2015).

Sin embargo, cuando se presenta una alteración en la hematopoyesis puede conllevar al desarrollo de enfermedades hematológicas como la leucemia, en donde se presentan alteraciones en las células sanguíneas dando por resultado un estado patológico severo a nivel sistémico (Frisch *et al.*, 2008; Tieu *et al.*, 2012).

### **3.4 Transplante de células progenitoras hematopoyéticas**

El trasplante de células hematopoyéticas (TCH) es el tratamiento con fines curativos para la mayoría de las enfermedades hematológicas. Existen tres distintos tipos de fuentes para la obtención de HPCs que se utilizan para el TCH: MO, sangre periférica movilizada (SPM) y sangre de cordón umbilical (SCU) (Gunsilius *et al.*, 2001). Sin embargo, en muchos casos este procedimiento no es exitoso debido a problemas como la recuperación hematopoyética lenta de los pacientes trasplantados, lo cual propicia la manifestación de infecciones oportunistas que en la mayoría de los casos son letales (Oliveros *et al.*, 2003). Además, una buena parte de los pacientes no cuentan con un donador compatible, por lo que en estos casos se opta por el trasplante de unidades de SCU, las cuales presentan una menor tasa de enfermedad de injerto contra hospedero (EICH) en comparación con las otras fuentes (Cohen y Nagler, 2004). No obstante, el número de células obtenidas por unidad de SCU no es suficiente para satisfacer las necesidades de los pacientes adultos (Kekre *et al.*, 2014). Es por ello que se han buscado diferentes estrategias para expandir HPCs de SCU.

### **3.5 Proliferación y expansión de HPCs *in vitro***

Se le denomina proliferación al aumento en el número total de células a partir de una población inicial. Sin embargo, dicho término no toma en cuenta las características de la población final, lo cual en materia de cultivo *ex vivo* de HPCs es de vital importancia, ya que la proliferación de una población celular podría llevar a la reducción de las fracciones más primitivas (HPCs y HSCs) cuando, por el contrario, lo que se pretende para el TCH de SCU es incrementar dichas poblaciones. Es por ello que en base a la proliferación pero tomando en cuenta a la población primitiva de HSCs/HPCs, se han elaborado nuevos términos para precisar el fenómeno con fundamento en el número inicial de HSCs/HPCs y el final de las mismas. Así, si después del cultivo se obtiene un menor número de HSCs/HPCs que al principio se le considera un pérdida, mientras que si la cantidad de HSCs/HPCs es la misma al inicio que al final se le designa mantenimiento, en tanto que si la porción de HSCs/HPCs se incrementa con respecto a la inicial se le denomina expansión (Flores-Guzmán *et al.*, 2002).

Debido al importante papel de las MSCs en el microambiente de las células hematopoyéticas, diversos estudios han analizado la capacidad de las MSCs de MO de expandir HPCs (Robinson *et al.*, 2006). En dichos estudios demuestran que el uso de MSCs como capa alimentadora aumenta el número de células nucleadas totales, el número de células formadoras de colonias (CFC) y el número de células CD34+ en contraste al control sin MSCs (Flores-Guzmán *et al.*, 2009). También, se ha demostrado que las MSCs poseen la capacidad de incrementar el injerto de HSCs humanas en ratones inmunodeficientes letalmente irradiados (Fei *et al.*, 2007; Wallenda *et al.*, 2011).

Además de evaluar el éxito de las MSCs expandidas de incrementar el injerto de HPCs de SCU *ex vivo*, se ha estimado la capacidad de las MSCs de mejorar el injerto de HSCs mediante co-infusión de ambas poblaciones celulares. En esos trabajos se observó que al infundir en conjunto MSCs con HPCs a ratones NOD/SCID, se incrementaba el injerto en comparación a aquellos en los que sólo se infundían HPCs (Angelopoulou *et al.*, 2003; Maitra *et al.*, 2004; Delalat *et al.*, 2009).

### **3.6 Participación de MSCs en la recuperación temprana de pacientes**

En los últimos años, se han realizado estudios clínicos evaluando la seguridad y efectividad del empleo de MSCs de MO en co-infusión con HPCs de diversas fuentes para la recuperación más rápida de los pacientes así como la disminución de la severidad de la EICH. Dichos trabajos se resumen en la tabla 1.

| Padecimiento                             | Fuente de HSCs/ HPCs (CD34 <sup>+</sup> , x10 <sup>6</sup> /kg) | Fuente de MCSs y tiempo de administración   | Recuperación de neutrófilos y plaquetas promedio en días                            | Observaciones  | Referencia                             |
|--|---|---|---|--|--|
| Enfermedades hematológicas               | Alogénica MO o SPM  | MO alogénica 4 h pre-TCH                    | 14 (11–26)<br>y<br>20 (15–36)   | Rápida recuperación hematopoyética, pero sin diferencia en el injerto comparado con el control   | (Lazarus <i>et al.</i> , 2005)         |
| Enfermedades hematológicas               | Alogénica MO (2.65–3.39), SPM (7.2–68.9) o SCU (0.21)           | MO alogénica 0–4 h post-TCH                 | 12 (10–28)<br>y<br>12 (8–36)  | Rápido injerto y 100% de quimerismo, incluyendo pacientes con falla en el primer trasplante  | (Le Blanc <i>et al.</i> , 2007)        |
| Inmuno-deficiencia                       | Alogénica SPM 21.5 (11.6–38.6)                                  | MO alogénica 4 h pre-TCH                    | 12 (10–17) vs. 13 <sup>a</sup> (9–28)<br>y<br>10 (9–18) vs. 13 <sup>a</sup> (9–100) | Éxito en el 100% of pacientes trasplantados con rápida reconstitución hematopoyética comparada con los controles históricos (15% de falla en trasplante) | (Ball <i>et al.</i> , 2007)            |
| Enfermedades hematológicas               | Alogénica MO 4.27 (0.27–10.11)                                  | MO alogénica 4 h pre-TCH                    | 16 vs. 15 <sup>a</sup><br>y<br>30 vs. 27 <sup>a</sup>                               | Recaída más elevada que en el grupo control  | (Ning <i>et al.</i> , 2008)            |
| Leucemia aguda pediátrica                | SCU   | MO alogénica Al día cero                    | 19<br>y<br>53   | Sin diferencia en el injerto comparado con los controles históricos  | (McMillan <i>et al.</i> , 2009)        |
| Deficiencia en recuperación hematológica | Alogénica SPM (2.1–5)   | MO Alogénica Post-TCH                       | 5–15<br>y<br>12–21  | 2/6 pacientes mostraron rápida recuperación hematopoyética   | (Meutemon <i>et al.</i> , 2009)        |
| Enfermedades hematológicas               | Alogénica SPM 2.61 (2.4–3.3), SCU 0.12 (0.037–0.28)             | MO alogénica Inmediatamente después del TCH | 12 (1–31) vs. 10 <sup>a</sup> (9–36)<br>y<br>44 (27–98) vs. 32 <sup>a</sup> (13–97) | Sin diferencia en injerto comparado con los controles  | (Gonzalo-Daganzo <i>et al.</i> , 2009) |
| Anemia aplásica pediátrica               | Alogénica MO (7.98) y SPM (7.25)                                | MO alogénica Pre-TCH                        | 12.3 (11–18)<br>y<br>13.8 (11–22)   | Rápida recuperación hematopoyética con sobrevivencia de todos los pacientes en un rango de 6–29 meses  | (Wang <i>et al.</i> , 2012)            |

**Tabla 1.** Trabajos más relevantes del uso de MSC de MO en estudios clínicos para la recuperación hematopoyética en enfermedades hematológicas.

Del mismo modo, se han realizado estudios que evalúen la seguridad y efectividad del empleo de unidades de SCU previamente expandidas con MSCs de MO para su uso en trasplante. En ellos, se ha observado que la expansión de unidades de SCU llevada a cabo por co-cultivo con MSCs favorece la recuperación más rápida de pacientes (de Lima *et al.*, 2012).



También se han realizado trasplantes alogénicos de MSCs de MO en pacientes que presentan falla en el injerto observando que las MSCs por sí solas pueden favorecer la recuperación de los pacientes, sin embargo este efecto es más notorio en co-trasplante con unidades de SCU (Xiong *et al.*, 2014).

Aunque el uso de las MSCs de MO para expandir las HSCs de SCU es un procedimiento exitoso representa ciertas desventajas, ya que el método de obtención de estas células es invasivo y doloroso para el donador, sin mencionar que es costoso, además de que el número y calidad de éstas disminuye con la edad del mismo (Rao y Mattson, 2001; Siegel *et al.*, 2013).

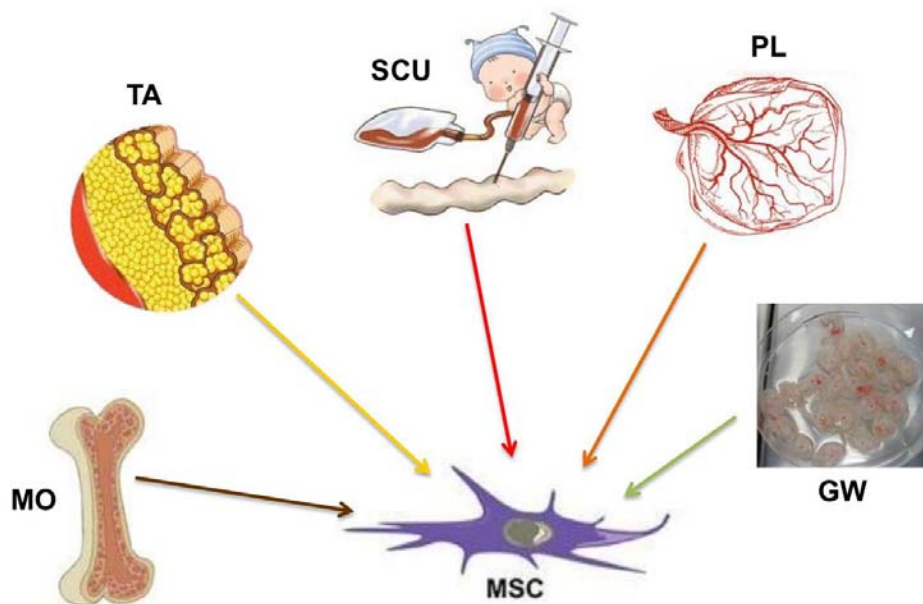
Es por ello que se ha optado por evaluar la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs de fuentes alternativas que sean de fácil acceso, más económicas de obtener y que no representen un perjuicio para el donador.

### **3.7 Fuentes alternativas de MSCs**

Además de la MO, se han hallado MSCs en muchos otros órganos e incluso se ha propuesto que residen en todos ellos (da Silva *et al.*, 2006). Así, se han caracterizado MSCs de diversas fuentes ya sea de fuentes neonatales como SCU, gelatina de Wharton (GW) y placenta; o adultas tales como tejido adiposo (TA) (Romanov *et al.*, 2003; Montesinos *et al.*, 2009; Secunda *et al.*, 2015). Las fuentes de MSCs que se han empleado para la expansión de HPSCs se esquematizan en la figura 2.

Trabajos de este tipo ya han sido realizados por nuestro grupo de investigación, utilizando como fuente de MSCs, órganos que son de desecho y que por lo tanto no representan un riesgo para el donador, como son placenta y SCU. Hemos demostrado que las MSCs de estas fuentes neonatales, poseen capacidad para incrementar la proliferación de HPCs y además expandir CFC y HPCs más primitivas con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin- y LTC-IC de manera similar a MO (Fajardo, 2012). Otros grupos de investigación han encontrado resultados similares para MSCs de SCU y placenta analizados de manera no comparativa entre ellos (Wang *et al.*, 2004; Luan *et al.*, 2012). Incluso, recientemente se han realizado estudios clínicos donde se evalúa la seguridad del uso de MSCs obtenidas de la gelatina de Wharton del cordón umbilical para protocolos de expansión de unidades de SCU en pacientes con anemia aplásica obteniéndose buenos resultados (Chao *et al.*, 2011). De igual modo se ha evaluado la efectividad de estas unidades en pacientes con leucemia. En este último estudio, se observó que en los pacientes en los que se emplearon unidades de SCU expandidas con MSCs se disminuye significativamente el tiempo de injerto y además se disminuye la manifestación de EICH e incrementa la sobrevida (Wu *et al.*, 2013).

También se ha evaluado la capacidad de soporte hematopoyético de fuentes adultas como TA (Kim *et al*, 2005). De hecho, se ha demostrado que las MSCs de TA incrementan más la proliferación de células CD34+ de SPM en comparación con MO (Nishiwaky, 2012), y que éstas son capaces de facilitar el establecimiento de las HPCs Lin- Sca+c-Kit+ (LSK) en el nicho (Nakao *et al*, 2010). No obstante, en un estudio comparativo entre MSCs de SCU, MSCs de TA y MSCs de MO se contrastó la cualidad de las distintas MSCs para expandir células CD34+ de SCU, observándose que las MSCs de TA son las que menos incrementan el índice de células CD34+ y del mismo modo, no incrementan la frecuencia de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC por sus siglas en inglés: *long term initiated cells*). Estos resultados se atribuyen a una menor expresión de moléculas de adhesión por parte de MSCs de TA (Wagner *et al*, 2007).



**Figura 2.** Fuentes de MSCs empleadas para la expansión de HPCs de SCU. Se observan las diferentes fuentes de MSCs que se han empleado en protocolos de expansión de HPCs de SCU y SPM, siendo MO la más estudiada. Modificado de: <https://neurowiki2012.wikispaces.com/Alternative+Therapies>.

### 3.8 Tejidos dentales

Otras fuentes que podrían considerarse de desecho provienen de tejidos dentales, dado que se ha reportado que más del 27% de los terceros molares no erupcionan y la mayoría de los odontólogos recomiendan retirarlos con fines preventivos así como estéticos (Friedman, 2007). La localización de los tejidos dentales principales se muestra en la figura 3, donde se ha reportado la presencia de MSCs (Laberge y Cheung, 2011).

### ***La gingiva***

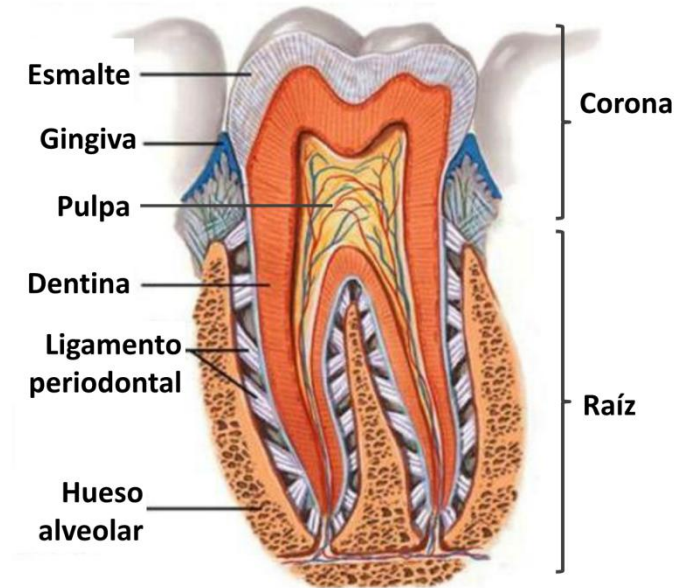
Comúnmente llamado encía, es la mucosa oral que tapiza los rebordes alveolares, rodea el cuello de los dientes y brinda protección a las estructuras de sostén. La encía consta de dos regiones principales, el epitelio y el corion. El primero es un epitelio plano estratificado paraqueratinizado, que está compuesto en su mayoría de queratinocitos, los cuales se dividen en estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo dependiendo del grado de diferenciación. Además de los queratinocitos, se encuentran en esta capa melanocitos, células de Langerhans y de Merkel, aunque en mucho menor cantidad. El segundo por su parte, está formado por tejido conjuntivo semidenso, constituido por fibras (principalmente colágena tipo I), células que la sintetizan (fibroblastos), células de defensa (cebadas y macrófagos), sustancia fundamental amorfa (glicosaminoglicanos y peptidoglicanos) y también se encuentra irrigado tanto por vasos sanguíneos como linfáticos e innervado por las ramas terminales del nervio trigémino (Gómez y Campos, 2002; Stephens y Genever, 2007).

### ***El ligamento periodontal***

Es una delgada capa de tejido conjuntivo fibroso denso que por medio de sus fibras une al diente con el hueso alveolar. Sus funciones son: mantener al diente suspendido, soportar las fuerzas de la masticación y actuar como receptor sensorial propioceptivo. Las fibras principales del ligamento periodontal (LP) se distribuyen en una orientación definida de acuerdo a las demandas funcionales en: oblicuas ascendentes, horizontales de transición, oblicuas descendentes, apicales e interradiculares. El LP también está constituido por células formadoras (fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos), resortivas (osteoclastos y cementoclastos), defensivas (macrófagos, mastocitos y eosinófilos) y MSCs que ayudan a mantener la integridad del mismo. Además, el LP está ricamente innervado e irrigado con un aporte linfático abundante (Gómez y Campos, 2002).

### ***La pulpa dental***

Está compuesta por tejido conjuntivo laxo ricamente vascularizado e innervado. Su función es inducir la síntesis y deposición del esmalte; sintetizar, nutrir y reparar la dentina; y proveer sensibilidad contra el daño. Histológicamente se distinguen 4 zonas diferentes: la odontoblástica, la subodontoblástica, la rica en células y la zona central. La primera está compuesta por odontoblastos; la segunda está dispuesta por fibroblastos subodontoblásticos y células dendríticas; la tercera se caracteriza por su alta densidad celular, predominando los fibroblastos y en esta zona se encuentran las MSCs; la cuarta es abundante en nervios y vasos, también se localizan fibroblastos, macrófagos, células dendríticas y MSCs aunque en menor proporción que la zona anterior y son de localización perivascular (Gómez y Campos, 2002).



**Figura 3.** Anatomía del diente. Se observan las estructuras principales que conforman al diente. La porción externa se le denomina corona mientras que la porción interna se le nombra raíz. La pulpa mantiene la integridad del diente en tanto que el ligamento periodontal y la gingiva fijan el diente al hueso alveolar. Imagen obtenida de: <http://soulcare.co.za/healer/index.php/unexplained-dental-pain-explained>.

### 3.9 MSCs de tejidos dentales

Los tejidos dentales son una fuente alternativa de MSCs que es de fácil acceso ya sea por su extracción con anestesia local o por reemplazo de los dientes primarios (Laberge y Cheung, 2011) que debido a su fácil obtención y mínima invasividad, pudieran ser utilizadas en trasplantes autólogos.

Trabajos previos han evidenciado la presencia de MSCs en G (Mitrano *et al.* 2010), LP (Seo *et al.* 2004) y PD (Grontos *et al.* 2000), demostrando que dichas células comparten ciertas características a las de MO, ya que las MSCs de tejidos dentales poseen una morfología, una expresión de marcadores de superficie así como capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos comparable a MO (Mitrano *et al.* 2010; Song *et al.* 2012; Poltavtseva *et al.* 2014). Además, se ha demostrado que MSC de tejidos dentales poseen una mayor capacidad de proliferación que las MSCs de MO (Huang *et al.*, 2009; Eleuterio *et al.*, 2013). No obstante, en muchos de los trabajos no se realiza una caracterización completa, pues no se evalúa la capacidad de diferenciación condrogénica y se ha evaluado un panel reducido de marcadores de inmunofenotipo y más aún, la mayoría los trabajos no realizan estudios comparativos con MSCs de MO, que son el control de referencia, dado que la mayoría de los estudios de aplicación clínica de las MSCs se han realizado con esta fuente y han dado buenos resultados.

Por otro lado, la mayoría de los trabajos están enfocados hacia la regeneración periodontal (Zhang *et al.*, 2012; Ivanovski *et al.*, 2006; Potdar y Jethmalani 2015) y la evaluación de la capacidad inmunoreguladora por parte de MSCs de tejidos dentales (Zhang *et al.*, 2009; Vasandan *et al.*, 2013; Pierdomenico *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2015). Es de notar que, aún falta por determinar si las MSCs de tejidos dentales poseen capacidad de soporte hematopoyético como las de MO.

#### 4. ANTECEDENTES

A la fecha (2016), además del presente trabajo, sólo existe un estudio que determine la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs aisladas de tejidos dentales. Recientemente, Nakatsuka y colaboradores (2015) evaluaron la facultad de MSCs aisladas de pulpa dental de ratón de soportar HSCs humanas. Para ello se seleccionó la población PDGFR $\alpha$ +Sca-1+ y se caracterizó, demostrando poseer la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación trilineaje (adipogénico, osteogénico y condrogénico) característicos. Sin embargo, al compararlos con MSCs de MO utilizando los mismos criterios de selección, observaron que las MSCs de PD poseían un mayor número de CFU-F, una mayor expresión de fosfatasa alcalina y una mayor expresión de los marcadores de superficie CD90, CD105 y PDGFR e incluso una expresión específica de CD71 y CD49f. Al contrastar entre los perfiles de expresión de genes relacionados con la hematopoyesis, las MSCs de PD fueron superiores para *Notch 1*, *2*, *3* y *Lfn3* así como *Nes*, *Angpt1*, *Jag 1* y *Cxcl12*. Sin embargo sólo las últimas dos fueron significativas estadísticamente.

Para evaluar la capacidad de soporte hematopoyético, co-cultivaron  $2 \times 10^3$  células de las fracciones CD34-Lin<sup>-</sup> o CD34+Lin<sup>-</sup> de SCU sobre MSCs ya sea de MO o de PD en presencia de las citocinas SCF, Flt3-L TPO IL-3, IL-6 y G-CSF durante 7 días. Al término del cultivo, se analizó el porcentaje de células CD34+Lin<sup>-</sup> y CD34-Lin<sup>-</sup> obteniendo mayores valores para MO que para PD. Sin embargo, al evaluar la capacidad de las células provenientes de los co-cultivos de reconstituir hematopoyéticamente a ratones letalmente irradiados 20 semanas después del trasplante, se obtuvieron resultados muy similares entre los co-cultivos de MSCs de MO y PD, tanto en la población CD34+Lin<sup>-</sup> como en la población más primitiva CD34-Lin<sup>-</sup>. Lo mismo ocurrió al medir los tipos de progenitores generados, pues no encontraron diferencias significativas entre las MSCs evaluadas.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El principal tratamiento con fines curativos para la mayoría de las enfermedades hematológicas es el TCH, sin embargo no todos los pacientes encuentran un donador compatible, por lo que su única opción es el uso de unidades de SCU. Debido a que el número de HPCs presente en estas unidades no es el adecuado para el trasplante en adultos, es necesaria su expansión *in vitro* y para ello se han utilizado capas alimentadoras de MSCs provenientes de MO. Aunque las MSCs de esta fuente se han aplicado en protocolos clínicos de TCH para la recuperación rápida de los niveles hematopoyéticos posterior al trasplante, la obtención de MO es invasiva para el donador, por lo que se han buscado fuentes alternativas a ésta para su uso en la terapia.

Una fuente promisoriosa de MSCs son los tejidos dentales, ya que estos representan una fuente rica en tales células y su obtención es de muy baja invasividad pues no requiere hospitalización, además dicha fuente podría utilizarse para trasplantes autólogos. A la fecha, no existen trabajos que evalúen la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs de tejidos dentales humanos, por lo que es necesario determinar si dichas células poseen esta capacidad. En este estudio se determinó la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs de G, LP y PD para la expansión de HPCs de SCU.

## **6. HIPÓTESIS**

Las MSCs provenientes de diferentes tejidos dentales poseen una capacidad similar de soporte hematopoyético *in vitro* que las provenientes de MO.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 General**

Determinar la capacidad de las células troncales mesenquimales (MSCs) provenientes de tejidos dentales, para mantener la formación de células hematopoyéticas a partir de células progenitoras hematopoyéticas de SCU.

### **7.2 Particulares**

Obtención y caracterización de MSCs provenientes de gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD).

Determinar la capacidad de las MSCs provenientes de MO, G, LP y PD para mantener la proliferación de células hematopoyéticas, a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.

Determinar la capacidad de las MSCs provenientes de MO, G, LP y PD para mantener la formación de CFC, a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.

Determinar la capacidad de las MSCs provenientes de MO, G, LP y PD para mantener la formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-, a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.

Determinar la capacidad de las MSCs provenientes de MO, G, LP y PD para mantener la formación de LTC-IC, a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.

## **8. METODOLOGÍA**

### **8.1 Obtención de muestras**

#### **8.1.1 Selección de pacientes**

##### *MO*

Se obtuvieron muestras de sujetos sanos de entre 11-60 años, en el Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional SXXI, IMSS. Todos ellos fueron donadores de transplante alogénico de MO y aceptaron ser incluidos en el estudio mediante firma del consentimiento informado.

##### *Tejidos dentales*

Se reclutaron pacientes de ambos sexos de entre 16 y 30 años de edad que acudían a la Clínica de Cirugía Maxilofacial y a la Clínica de Ortodoncia de la División de Estudios de Postgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología de la UNAM que requirieran la extracción de terceros molares superiores e inferiores por cuestiones maxilofaciales y/o extracción de primeros premolares superiores e inferiores por cuestiones de tratamientos de ortodoncia. Los pacientes fueron informados del estudio para su consentimiento y donación de los órganos dentarios extraídos. Para la inclusión de los órganos dentarios en el estudio, estos debían de estar sanos, sin enfermedad periodontal, sin caries ni fracturas.

##### *SCU*

Las muestras de SCU procedieron de donadoras sanas de 15-35 años con más de 39 semanas de gestación, que no presentaran co-morbilidades y que el producto presentara un examen APGAR superior a 8. Las pacientes fueron atendidas en el Hospital General de Zona 2A “Troncoso” o en el Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 del Centro Médico Nacional La Raza.

#### **8.1.2 Obtención de los tejidos**

##### *MO*

Se obtuvieron las muestras de MO mediante aspirado de cresta iliaca postero-superior con previa anestesia local.



## ***Dentales***

El órgano dentario extraído se colocó inmediatamente en 25 mL de medio alfa-MEM frío con antibióticos: penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml) y 5% de SFB (Gibco, USA) para su traslado al laboratorio y así garantizar el estado celular del tejido dental.

Posteriormente, se procedió a obtener la encía, el LP y la PD bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. La gingiva adherida al órgano dentario se retiró de la parte superior o la corona del diente mediante el uso de un bisturí No 5. Del mismo modo, se removió el LP del tercio medio hacia el ápice de la raíz. La PD se aisló mediante la fractura de la corona sin dañar el tejido pulpar, extrayéndolo a través de una lima de endodoncia.

## ***SCU***

La sangre presente en el cordón umbilical fue drenada mediante punción de la vena umbilical a una bolsa con anticoagulante, la cual fue almacenada a 4 °C durante 12-24 h hasta su empleo.

## **8.2 Obtención de MSCs**

### **8.2.1 MO**

El aspirado de MO fue diluido 1:1 con buffer de fosfatos (PBS Ph 7.4, Gibco, USA), vertido sobre 15ml de Ficol y centrifugado durante 30 min a 1,500 rpm. Posteriormente, se obtuvo la fase correspondiente a células mono-nucleares (CMNs). Se lavó con 10ml de solución salina, se centrifugó a 1,200 rpm 6 min y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio DMEM-Ig (HyClone, USA) 10% SFB (Gibco, USA) y se colocaron en caja petri 100 mm (Corning, USA). Cuatro días después se eliminó la fracción no adherente, se realizó un lavado suave con solución salina y se agregó medio fresco.

### **8.2.2 Tejidos dentales**

Posterior a su extracción, todos los tejidos fueron colocados por separado en una caja Petri 100 mm (Corning, USA) con medio alfa-MEM (Gibco, USA) al 5% de SFB con antibiótico-antimicótico (Gibco, USA) para su disgregación mecánica con bisturí.

Para llevar a cabo el aislamiento de las líneas celulares correspondientes a G, LP y PD; se realizaron dos estrategias diferentes. Una técnica de explantes, la cual inmediatamente de la disgregación mecánica con el bisturí, los trozos de tejido fueron aislados en cajas de cultivo de 6 pozos tratados para adhesión celular (Corning, USA), adicionando 1 ml de medio de cultivo alfa-MEM (Gibco, USA) 5% SFB (Gibco, USA) e incubados de 2 a 5 semanas, monitoreando el crecimiento celular y cambiando el medio de cultivo cada tercer día.

La segunda estrategia fue mediante digestión enzimática, en la cual, cada tejido dental extraído fue sometido a 1 ml de colagenasa (Gibco, USA) durante 3 minutos a 37°C seguida de una centrifugación a 5,000 rpm por 5 min. El tejido obtenido fue disgregado de nueva cuenta con bistrú y se sembró en cajas de cultivo de 6 pozos (Corning, USA) con 1ml de medio de cultivo alfa-MEM (Gibco, USA) al 5% SFB (Gibco, USA), monitoreando el crecimiento celular por 2 a 5 semanas. Posterior a las 5 semanas de cultivo, las células fueron cosechadas mediante el uso de Tripsina (Gibco, USA) y se resembraron a una caja de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> hasta alcanzar confluencia de 80% para su subsiguiente expansión y criopreservación. Las técnicas empleadas en la obtención de estas células fueron semejantes a las ya reportadas (Suchánek *et al.* 2007; Mitrano *et al.* 2010; Tran *et al.* 2014).

Para la caracterización y la evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético se emplearon MSCs de las diversas fuentes en los pasajes (resiembras) 3-5.

## **8.3 Caracterización**

### **8.3.1 Morfología**

Se estableció mediante observación al microscopio óptico invertido de los cultivos celulares.

### **8.3.2 Inmunofenotipo**

1.2 x10<sup>6</sup> células fueron lavadas con solución salina y bloqueadas durante 20 minutos con 300 µl SFB (Gibco, USA). Posteriormente, se lavaron con 2 ml de solución salina (PiSA, México) 1 mM EDTA (Sigma, USA) 3% de SFB (Gibco, USA) y se resuspendieron en 1.1 ml del mismo. Después se colocaron 1x10<sup>5</sup> células/anticuerpo en tubos para citometría (BD Falcon, USA) y se les añadió 1 µl de uno de los anticuerpos enlistados a continuación: anti-CD105-PE, anti-CD90-APC, anti-CD73-PE, anti-CD45-PE, anti-CD34-APC, anti-CD14-PE, anti-CD13, (BD Pharmigen, USA), anti-HLA-ABC-FITC, anti-HLA-DR-PE, anti-CD31-FITC (Invitrogen, USA); y se dejaron incubar durante 20 min a 4 °C. Luego se fijaron con solución de lisis (BD Pharmigen, USA) durante 10 min y se lavaron con solución salina (PiSA, México) 1 mM EDTA (Sigma, USA) 3% de SFB (Gibco, USA) y se almacenaron a 4 °C hasta su lectura en el citómetro de flujo FACS CantoII (BD Biosciences, USA). El análisis de citometría correspondiente se realizó utilizando el programa FlowJo 7.6.1.

### **8.3.3 Capacidad de diferenciación**

#### ***Adipogénica***

Para la diferenciación adipogénica se sembraron  $3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en cajas Petri de 35mm (Corning, USA) suspendidas en medio DMEM-Ig (HyClone, USA) 10% SFB (Gibco, USA). Al alcanzar 30% de confluencia fueron inducidas con medio adipogénico comercial StemPro (Gibco, USA) y se dejaron incubar durante 14 días efectuando dos cambios de medio por semana. Al término se realizó la tinción rojo oleoso para evidenciar la presencia de adipocitos.

#### ***Osteogénica***

Para la diferenciación osteogénica se sembraron  $4 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup> en cajas Petri de 35mm (Corning, USA) suspendidas en medio DMEM-Ig (HyClone, USA) al 10% SFB (Gibco, USA) y de 24-48 h después fueron inducidas con medio osteogénico comercial StemPro (Gibco, USA) y se dejaron incubar durante 21 días efectuando dos cambios de medio por semana. Al término se realizó la tinción para fosfatasa alcalina para evidenciar la presencia de esta enzima.

#### ***Condrogénica***

Para la diferenciación condrogénica se sembraron  $3 \times 10^5$  células en tubos de 15ml suspendidas en medio DMEM-Ig (HyClone, USA) 10% SFB (Gibco, USA) y fueron centrifugadas a 900 rpm y resuspendidas en medio condrogénico comercial (Metrix) adicionado con 10 µl de TGF-β (Preprotech, USA) y se dejaron incubar durante 28 días efectuando dos cambios de medio por semana. Al término, las micromasas fueron fijadas, deshidratadas, incluidas en parafina y cortadas a 4 µm en micrótopo. Posteriormente se realizó la tinción azul alciano para evidenciar la presencia de glicosaminoglicanos.

## **8.4 Evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético**

### **8.4.1 Obtención de la población enriquecida en CD34+ CD38- Lin-**

Las muestras de SCU se procesaron mediante un gradiente de densidad usando Limphoprep (StemCell Technologies, USA). Posteriormente, se obtuvo la fase correspondiente a células mono-nucleares (CMNs) de la interfase. Las células se lavaron dos veces con 20 ml de solución salina (PiSA, México), mediante centrifugación a 1,200 rpm 10 min y se deshechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en RPMI (HyClone, USA) 10% SFB (Gibco, USA) suplementado con 10µl/ml de penicilina, estreptomina y gentamicina (Gibco, USA), se colocaron de  $2-2.5 \times 10^8$  en caja Petri 100mm (Corning, USA) y se incubaron a 37 °C, 95% humedad, 5% CO<sup>2</sup>. 24-48 h después, se cosechó la fracción no

adherente lavando la caja 2 veces con 5 ml de solución salina (PiSA, México) y centrifugando a 1,200 rpm 6 min. Se determinó el número de células nucleadas con diluyente de Turk y la viabilidad por azul de tripano (Gibco, USA).

Una vez obtenido el número de CMNs viables se procedió a realizar el enriquecimiento en CD34+CD38-Lin- mediante selección negativa usando el kit de enriquecimiento StemSep (StemCell Technologies, USA). Para ello, el botón celular fue re-suspendido en 1 ml de medio StemLine (Sigma, USA) por cada  $1 \times 10^5$  células. Se le agregó 100  $\mu$ l de suspensión de anticuerpos contra CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45ra, CD56 CD66b y glicoforina A y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, se le añadió 60  $\mu$ l de coloide magnético y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Mientras tanto, se hidrató una columna de separación con 10 ml de solución salina (PiSA, México) al 5%SFB (Gibco, USA). Una vez pasado este tiempo se dejó pasar la suspensión celular a través de la columna de separación magnética (StemCell Technologies, USA). Posterior a ello, la columna fue lavada con 10 ml de solución salina (PiSA, México) al 5%SFB (Gibco, USA). La suspensión celular fue centrifugada a 1,200 rpm y el botón celular obtenido fue resuspendido en 1ml de medio StemLine (Sigma, USA). Se determinó la viabilidad celular con azul de tripano en hemocitómetro.

#### **8.4.2 Preparación de los co-cultivos**

$15 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> de MSC de MO, G, LP o PD resuspendidas en medio DMEM-Ig al 10% SFB fueron sembradas en 4 pozos de placas de 6 pozos (Corning, USA). Al 80% de confluencia se retiró el medio y se le adicionó 1  $\mu$ g/ml de mitomicina C (Lemery, México). 20 h después se retiró el medio con mitomicina. Se realizaron dos lavados con 1 ml de solución salina (PiSA, México) y se le agregó medio fresco. Se dejó incubar a 37°C, 95% humedad, 5% CO<sub>2</sub> hasta su uso.

Una vez obtenidas las monocapas, se retiró el medio y se agregó 3ml de medio StemLine (Sigma, USA) a 2 de los 4 pozos sembrados por fuente de MSCs. Al resto se le añadió medio StemLine adicionado con 10 ng/ml de cada una de las siguientes citocinas: Ligando de Tirosina fetal 3 (Flt3-L), Factor de Célula Troncal (SCF), Interleucina 6 (IL-6) y Trombopoyetina (TPO) (Preprotech, USA). Después, se agregaron  $7-10 \times 10^3$  células enriquecidas/pozo y se dejaron incubando durante 14 días. Como controles, se adjuntaron 6 pozos extras sin MSCs, de los cuales 2 pozos contenían 3 ml de medio Stem Line y 4 pozos con el mismo medio pero adicionado con 10 ng/ml de las citocinas ya mencionadas. Las condiciones previamente mencionadas se esquematizan a continuación:

| Condiciones sin citocinas |    |   |    |    | Condiciones con citocinas |    |   |    |    |
|---------------------------|----|---|----|----|---------------------------|----|---|----|----|
| Sin MSC                   | MO | G | LP | PD | Sin MSC                   | MO | G | LP | PD |

Al día 7 se realizó un medio cambio de medio retirando la mitad del medio y añadiendo la misma cantidad de medio StemLine (Sigma, USA) fresco, adicionado o no con citocinas dependiendo de la condición.

### **8.4.3 Proliferación**

Al cumplirse los 14 días se cosechó la fracción no adherente mediante pipeteo y la adherente mediante tripzinización. Ambas fracciones se sumaron al mismo tubo, se centrifugaron a 1,200 rpm por 6 min y se resuspendieron en 0.5-2 ml de medio StemLine (Sigma, USA). Para determinar la proliferación, se realizó un conteo en hemocitómetro obteniendo la viabilidad mediante la tinción con azul tripano y el número de CMN por diluyente de Turk (Gibco, USA).

### **8.4.4 Formación de CFC**

Para establecer el número de progenitores tardíos provenientes de los co-cultivos se sembraron 2,000 células hematopoyéticas del día 14 en 600µl de medio semisólido de metilcelulosa con citocinas (StemCell Technologies, USA), se incubaron durante 14 días y se determinó el número de colonias mieloides y eritroides mediante morfología a través del microscopio óptico invertido. Se delimitó como 1 colonia aquellos grupos celulares mayores a 50 células. (Flores-Guzmán *et al.*, 2002).

### **8.4.5 Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-**

Para establecer el número de progenitores tempranos con el inmunofenotipo CD34+CD38- provenientes de los co-cultivos, las células fueron lavadas con solución salina y bloqueadas 20 min con bloqueador de receptores Fc (Biotec, USA), posteriormente se lavaron con solución salina 1 mM EDTA 3% de SFB y se resuspendieron 300 µl del mismo. Después se colocaron  $1-9 \times 10^5$  células en tubos para citometría y se les añadió 1 µl de los siguientes anticuerpos: anti-CD34-APC y anti-CD38-PE, (BD Pharmigen, USA) y se dejaron incubar durante 20 min a 4 °C. Luego se fijaron con 250 µl de solución de lisis (BD Pharmigen, USA) durante 10 min y se lavaron con solución salina 1 mM EDTA 3% de SFB y se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su lectura en el citómetro de flujo Facs cantoII (BD biosciences, USA). El análisis de citometría correspondiente se realizó utilizando el programa FlowJo 7.6.1.

### **8.4.6 Formación de LTC-IC**

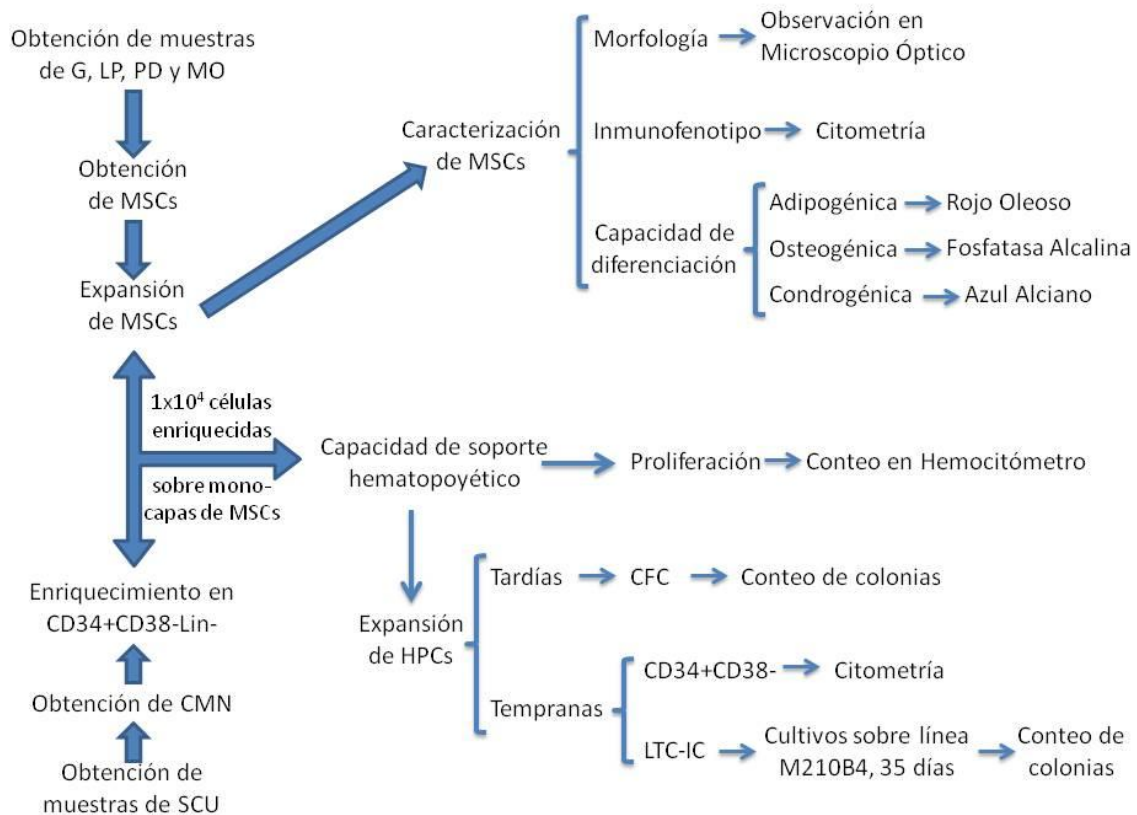
Para conocer el número de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC), 50,000 células hematopoyéticas de las diferentes condiciones obtenidas al día 14, fueron sembradas sobre una monocapa de la línea celular estromal de ratón M210B4 (ATCC, CLR-1972, USA) previamente detenidas con 2 µg/ml mitomicina (Lemery, México) para inhibir su proliferación, adicionando medio de cultivo Long Term (LTCM) y se incubaron

durante 35 días realizando  $\frac{1}{2}$  cambio de medio por semana. Al término, se recuperaron las células hematopoyéticas y 10,000 de éstas fueron sembradas en medio semisólido y se contaron las colonias mieloides y eritroides mediante morfología a través del microscopio óptico. 8 colonias corresponden a 1 LTC-IC (Flores-Guzmán *et al.*, 2009).

## 8.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en este trabajo fueron procesados usando como herramienta de análisis el programa stata9 usando la prueba t de student para el inmunofenotipo y Kruskal Wallis para el resto de las evaluaciones. Se utilizó un valor de significancia de 0.05.

## 8.6 Diagrama Metodológico



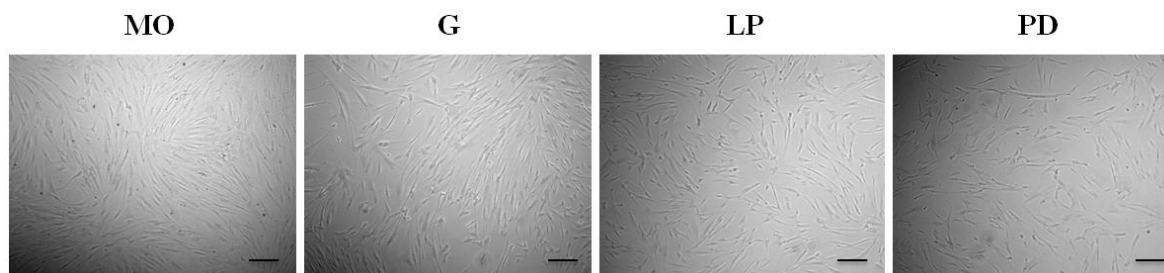
## 9. RESULTADOS

### 9.1 Caracterización

En 2006, la sociedad internacional de terapia celular (ISCT, por sus siglas en inglés, *International Society for Cellular Therapy*) publicó los criterios para definir a una población de MSCs como tal, los cuales son los siguientes: 1) deben ser células adherentes al plástico con morfología fibroblastoide; 2) deben expresar los marcadores de superficie  $\geq 95\%$  CD105, CD90 y CD73 pero no deben expresar  $\leq 2\%$  CD45, CD34, CD14 y HLA-II; 3) deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos. Por lo tanto para poder afirmar que la población a estudiar se trataba de MSCs se dispuso a evaluar su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación.

#### 9.1.1 Morfología

Para la caracterización de las MSCs, un aspecto a evaluar es la morfología fibroblastoide y para ello se analizaron bajo el microscopio óptico invertido los cultivos de MSCs de las diferentes fuentes. Como se puede apreciar en la figura 4, las MSCs de las diversas fuentes presentaron morfología fibroblastoide, cumpliendo así con el primer criterio impuesto por la ISCT.



**Figura 4.** Morfología de las MSCs de las diversas fuentes. Se aprecia la morfología fibroblastoide de los cultivos de MSCs obtenidas de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) mediante su adherencia al plástico. Imágenes capturadas a 5x mediante microscopio óptico invertido al pasaje 4. Barra = 200 $\mu$ m.

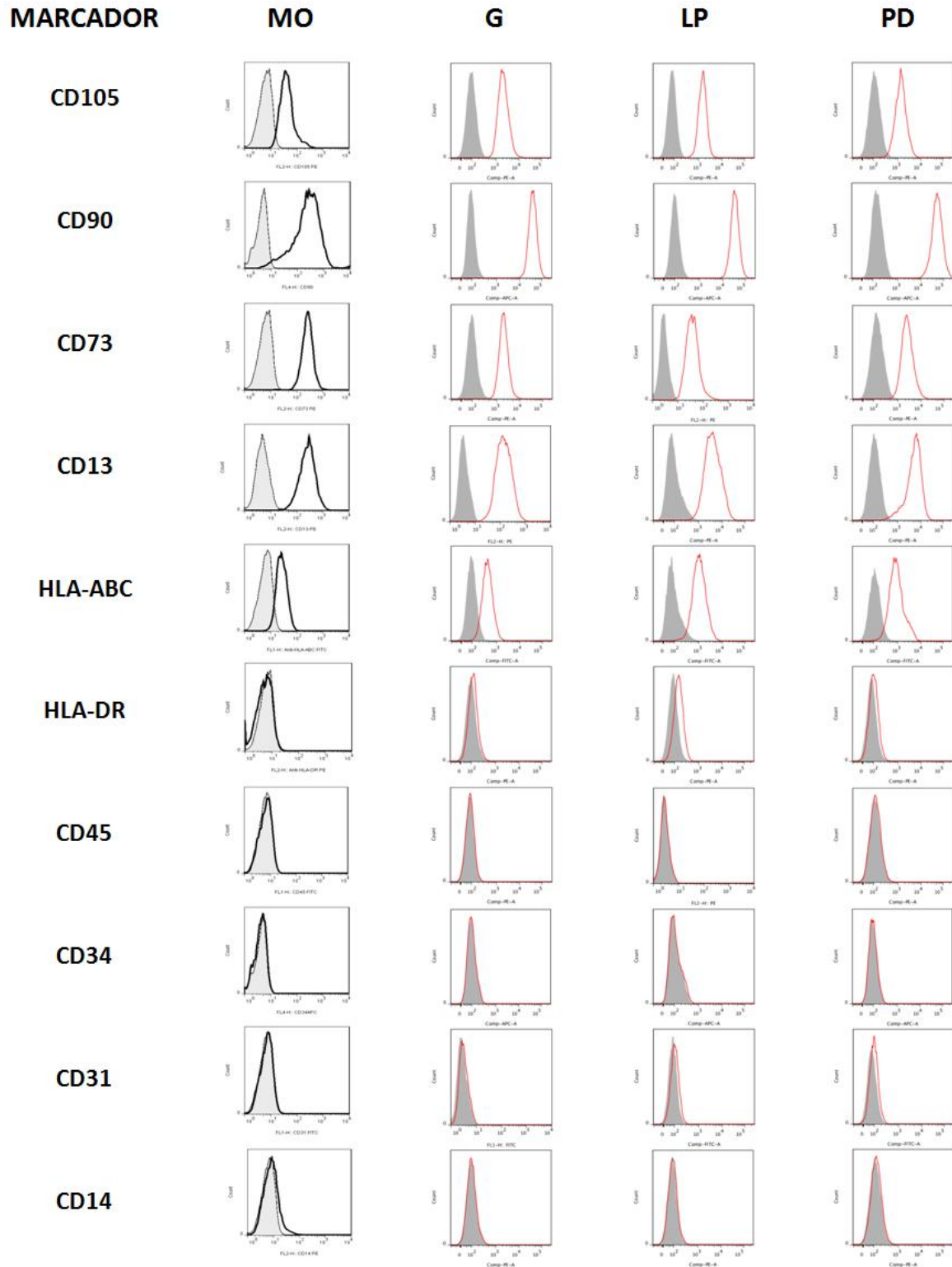
### **9.1.2 Inmunofenotipo**

Otro aspecto considerado para la caracterización de las MSCs es evaluar la expresión de marcadores de superficie, cuyos valores de expresión deben ser mayores al 95% en CD105, CD90 y CD73, pero expresar valores menores a un 2% en marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34, CD14 y HLA-II) así como endoteliales (CD31). Esto se determinó mediante la tinción de las células con anticuerpos acoplados a fluorocromos y se cuantificó por citometría de flujo. Los datos obtenidos del análisis de citometría se aprecian en la tabla 2 y la figura 5, donde se observa que las MSCs de las diferentes fuentes presentaron un inmunofenotipo similar, mostrando positividad para los marcadores CD105, CD90, CD73 y CD13 mayor al 90% en todas las fuentes, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre las mismas. Así mismo presentaron positividad mayor al 40% para el marcador HLA-ABC. Por otro lado, las MSCs de tejidos dentales fueron negativas para el marcador endotelial CD31 y HLA-DR y también para los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 de igual forma que las MSCs de MO y no se observaron diferencias significativas entre las fuentes de MSCs para estos marcadores. Estos resultados cumplen con el segundo criterio establecido por la ISCT, dado que las MSC de tejidos dentales expresaron los marcadores CD105, CD90 y CD73 mayor a un 90% y no expresaron marcadores hematopoyéticos ni endoteliales.

| Marcador | MO            | G            | LP            | PD            |
|----------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| CD 105   | 93.38 ± 8.01  | 99.86 ± 0.13 | 97.56 ± 5.34  | 94.08 ± 9.94  |
| CD 90    | 92.37 ± 14.67 | 99.9 ± 0.17  | 99.94 ± 0.13  | 99.9 ± 0.17   |
| CD 73    | 99.12 ± 0.52  | 99.94 ± 0.05 | 98.84 ± 2.26  | 98.86 ± 0.96  |
| CD 13    | 99.92 ± 0.10  | 99.94 ± 0.05 | 98.9 ± 1.82   | 97.36 ± 3.89  |
| HLA-ABC  | 51.60 ± 29.12 | 46.65±46.98  | 43.44 ± 39.46 | 46.80 ± 39.95 |
| HLA-DR   | 2.02 ± 2.42   | 1.02 ± 1.61  | 1.01 ± 1.05   | 0.43 ± 0.47   |
| CD 45    | 0.44 ± 0.23   | 0.12 ± 0.11  | 0.31 ± 0.40   | 0.16 ± 0.08   |
| CD 34    | 1.43 ± 2.41   | 0.14 ± 0.08  | 0.18 ± 0.19   | 0.15 ± 0.08   |
| CD 31    | 0.52 ± 0.32   | 0.39 ± 0.14  | 0.24 ± 0.17   | 0.35 ± 0.27   |
| CD 14    | 2.18 ± 2.55   | 0.12 ± 0.06  | 0.37 ± 0.41   | 0.17 ± 0.08   |

**Tabla 2.** Porcentaje de expresión de los marcadores de superficie de las diversas fuentes evaluadas mediante citometría de flujo. Se observa el promedio del porcentaje de células positivas obtenido para los distintos marcadores evaluados con respecto al total y su respectiva desviación estándar de las MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD). n=5.

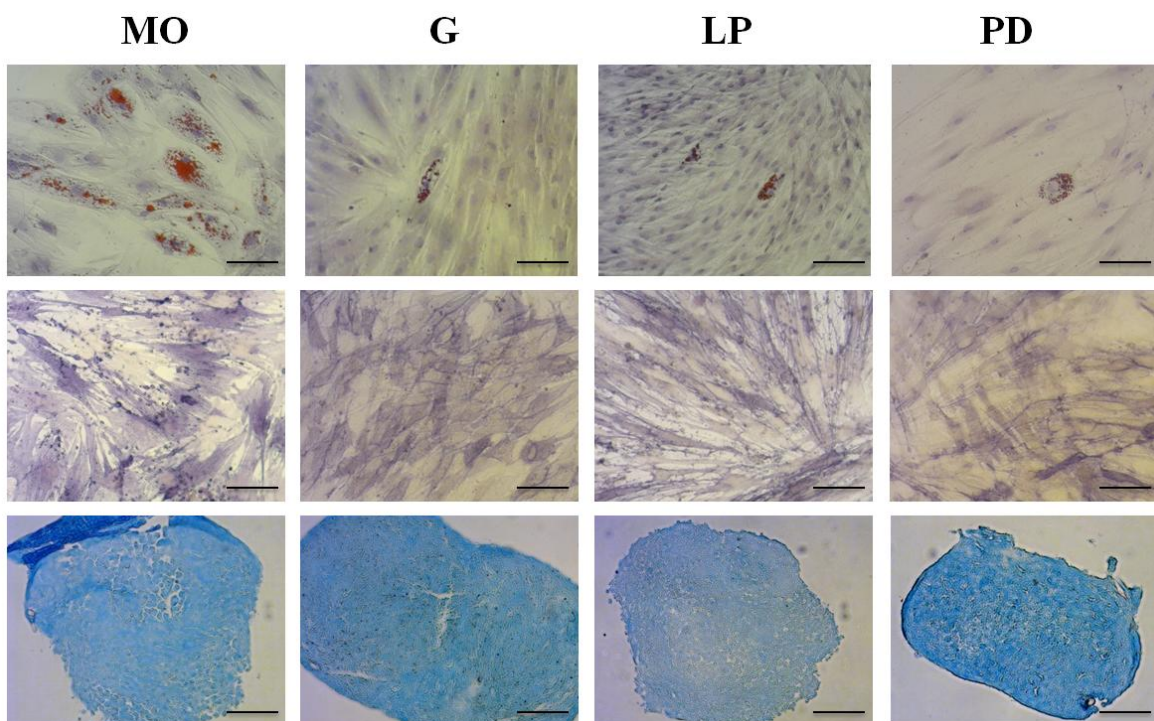




**Figura 5.** Nivel de expresión de los marcadores de superficie mostrados en histogramas. Los histogramas rellenos corresponden a la autofluorescencia mientras que los histogramas señalados con línea continua representan la expresión del marcador evaluado mediante citometría de flujo. Histogramas cargados hacia la derecha indican una mayor expresión del marcador mientras que los cargados hacia la izquierda una menor o nula expresión. Gráficos representativos de una muestra.

### **9.1.3 Capacidad de diferenciación**

Otra característica que debe poseer una población de células para ser considerada MSCs es la capacidad de diferenciación hacia tres linajes distintos, esto es hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Para ello, las células obtenidas de tejidos dentales fueron cultivadas con medios de inducción específicos para los linajes antes mencionados. Al término de la diferenciación, se realizaron tinciones citoquímicas especiales para cada tipo de diferenciación. Para determinar adipogénesis, se realizó la tinción citoquímica con rojo oleoso que evidencia la presencia de vacuolas lipídicas; en tanto que para evidenciar osteogénesis, se efectuó la tinción para fostatasa alcalina que demuestra la presencia de esta enzima; y para determinar condrogénesis se realizó la tinción citoquímica de azul alciano que demuestra la presencia de glucosaminoglicanos.



**Figura 6.** Capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD). Se aprecian imágenes representativas de las tinciones citoquímicas realizadas de las diferenciaciones adipogénica (superior), osteogénica (media) y condrogénica (inferior); teñidas con rojo oleoso, BCIP/NBT, y azul alciano respectivamente de las diversas fuentes. 20x. Barra = 100 $\mu$ m.

Como se puede apreciar en la figura 6, las MSCs de tejidos dentales mostraron una menor capacidad de diferenciación adipogénica en contraste con MO, ya que sólo algunas células presentaron positividad para la tinción rojo oleoso. Por otro lado, al evaluar la capacidad de diferenciación osteogénica mediante la detección de la enzima fosfatasa alcalina, las MSCs de las fuentes dentales manifestaron positividad así como una morfología comparable a las de MO (figura 6). Además, las MSCs de tejidos dentales mostraron positividad para la tinción azul alciano demostrando la presencia de glicosaminoglicanos característicos del tejido cartilaginoso como se muestra en la figura 6. Así, las MSC de tejidos dentales cumplen con el tercer criterio impuesto por la ISCT.

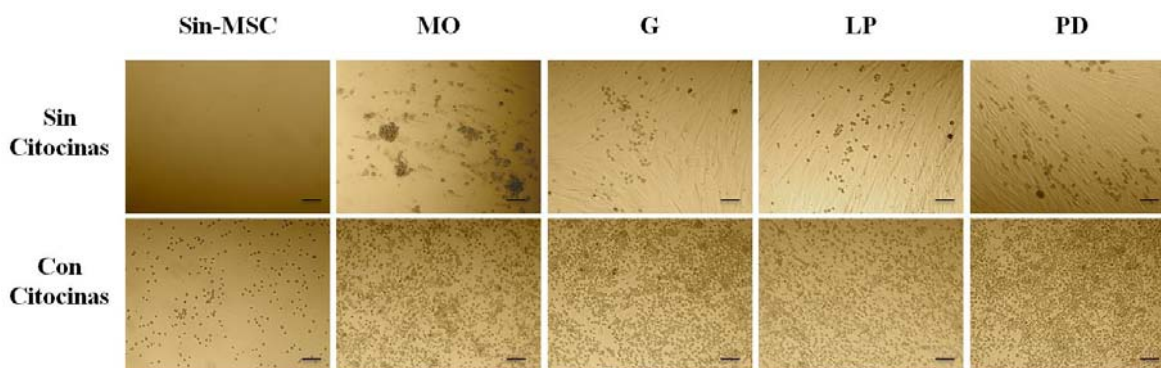
Por esta observación, se consideró a las células obtenidas de tejidos dentales como MSCs debido a que poseen la morfología, inmunofenotipo y la capacidad de diferenciación exigido por la ISCT.

## 9.2 Capacidad de soporte hematopoyético

Para determinar si las MSCs de tejidos dentales poseían la capacidad de soporte hematopoyético, unidades de sangre de cordón fueron procesadas y enriquecidas en el inmunofenotipo CD34+CD38-Lin- para posteriormente ser co-cultivadas con MSCs de las distintas fuentes. En promedio, las muestras de SCU procesadas contenían un volumen de 77ml y aproximadamente  $185 \times 10^6$  de CMN. Posterior al enriquecimiento por selección negativa, se obtuvo una población celular con el fenotipo CD34+CD38-Lin- de  $3.1 \times 10^5$  en promedio, lo cual corresponde a 0.19% de la población total.

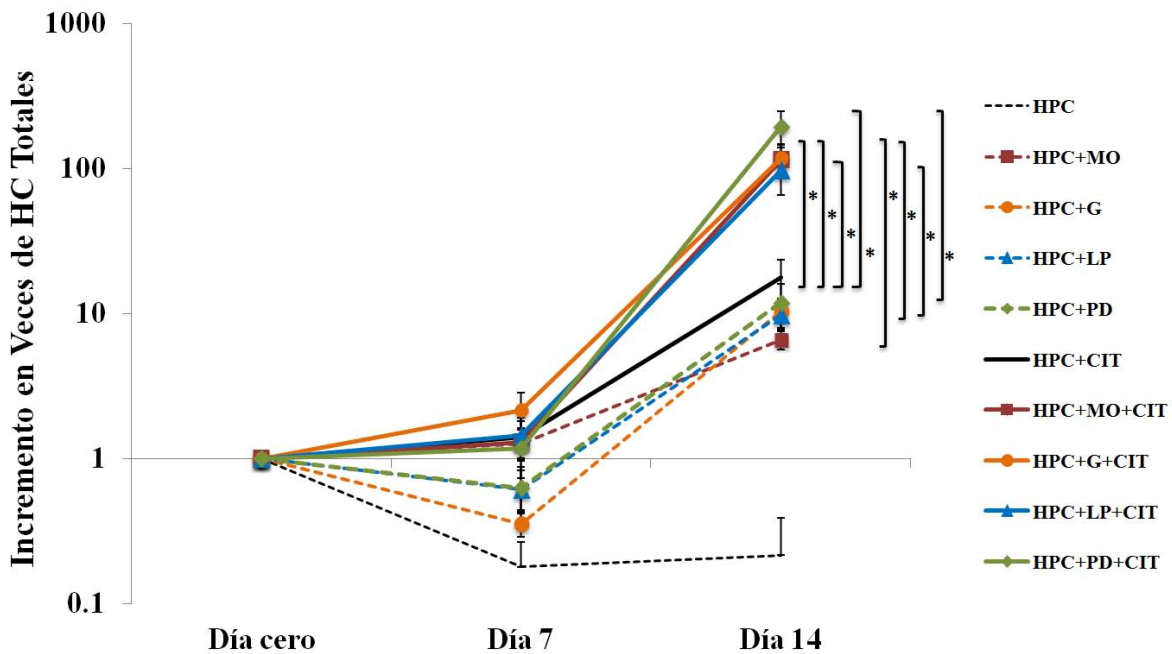
### 9.2.1 Proliferación

Para evaluar el efecto de las MSCs sobre la proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, se realizaron co-cultivos de ambas poblaciones y se determinó el número de células hematopoyéticas a los días 7 y 14 de cultivo (Figura 8). En la figura 7 se puede distinguir que el incremento en el número de células hematopoyéticas es notorio en presencia de MSCs y citocinas.



**Figura 7.** Imágenes representativas de los co-cultivos de MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) con HPCs enriquecidas de SCU ya sea en presencia o ausencia de citocinas y sus respectivos controles con y sin citocinas. Las fotografías de los co-cultivos se adquirieron al día 13 de cultivo. 10x. Barra = 100µm.

Como se puede apreciar en la figura 8, las HPCs cultivadas durante 14 días en ausencia de citocinas no proliferaron e incluso se observó una disminución en el número celular. Por otro lado, cuando las HPCs fueron cultivadas sobre una monocapa de MSCs, se obtuvo un incremento significativo en el número de HCs en comparación con los cultivos en ausencia de MSCs. De manera interesante, el incremento de las HCs provenientes de los co-cultivos con MSCs de tejidos dentales (G: 10.2, LP: 9.7 y PD: 11.8) fueron en promedio mayores a MO (con valor de 6.5), sin embargo no hubo diferencias significativas. En el cultivo de HPCs sin MSCs en presencia de citocinas, se obtuvo un valor de 17.7, siendo en promedio mayor que en las condiciones ya mencionadas, no obstante éste no fue estadísticamente significativo comparado con los valores obtenidos de las fuentes de MSCs en ausencia de citocinas (figura 8).



**Figura 8.** Cinética de proliferación de las células hematopoyéticas obtenidas de los co-cultivos en las diferentes condiciones al día 7 y 14 de cultivo con respecto al inicial. Se observan los valores obtenidos de proliferación en incremento en veces de las HCs contabilizadas al día 7 y 14 de los controles sin MSCs y de las MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) tanto en ausencia como en presencia de citosinas. n=5. \*: Diferencias estadísticamente significativas  $\alpha < 0.05$ .

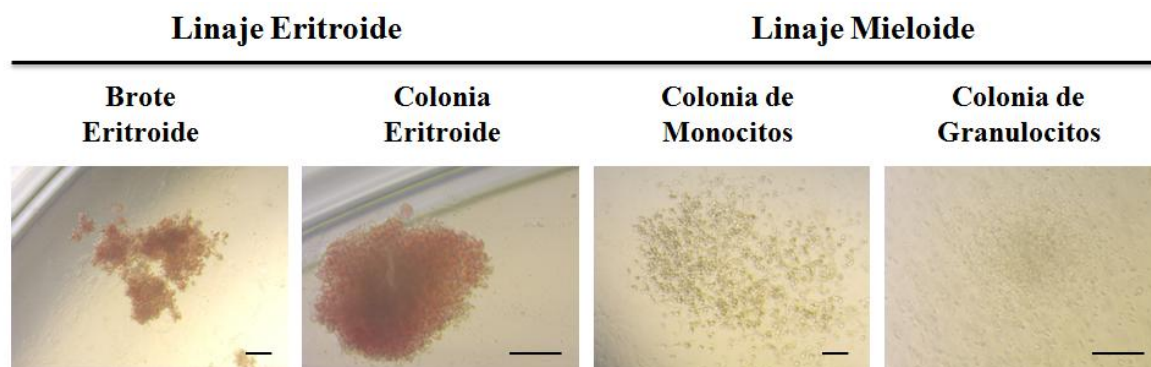
En los co-cultivos en presencia de citocinas, se obtuvo un valor de incremento en veces significativamente mayor a los obtenidos exclusivamente con citocinas y MSCs sin citosinas, de manera independiente. Los valores promedio obtenidos fueron de 114.9 para MO, 117.2 para G, 97.3 para LP y 194.1 para PD. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las diversas fuentes de MSCs en presencia de citocinas (Figura 8).

Así, estas observaciones indican que las MSCs provenientes de tejidos dentales favorecen la proliferación de progenitores hematopoyéticos de SCU.



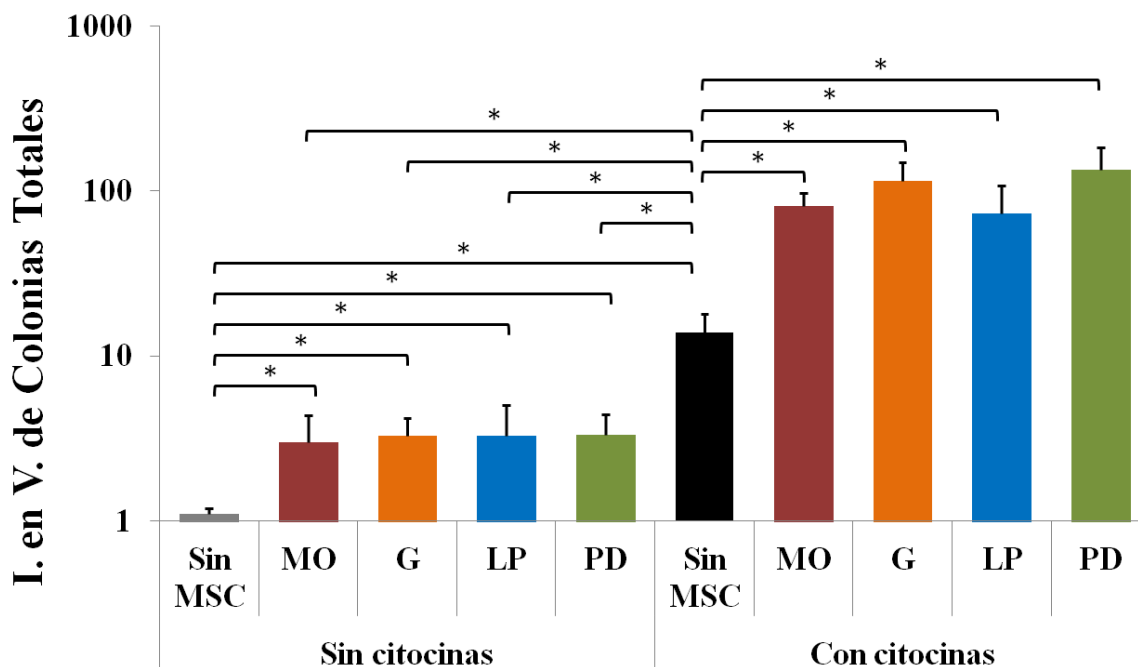
### **9.2.2 Formación de CFCs**

Para determinar si las MSC de tejidos dentales tienen la capacidad de expandir progenitores hematopoyéticos tardíos (CFCs), se sembraron células obtenidas de los cultivos al día 14 en medio semisólido adicionado con citocinas para estimular el crecimiento de colonias. La identificación de HPCs tardías se realizó debido a su capacidad de formar colonias de células. Dichas colonias se identificaron por su morfología característica como se ejemplifica en la figura 9.



**Figura 9.** Morfología representativa de las principales colonias observadas en los cultivos semisólidos. 5x y 10x. Barra 200 $\mu$ m.

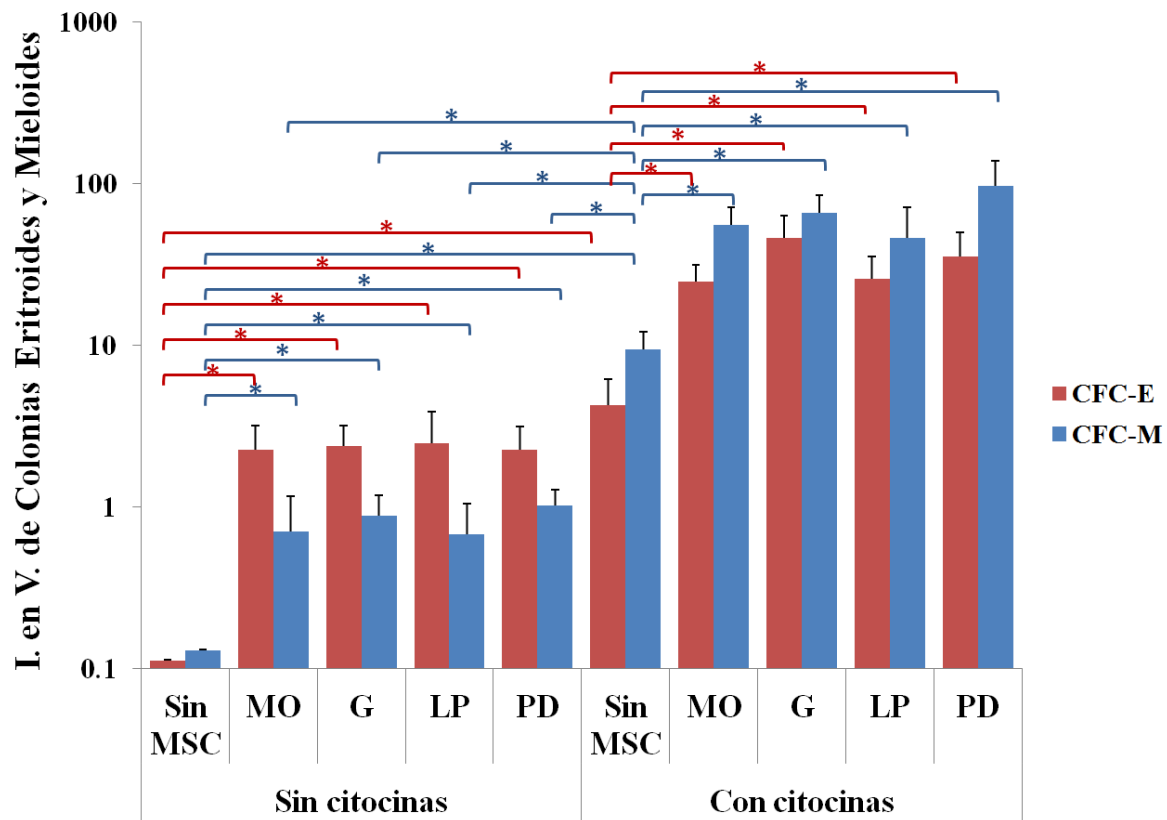
Del mismo modo que la proliferación, la expansión de HPCs tardíos fue dependiente de la condición tal y como se observa en la figura 10. La expansión de HPCs tardíos en los co-cultivos fue menor en ausencia de citocinas que en su presencia. En ausencia de MSCs y citocinas, la población capaz de generar colonias disminuye significativamente. En contraste, en los co-cultivos sin citocinas con MSCs, se observó un incremento de HPCs tardíos muy parecido entre las distintas fuentes evaluadas, siendo de 3.0 para MO, 3.3 para G, 3.27 para LP y 3.34 para PD. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.



**Figura 10.** Incremento en veces de las colonias totales obtenidas de las diferentes condiciones al día 14. Se observan los valores alcanzados de expansión total de CFCs en incremento en veces (I. en V.) de las células obtenidas al día 14 de los controles sin MSCs y de los co-cultivos con MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) ya sea en ausencia o presencia de citocinas. n=5. \* Diferencias estadísticamente significativas  $\alpha < 0.05$ .

En presencia de citocinas sin MSCs, se obtuvo un incremento de 13.9 siendo estadísticamente superior en comparación con cualquier fuente de MSCs cultivadas sin citocinas. Por otra parte, en presencia de citocinas y MSCs se observó un mayor incremento a las condiciones previas siendo de 81.6 para MO, 114.8 para G, 73.3 para LP y 134.3 para PD; predominando el incremento para G y PD; habiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus respectivos controles sin citocinas y así también con el control sin MSCs con citocinas. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas entre las MSCs de distintas fuentes en presencia de citocinas.

Al separar por tipo de progenitor (figura 11), se observó un comportamiento similar al mostrado en CFC totales. En ausencia de citocinas pero en presencia de MSCs, los valores obtenidos de I. en V. fueron mayores para progenitores eritroides (MO=2.25, G=2.37, LP=2.49, PD=2.25) que para mieloides (MO=0.71, G=0.88, LP=0.68, PD=1.01) en las diferentes fuentes de MSCs evaluadas siendo estadísticamente diferentes con respecto al control sin MSCs para ambos tipos de progenitores. No obstante, en la condición sin MSCs pero en presencia de citocinas, se observó un incremento en la expansión de progenitores eritroides (4.28) y mieloides (9.44) siendo mayor en éste último y significativamente mayor para ambos progenitores en contraste al control sin MSCs sin citocinas. Pero al contrastar con las distintas fuentes de MSCs en ausencia de citocinas, presentó diferencias estadísticamente significativas para el linaje mieloides más no para el eritroide.



**Figura 11.** Incremento en veces de progenitores eritroides y mieloides obtenidos de las diferentes condiciones al día 14. Se observan los valores logrados de expansión de CFC-E y CFC-M en incremento en veces (I. en V.) de las células obtenidas al día 14 de los controles sin MSC y de los co-cultivos con MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) ya sea en ausencia o presencia de citocinas. n=5. \*Diferencias estadísticamente significativas  $\alpha < 0.05$ .

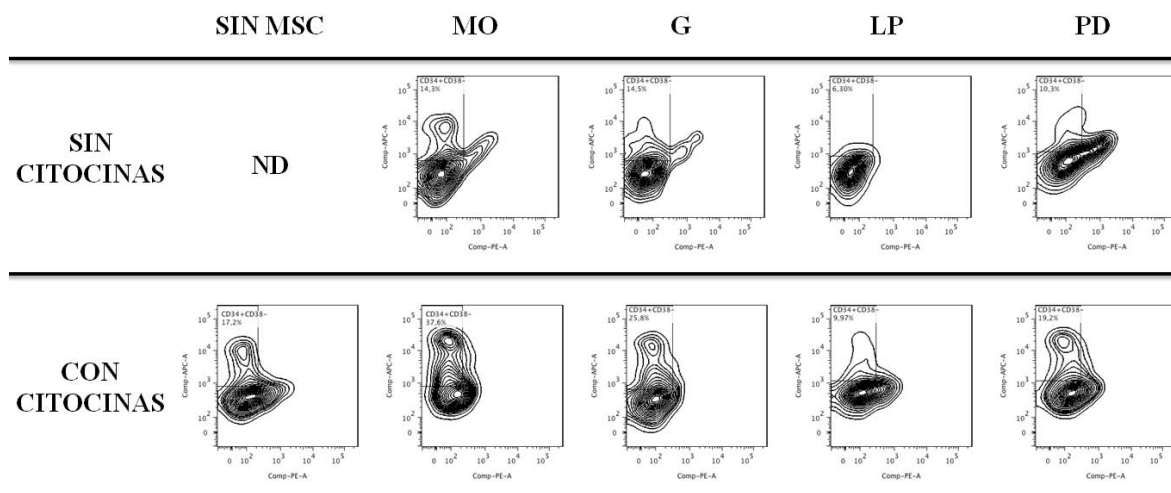
En la condición con MSCs y citocinas se observaron valores similares entre MO, G, LP y PD en cuanto a progenitores eritroides (MO=24.78, G=46.21, LP=25.92, PD=35.33) y mieloides (MO=55.31, G=65.87, LP=46.21, PD=97.42), obteniéndose diferencias significativas con sus respectivos controles sin citocinas, pero no así entre las distintas MSCs evaluadas en esta condición (figura 11). Además, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la obtención de colonias eritroides o mieloides dentro de la misma condición tanto en los controles como en las MSCs de diferentes fuentes ya sea en ausencia o presencia de citocinas.

Todos estos datos demuestran que MSCs provenientes de tejidos dentales poseen la capacidad de incrementar la formación de CFCs en co-cultivo con HPCs de SCU.



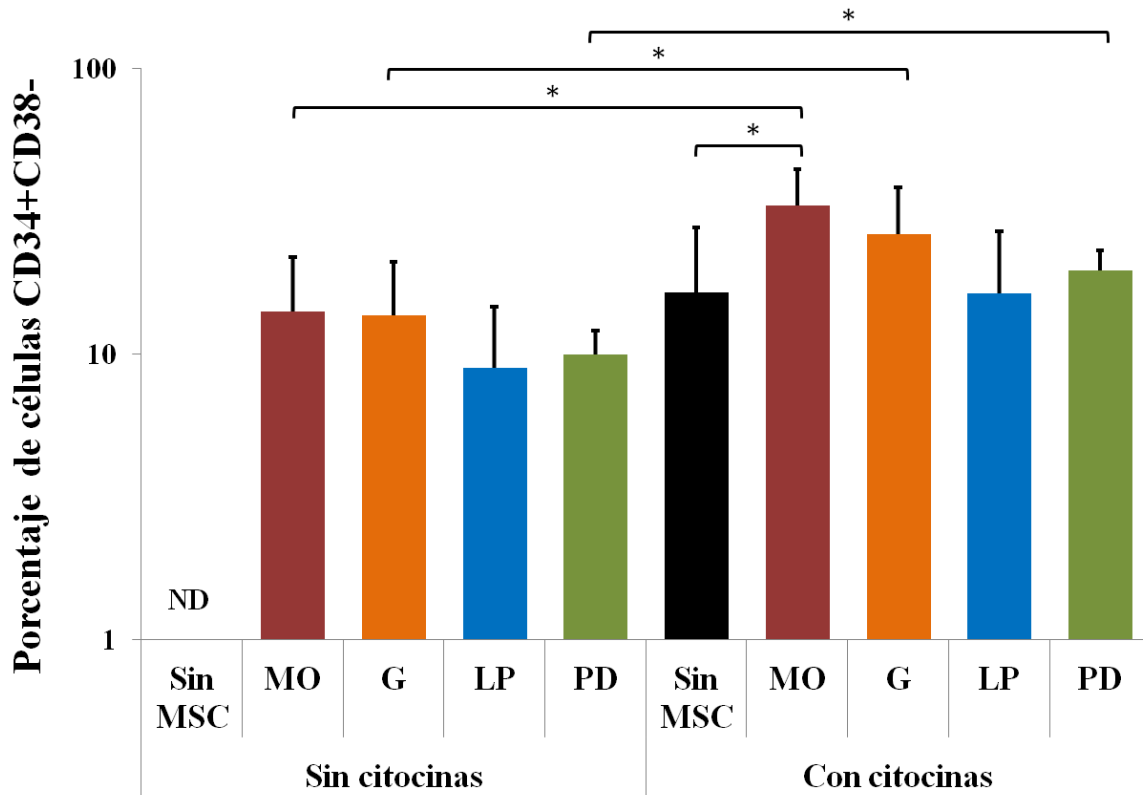
### 9.2.3 Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-

Para determinar si las MSC de tejidos dentales favorecían la expansión de HPCs con inmunofenotipo CD34+CD38- (HPCs tempranas), se colectaron las células obtenidas de los cultivos al día 14, se tiñeron con anticuerpos acoplados a fluorocromos y se leyeron en el citómetro de flujo. Los resultados obtenidos del análisis se muestran en las figuras 12 y 13.



**Figura 12.** Imágenes representativas de los porcentajes de células CD34+CD38- obtenidos de las diferentes condiciones al día 14 evaluados mediante citometría de flujo. El control sin MSCs sin citocinas no se pudo determinar. Se observan los gráficos del análisis de citometría de las células obtenidas de los cultivos al día 14, tanto de los controles sin MSCs como de los co-cultivos con MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) ya sea en ausencia o presencia de citocinas. La población enmarcada dentro del cuadro en cada gráfico corresponde a la población CD34+CD38-.

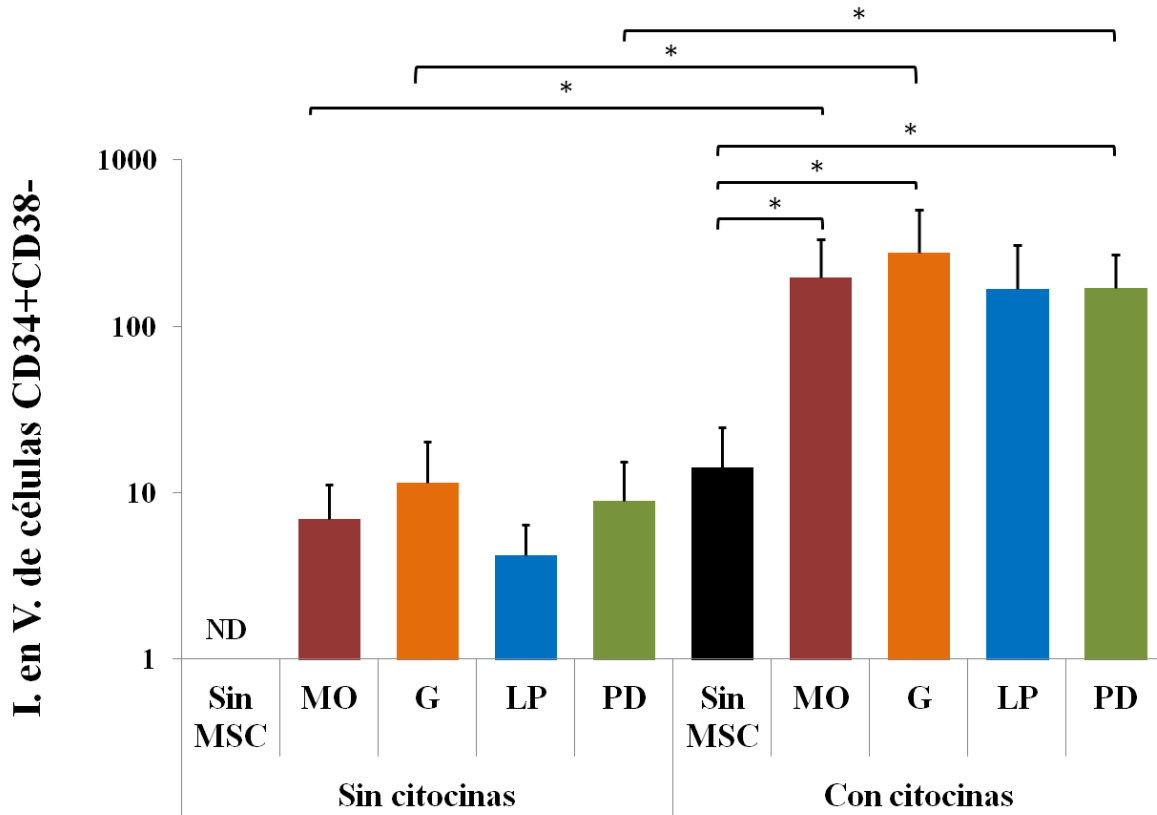
El porcentaje de células con inmunofenotipo CD34+CD38- en el control sin MSC en ausencia de citocinas no se pudo determinar (Figura 13). En presencia de MSCs, se obtuvo un incremento considerable en el porcentaje de células CD34+CD38- obteniéndose valores de 14.08 para MO, 13.59 para G, 8.92 para LP y 9.96 para PD, en tanto que en el control de citocinas sin MSCs fue de 16.36, sin embargo no fue estadísticamente significativo a la condición mencionada anteriormente. En presencia tanto de MSCs como de citocinas el porcentaje se incrementó significativamente con respecto al control citocinas sin MSCs, siendo para MO de 32.94, para G de 26.24, para LP de 16.24 y para PD de 19.58. Solo en MSCs de MO se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control sin MSCs con citocinas. Además, en esta condición MO, G y LP presentaron diferencias significativas con relación a sus respectivos controles sin citocinas, más no para LP. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes fuentes de MSCs utilizadas con citocinas.



**Figura 13.** Porcentaje de células con inmunofenotipo CD34+CD38- al día 14 de las diferentes condiciones. Se muestran los valores de la expansión de células CD34+CD38- en porcentaje con respecto al total obtenido en la proliferación al día 14 de los controles sin MSCs y de los co-cultivos con MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) ya sea en ausencia o presencia de citocinas. n=5. \*: Diferencias estadísticamente significativas  $\alpha < 0.05$ .

Al obtener el incremento en veces con respecto a la población inicial (figura 14), se observó un comportamiento similar al anterior. En presencia de MSCs pero en ausencia de citocinas, se obtuvo un I. en V. de 6.9 para MO, 11.4 para G, 4.2 para LP y 8.9 para PD, teniendo G el valor más alto, pero este no fue significativo con respecto a los demás. En ausencia de MSCs pero en presencia de citocinas se obtuvo un aumento de 14.09, sin embargo no fue estadísticamente significativo con respecto a los mencionados. En la condición con MSCs y citocinas, se observó un incremento de la población CD34+CD38- siendo estadísticamente diferente al control sin MSCs en presencia de citocinas (valores de 197.8 para MO, 277.8 para G, 167.7 para LP y 169.7 para PD) y significativo con relación a sus respectivos controles sin citocinas, excepto para LP, ya que no se obtuvieron diferencias significativas con ninguno de los controles. El mayor valor obtenido fue para MSCs de G con citocinas pues alcanzó un I. en V. promedio superior a las demás fuentes de MSCs pero sin ser estadísticamente significativo a las otras fuentes.

Los resultados anteriores indican que MSCs de tejidos dentales son capaces de expandir HPCs de SCU con inmunofenotipo CD34+CD38-.



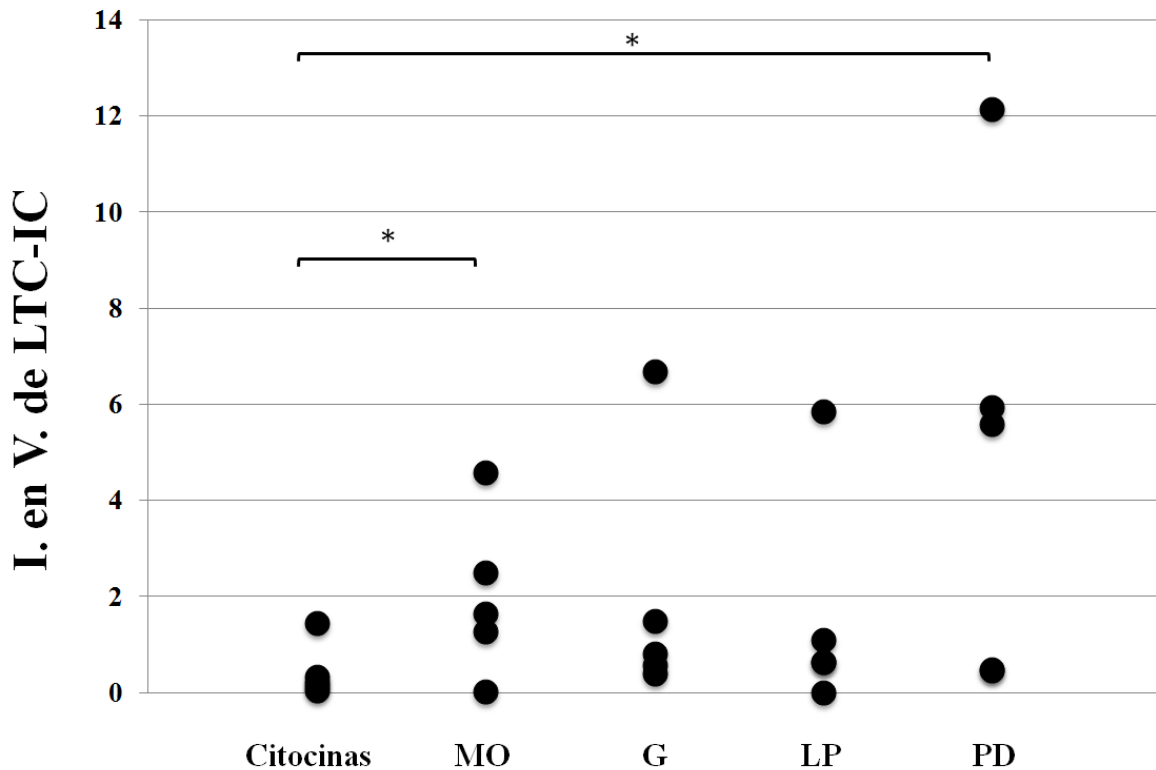
**Figura 14.** Incremento en veces de células con inmunofenotipo CD34+CD38- de las diferentes condiciones obtenidas al día 14. Se observan los valores alcanzados de la expansión de células CD34+CD38- en incremento en veces (I. en V.) con respecto al inicial de las células obtenidas al día 14 tanto de los controles sin MSCs como de los co-cultivos con MSCs de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) ya sea en ausencia o presencia de citocinas. n=5. \*: Diferencias estadísticamente significativas  $\alpha < 0.05$ .

### 9.2.4 Formación de LTC-IC

Para verificar si las MSC de tejidos dentales mantenían la formación de LTC-IC, se cultivaron células colectadas del día 14 de las diferentes fuentes y condiciones sobre una monocapa de la línea celular M210B4 y se incubaron durante 35 días. Al término, se sembraron éstas en medio semisólido e incubaron 14 días para realizar el conteo de colonias. Debido a que las condiciones sin citocinas no satisfacían el número necesario de células para llevar a cabo este ensayo, no se llevó a cabo en esas condiciones, y por lo tanto sólo se presentan los datos obtenidos de las condiciones con citocinas, los cuales se presentan en la figura 15, donde se muestran los resultados obtenidos de cada experimento independiente.

En el control sin MSCs con citocinas se obtuvo un I. en V. promedio de 0.42, en cambio en presencia de MSCs y citocinas se obtuvo un I. en V. de 1.99 para MO, 1.94 para G, 1.64 para LP y 4.97 para PD siendo mayor en éste último (figura 15). Sin embargo, sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para MO y PD con respecto al

control sin MSCs, aunque no hubo diferencias significativas en los valores de LTC-IC entre las fuentes dentales. Estos resultados indican que MSCs de tejidos dentales pueden incrementar la formación de LTCIC en cultivo con HPCs de SCU.



**Figura 15.** Incremento en veces de LTC-IC al día 14 de las diferentes condiciones. Se observan los valores alcanzados de la expansión de LTC-IC en incremento en veces (I. en V.) con respecto al inicial de las células obtenidas al día 14 de cada experimento independiente. Únicamente se presentan las condiciones con citocinas, ya sea sin MSCs o de los co-cultivos con MSC de médula ósea (MO), gingiva (G), ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) en presencia de citocinas. n=5. \*: Diferencias estadísticamente significativas  $\alpha < 0.05$ .

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1 Caracterización

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés, *International Society for Cellular Therapy*) publicó los criterios para definir a una MSCs como tal, los cuales son los siguientes: 1) deben ser células adherentes al plástico con morfología fibroblastoide; 2) deben expresar los marcadores de superficie  $\geq 95\%$  CD105, CD90 y CD73 pero no deben expresar  $\leq 2\%$  CD45, CD34, CD14 y HLA-II; 3) deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos. Por lo tanto para poder afirmar que la población a estudiar se trataba de MSC se dispuso a evaluar su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación.

Las células de las fuentes dentales obtenidas mediante su adherencia mostraron poseer una morfología fibroblastoide cumpliendo con el primer criterio de la ISCT. Dicha morfología ya ha sido reportada por otros grupos de investigación para las tres fuentes dentales evaluadas (Zhang *et al.* 2009; Seo *et al.* 2004; Grontos *et al.* 2000).

También, tales células expresaron los marcadores establecidos para las MSCs CD105, CD90 y CD73 mayores al 95%. Para los tres marcadores evaluados, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con MSC de MO y de igual forma, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las distintas fuentes de MSCs evaluadas. En relación con la expresión de marcadores de linaje hematopoyético y epitelial, las células aisladas de los tejidos dentales demostraron ser negativas para los marcadores CD45, CD34, CD31, CD14 y HLA-II teniendo un porcentaje menor al 2% y por lo tanto, cumpliendo con el segundo criterio impuesto por la ISCT. Estos datos concuerdan con los reportados por Mitrano *et al.* (2010) para G, Song *et al.* (2012) para LP y Ponnaiyan *et al.* (2014) quienes reportaron una expresión de marcadores similar a la obtenida en el presente trabajo.

Además, las MSCs de tejidos dentales demostraron tener una capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica ya que fueron positivas para la detección de vacuolas lipídicas, fosfatasa alcalina y mucopolisacáridos mediante tinciones citoquímicas. La capacidad de diferenciación trilineal de MSCs de fuentes dentales ya ha sido reportada para aquellas provenientes de G (Mitrano *et al.* 2010; Tang *et al.* 2010), LP (Gay *et al.* 2007; Song *et al.* 2012) y PD (Poltavtseva *et al.* 2014; Harrington *et al.* 2014). En dichos trabajos se ha reportado que las MSCs de tejidos dentales poseen la capacidad de diferenciarse hacia adipocitos, condrocitos y osteocitos. Sin embargo, se han observado algunas diferencias con respecto a MSCs de MO, las cuales son el control de referencia.

Así como se ha reportado en estudios previos (Mitrano *et al.* 2010; Tang *et al.* 2010; Gay *et al.* 2007; Song *et al.* 2012; Poltavtseva *et al.* 2014; Harrington *et al.* 2014), las MSCs de tejidos dentales presentaron capacidad de diferenciación adipogénica. Sin embargo, fue necesario realizar la prueba en un pasaje anterior para poder detectar la presencia de adipocitos y en muy bajo porcentaje. En aquellos estudios comparativos con MSCs de MO, se ha señalado que las MSCs de tejidos dentales poseen una capacidad de diferenciación adipogénica cualitativamente inferior a MO (Grontos *et al.* 2000; Harrington *et al.* 2014).

También, se ha reportado en múltiples trabajos que las MSCs provenientes de fuentes dentales poseen una capacidad de diferenciación osteogénica elevada e incluso (en los trabajos comparativos) superior a MSCs de MO. Esto se ha determinado ya sea por obtenerse una mayor extensión o intensidad en la tinción (Gay *et al.* 2007; Pierdomenico *et al.* 2005) o una mayor expresión de transcritos o proteínas relacionados al linaje óseo (Ponnaiyan *et al.* 2014). Lo anterior concuerda con lo obtenido en el presente trabajo, ya que para las tres fuentes de MSC evaluadas (G, LP y PD) se observó una tinción más prominente en tejidos dentales que en MO, tanto en extensión como en intensidad del colorante, e incluso en los controles negativos hubo positividad aunque marcadamente menor que en los inducidos.

En lo que se refiere a diferenciación condrogénica son pocos los estudios que la evalúan y menos aún los que la comparan con MO. En tales estudios, se ha descrito que las MSCs de tejidos dentales poseen dicha capacidad, sin embargo ésta es inferior comparada con MO para el caso de LP y PD (Gay *et al.* 2007; Harrington *et al.* 2014). Además, se ha reportado que las MSCs de tejidos dentales forman micromasas amorfas (Gay *et al.* 2007). En el presente estudio se evidenció la capacidad de diferenciación condrogénica de las tres fuentes dentales evaluadas de forma similar a lo ya reportado, sin embargo no se observaron diferencias entre las diferentes fuentes de MSCs evaluadas; para ello, haría falta realizar ensayos más finos como la cuantificación de colágena II y Sox9.

Incluso se ha evaluado la expresión de genes relacionados con pluripotencia en MSCs de tejidos dentales, como son Oct4, Sox2 y Nanog. Así las MSC de G han mostrado expresar Oct4 y Sox2 (Marinka-Kalmani *et al.*, 2010) en tanto que las MSCs de PD expresan Oct4 y Nanog (Huang *et al.*, 2014).

Por todo lo anterior, consideramos a las células obtenidas mediante adherencia de G, LP y PD como MSCs, ya que poseen las características para denominarlas como tales pues tienen la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos de forma comparable a MO, aunque hayan mostrado tener una inferior capacidad de diferenciación adipogénica a MSCs de MO.

## 10.2 Capacidad de soporte hematopoyético

Como se indicó anteriormente, el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs de tejidos dentales a partir de HPCs de SCU. Para ello, se desarrollaron co-cultivos de HPCs de SCU en contacto con monocapas de MSC de tejidos dentales (G, LP y PD) durante 14 días, ya sea en ausencia o en presencia de citocinas exógenas (IL-6, SCF, Flt-3L y TPO) y se contrastó con MSCs de MO, las cuales ya han demostrado poseer dicha capacidad (Majumdar *et al.*, 1998). Los controles consistieron en cultivos sencillos (sin MSCs) de HPCs de SCU con o sin citocinas.

Para poder establecer si las MSCs de tejidos dentales poseían capacidad de soporte hematopoyético, el primer paso fue verificar si las MSCs de tejidos dentales promovían la proliferación de progenitores hematopoyéticos. Los resultados obtenidos mostraron que el incremento de la proliferación depende de la presencia de MSCs o de citocinas y que en presencia de ambas el aumento es significativamente mayor en contraste a los controles en todos los tipos de MSCs evaluadas. Resultados similares ya han sido reportados para MSCs de MO (Flores-Guzman *et al.*, 2009; Walenda, *et al.*, 2011) e incluso MSCs de otras fuentes como SCU (Wang *et al.*, 2004), placenta (Luan *et al.*, 2013) y TA (Nishiwaki *et al.* 2012). Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las MSCs de tejidos dentales contra MO, por lo tanto demostrando tener una capacidad de inducir la proliferación de HPCs de SCU similar a MO. Además, se observó una tendencia en el caso de PD hacia una mayor I. en V. pero sin ser significativa.

Una vez que se determinó que las MSCs de tejidos dentales incrementaron la proliferación de HPCs de SCU, se procedió a evaluar su capacidad de expandir HPCs y para ello se analizó la formación de colonias hematopoyéticas (CFC) mediante ensayos clonogénicos. Se observó que la expansión de HPCs tardíos es significativamente mayor en presencia de MSCs y citocinas en comparación con únicamente MSCs o citocinas, predominando principalmente en MSCs de G y PD. Estos resultados concuerdan con reportes previos, en donde se demuestra que MSCs de MO en conjunto con citocinas exógenas son capaces de expandir CFC *in vitro* significativamente más que en los controles sin MSCs o sin citocinas (Robinson *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2007; Flores-Guzmán *et al.*, 2009; Wallenda *et al.*, 2011). Lo mismo ha sido reportado para fuentes alternativas a MO como es el caso de fuentes neonatales (Wang *et al.*, 2004; Luan *et al.*, 2012) y fuentes adultas (Nakao *et al.*, 2010).

Al agrupar CFCs por tipo de progenitor se observó que los valores en I. en V. de CFC-E como CFC-M son similares entre los diferentes tipos de MSC evaluadas en la misma condición. Sin embargo el I. en V. de CFC-M fue mayor en las condiciones en presencia de citocinas, mientras que en su ausencia CFC-E fue la más abundante. No obstante, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre CFC-E y CFC-M en la misma condición. A diferencia del presente trabajo, Flores-Guzmán *et al.* (2009) utilizando MO como capa alimentadora obtuvo un mayor I. en V. en CFC-M que en CFC-E en ausencia de citocinas. Otros grupo de investigación han encontrado que el número, porcentaje o I. en V.

de CFC-M es mayor al utilizar citocinas exógenas y éste se incrementa en conjunto con MSC ya sean de MO (Fei *et al.*, 2007; Wallenda *et al.*, 2011) o SCU (Fajardo, 2012).

Al evaluar si las MSCs de tejidos dentales favorecían la expansión de HPCs con inmunofenotipo CD34+CD38- se observó que en los cultivos adicionados con citocinas y MSCs presentaron los mayores valores. Lo anterior concuerda con lo previamente publicado para MSCs de MO (Robinson *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2007; Wallenda *et al.*, 2011), en donde se obtuvieron incrementos superiores de células CD34+, en aquellos cultivos con MSCs y citocinas en comparación con aquellos sin MSCs o sin citocinas; sin embargo es importante señalar que sólo evaluaron el marcador CD34. En el presente trabajo, tanto en ausencia como en presencia de citocinas, se obtuvieron valores similares de frecuencia en células CD34+CD38- utilizando MSCs de MO, G, LP y PD.

Por otro lado, al obtener el I. en V. de la población CD34+CD38-, se observó que en presencia de MSCs de G se obtuvieron mayores valores de I. en V. tanto en ausencia como en presencia de citocinas con respecto a las otras MSCs evaluadas. Sin embargo éste no fue significativo en comparación con las MSCs de las otras fuentes dentro de la misma condición. De igual forma se ha documentado que en presencia de MSCs y citocinas existe un incremento en la población CD34+CD38- posterior a la expansión (Kadereit *et al.*, 2002; Flores-Guzmán *et al.*, 2009).

Cuando se determinó si las MSCs de tejidos dentales mantenían la formación de LTC-IC se observó que en presencia tanto de MSCs como de citocinas se incrementa el número de LTC-IC con respecto al control sin MSCs y que esta tiende a ser mayor al utilizar MSCs de PD que MO. Lo anterior concuerda con lo reportado para MSC de MO (Kadereit *et al.*, 2002; Flores-Guzmán *et al.* 2009), ya que en estos estudios obtienen un mayor incremento de LTC-IC cuando se utilizan MSCs como capa alimentadora que sólo citocinas.

Como se mencionó en secciones anteriores, la HSCs requiere de señales específicas para su mantenimiento, supervivencia y proliferación. Estas señales provienen de la estrecha comunicación del microambiente con la HSCs, ya sea a través de mensajeros químicos solubles (citocinas), mediante el contacto con las diferentes células del microambiente, o por medio de interacciones con elementos de matriz extracelular (Agas *et al.*, 2015). Es por ello que para obtener una expansión exitosa de esta población celular (HSCs) es necesario proveerle los elementos indispensables para que ello ocurra.

Así como se evidenció en cada una de las pruebas realizadas, la ausencia de una capa alimentadora y citocinas conlleva a una pérdida de HPCs en cultivo pues estas células requieren de citocinas y señales específicas para su mantenimiento y supervivencia (Heyworth *et al.*, 1997). En cambio, al proveer de una capa alimentadora de MSCs, se observó un incremento de la proliferación y expansión de progenitores tardíos (CFCs) y tempranos (CD34+CD38-). Este incremento puede ser debido a la expresión de citocinas como IL-6, IL-7, IL-11, GM-CSF, LIF, SCF, Flt3-L y TPO, así como moléculas de matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágena, proteoglicanos y también integrinas y moléculas de



adhesión celular como ICAM, VCAM, ALCAM, entre otras, como se ha publicado para las MSCs de MO. Todas ellas en conjunto son señales que estimulan la proliferación, diferenciación, supervivencia y mantenimiento de las HPCs (Bobis *et al.*, 2006; Minguel *et al.*, 2001; Fajardo-Orduña *et al.*, 2015).

MSCs en presencia de IL-6, SCF, Flt-3L y TPO favorecieron la proliferación y expansión de CFCs, células CD34+CD38- y LTC-IC. Se ha reportado que Flt3-L sinergiza con IL-6 incrementando la proliferación; con SCF incrementa la expansión de células CD34+CD38- y estimula la proliferación de células quiescentes. SCF también incrementa la expansión de células CD34+CD38- y sinergiza con otras citocinas aumentando la formación de CFCs. TPO además de regular la producción y maduración de megacariocitos, estimula la expansión de HPC tempranos (Saleh *et al.*, 2015). Pese a que ninguna citocina es capaz de sostener una HSC por sí misma, juntas inducen la secreción de factores (ya sea que actúen en la HSCs o en el microambiente) que son responsables del mantenimiento y la autorenovación (Burgess 1998). Aunque las citocinas provean señales importantes para mantenimiento y proliferación, no sustituyen señales también importantes para las HPCs como el contacto celular.

También, se ha reportado que las MSCs de MO no sólo sintetizan SCF de forma soluble, sino también unido a membrana, de esta forma proporciona una proliferación óptima de las HPCs y promueven una mejor adhesión así como una apropiada unión a su receptor (Heyworth *et al.*, 1997). Aunado a lo anterior, las MSCs de MO expresan numerosas integrinas (Deans y Moseley, 2000; Pountos *et al.*, 2007) que tienen un importante papel en la adhesión de HPCs con el estroma y en unión con sus receptores potencian las interacciones con el mismo sirviendo como señalizadores (Heyworth *et al.*, 1997). También se ha reportado que las MSCs de MO poseen receptores para citocinas y factores de crecimiento relacionados a la hematopoyesis (Minguell *et al.*, 2001), poniendo de manifiesto su contribución al microambiente hematopoyético.

Así como las MSCs de MO, se ha reportado que las MSCs de tejidos dentales expresan moléculas de adhesión celular como CD29 que tiene un nivel de expresión alto en MSCs de G, LP y PD (Tang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Pierdomenico *et al.*, 2005) e incluso una mayor expresión que MO para el caso de PD (Ponnayan *et al.*, 2014). Además, se ha reportado que MSCs de G expresan MCAM, VCAM y ALCAM (Marinka-Kalmani *et al.*, 2010) en tanto que MSCs de PD expresan MCAM y VCAM (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002) las cuales podrían estar participando de forma similar a MO en el anclaje de la HPCs.

También ha sido evaluada la expresión del receptor del ácido hialurónico (CD44) en MSC de tejidos dentales (Marinka-Kalmani *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Gronthos *et al.*, 2000), que no solo juega un importante papel en la remodelación de la matriz extracelular (Sukhikh *et al.*, 2001), sino que media la proliferación y el desarrollo de HPCs y su función es independiente de citocinas (Heyworth *et al.*, 1997).

Otros estudios han evidenciado la presencia de c-Kit en MSCs de LP y PD (Navabazam *et al.*, 2013), así como ALP, BSP y MEPE (Huang *et al.*, 2009) e incluso marcadores relacionados con soporte hematopoyético como CD117, CD123 y SSEA4, los cuales tienen una expresión más elevada en MSCs de PD que en LP (Vasandan *et al.*, 2014). Además MSCs de PD y LP expresan nestina y GFAP,  $\alpha$ SMA, conexina 43, vinculina y PCNA, sin embargo MSCs de LP expresan más fibronectina, vimentina e IL-6 que MSCs de PD (Hakki *et al.*, 2015).

Varios estudios han mostrado que las MSCs de tejidos dentales expresan CD146 o MUC 18 (Tang *et al.*, 2010; Iwasaki *et al.*, 2013; Shi y Gronthos, 2003) que es un marcador de pericitos. Si dichas células son una subpoblación de la MSC aún está por determinarse, sin embargo comparten numerosas características (Short *et al.*, 2003). No obstante, dichas células poseen un papel crucial en la hematopoyesis, dado que promueven el mantenimiento de la HSCs (Morrison y Scadden, 2014).

Wagner *et al.*, (2007), en un trabajo comparativo en donde evalúan la capacidad de soporte hematopoyético contrastando MSCs de MO con fuentes neonatales (SCU) y adultas (TA), obtienen que las MSCs a las que mejor se adhieren células CD34+ de SCU son las MSCs de MO y SCU, pero no así para MSC de TA. Además, MSCs de MO y SCU mantenían una mayor proporción de células CD34+ que de CD38+, en tanto que TA mantenía una mayor proporción de células CD38+ que de CD34+. También observaron que la frecuencia de LTC-IC incrementaba en presencia de MSCs de MO y SCU pero no así con MSCs de TA y ello lo atribuyeron a que las MSCs de TA expresaban una cantidad significativamente menor de moléculas de adhesión celular (CAMs), integrinas y caderinas. Por lo tanto, el contacto directo célula-célula (MSC-HPC) es esencial para el mantenimiento de las HSC/HPC.

Recientemente, Nakatsuka *et al.*, (2015) evaluó la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs de PD de ratón y las comparó con MSCs de MO utilizando citocinas como control. Al analizar el porcentaje de células CD34+Lin- y CD34-Lin- obtuvieron mayores valores tanto para MSCs de MO como para MSCs de PD en comparación con el control sin MSCs de forma similar al presente trabajo. Sin embargo, al usar MSCs de MO como capa alimentadora obtuvieron un porcentaje significativamente mayor de células CD34+Lin- y CD34-Lin- que al utilizar MSCs de PD en contraste con el presente estudio, en el cual se obtuvieron valores equiparables a MO en las tres fuentes dentales, ya que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, pero en la mayoría de las pruebas se observa una tendencia a un mayor incremento no sólo en la proliferación, sino en la expansión de CFCs y células CD34+CD38-. No obstante, en dicho estudio al comparar la capacidad repobladora de las células provenientes de los cultivos, no encontraron diferencias entre MSCs de MO y MSCs de PD. Tales efectos podrían atribuirse a una mayor expresión de los genes *Notch 1, 2, 3* y *Lfng* así como *Nestina, Angpt1, Jag 1* y *Cxcl12* por parte de las MSCs de PD, aunque sólo los dos últimos fueron estadísticamente significativos a MSCs de MO.

La prueba *in vitro* más cercana a la evaluación *in vivo* (capacidad repobladora) es el ensayo LTC-IC. En el presente trabajo, se obtuvo un mayor I. en V. de LTC-IC utilizando MSCs de PD que MO, sin embargo, tal incremento no fue significativo.

En resumen, en el presente estudio se evaluó la capacidad de incrementar la proliferación y expansión de progenitores tardíos y tempranos de SCU, por parte de MSCs de tres fuentes dentales (G, LP y PD) y se contrastó con MSCs de MO, observándose un incremento en la proliferación de HCs similar a MO en las tres fuentes dentales y existiendo una tendencia a mayor incremento para PD. Del mismo modo, se evidenció un incremento en la expansión de HPCs tardías, mediante ensayos de formación de colonias y HPCs tempranas mediante citometría de flujo y cultivos a largo plazo por parte de MSCs de tejidos dentales, siendo éstos equiparables a MO. De este modo, en el presente trabajo se demostró la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs provenientes de los tejidos dentales G, LP y PD.

## 11. CONCLUSIONES

Las MSCs de G, LP y PD poseen una morfología e inmunofenotipo similar a las de MO. De igual manera, tienen semejante capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica pero menor capacidad adipogénica en comparación con las MSCs de MO.

Las MSCs de G, LP y PD tienen la capacidad de incrementar la proliferación de células hematopoyéticas similar a MSCs de MO.

Las MSCs de G, LP y PD poseen la capacidad de incrementar la expansión de CFCs semejante a MSCs de MO.

Las MSCs de G, LP y PD presentan capacidad de incrementar la expansión de HPCs con inmunofenotipo CD34+CD38- comparable a MSCs de MO.

Las MSCs de G, LP y PD tienen la capacidad de incrementar la expansión de LTC-IC equivalente a MSCs de MO.

## **12. PERSPECTIVAS**

Determinar la capacidad de MSCs de tejidos dentales de mantener la formación de HSCs que recapitulen la hematopoyesis en ratones inmunosuprimidos letalmente irradiados.

Determinar la capacidad de MSCs de tejidos dentales de favorecer el injerto de HSCs/HPCs mediante su co-trasplante en un modelo murino.

Determinar el potencial de MSCs de tejidos dentales de producir moléculas solubles, de membrana o de matriz extracelular que contribuyan a soportar la hematopoyesis.

Determinar la capacidad de MSCs de tejidos dentales de incrementar la proliferación y expansión de HPCs y HSCs en un sistema de co-cultivo tridimensional y compararlo con el sistema de co-cultivo bidimensional.

### 13. LITERATURA CITADA

- Agas D., Marchetti L., Douni E., Sabbieti M.G. 2015. The unbearable lightness of bone marrow homeostasis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 26(3):347-359.
- Angelopoulou M., Novelli E., Grove J.E., Rinder H.M., Civin C., Cheng L., Krause D.S. 2003. Cotrasplantation of human mesenchymal stem cells enhance human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Experimental Hematology*. 31(5):413-420.
- Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H., Lankester A., Cometa A., Egler R.M., Locatelli F., Fibbe W.E. 2007. Cotransplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 110(7):2764-2767
- Bobis S., Jarocho D., Majka M. 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*.44(4):215-230.
- Burgues A.W. 1998. Cytokine/Grow Factor responsiveness of early hemopoietic progenitor cells. En: Quesenberry P.J., Stein G.S., Forget B.G., Weisman S.M. *Stem cell: Biology and Gene Therapy*. Wiley-Liss. New York. USA.
- Calvi L.M., Link D.C. 2014. Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Calcified Tissue International*. 94(1):112-124.
- Cohen Y., Nagler A. 2004. Umbilical cord blood transplantation-how, when and for whom? *Blood Reviews*. 18(3):167-179.
- da Silva-Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. 119(Pt 11):2204-2213.
- Deans R.J., Moseley A.B. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*. 28(8):875-884.
- Delalat B., Pourfathollah A.A., Soleimani M., Mozdarani H., Ghaemi S.R., Movassaghpour A.A., Kaviani S. 2009. Isolation and *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood derived CD34+ stem cells and their cotrasplantation with or without mesenchymal stem cells. *Hematology*. 14(3):125-132.
- de Lima M., McNiece I., Robinson S.N., Munsell M., Eapen M., Horowitz M., Alousi A., Saliba R., McMannis J.D., Kaur I., Kebriaei P., Parmar S., Popat U., Hosing C., Champlin R., Bollard C., Molldrem J.J., Jones R.B., Nieto Y., Andersson B.S., Shah N., Oran B., Cooper L.J.N., Worth L., Qazilbash M.H., Korbling M., Rondon G.,

- Ciurea S., Bosque D., Maewal I., Simmons P.J., and Shpall E.J. 2012. Cord-blood engraftment with *ex vivo* mesenchymal-cell coculture. *The New England Journal of Medicine*. 367(24):2305-2315.
- DiMascio L., Voermans C., Uqoezwa M., Duncan A., Lu D., Wu J., Sankar U., Reya T. 2007. Identification of adiponectin as a novel hematopoietic stem cell grow factor. *The Journal of Immunology*. 178(6):3511-3520.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., 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.
- Eleuterio E., Trubiani O., Sulpizio M., Di Giuseppe F., Pierdomenico L., Marchisio M., Giancola R., Giammaria G., Miscia S., Caputi S., Di Ilio C. Angelucci S. 2013. Proteome of human stem cells from periodontal ligament and dental pulp. *PLOS ONE*. 8(8):1-12.
- Ema H., Morita Y., Suda T. 2014. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*. 42(2):74-82.
- Fajardo-Orduña G.R. 2012. Análisis comparativo de las capacidades de soporte hematopoyético de las células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea, sangre de cordón umbilical y placenta para mantener la formación *in vitro* de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. UNAM. México.
- Fajardo-Orduña G.R., Mayani H., Montesinos J.J. 2015. Hematopoietic support capacity of mesenchymal stem cells: biology and clinical potential. *Archives of Medical Research*. 46(8):589-596.
- Fei X.M., Wu Y.J., Chang Z., Miao K.R., Tang Y.H., Zhou X.Y., Wang L.X., Pan Q.Q., Wang C.Y. 2007. Co-culture of cord blood CD34+ cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice. *Cytotherapy*. 9(4):338-347.
- Flores-Guzmán P., Flores-Figueroa E., Montesinos J.J., Martínez-Jaramillo G., Fernández-Sánchez V., Valencia-Plata I., Alarcón-Santos G., Mayani H. 2009. Individual and combined effects of mesenchymal stromal cells and recombinant stimulatory cytokines on the *in vitro* grow of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy*. 11(4):1-11.
- Flores-Guzmán P., Gutiérrez-Rodríguez M., Mayani H. 2002. *In vitro* proliferation, expansion and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population

- from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of Medical Research*. 33(2):107-114.
- Flores-Figueroa E., Montesinos J.J., Mayani H. 2006. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica*. 58(5):498-511.
- Friedman J.W. 2007. The prophylactic extraction of third molars: a public health hazard. *American Journal of Public Health*. 97(9):1554-1559
- Frisch B.J., Porter R.L., Calvi L.M. 2008. Hematopoietic niche and bone meet. *Current opinion in supportive and palliative care*. 2(3):211-217.
- Gartner L.P. y Hiatt J.L. 1997. *Histología Texto y Atlas*. McGraw-Hill. México.
- Gay I.C., Chen S., MacDougall M. 2007. Isolation characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & Craniofacial Research*. 10(3):149-160.
- Gómez F.M.E., Campos M.A. 2002. *Histología y embriología bucodental. 2ª ed.* Médica Panamericana. España.
- Gonzalo-Daganzo R., Regidor C., Martín-Donaire T., Rico M.A., Bautista G., Krsnik I., Forés R., Ojeda E., Sanjuán I., García-Marco J.A., Navarro B., Gil S., Sánchez R., Panadero N., Gutiérrez Y., García-Berciano M., Pérez N., Millán I., Cabrera R., Fernández M.N. 2009. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy*. 11(3):278-288.
- Greco V. y Guo S. 2010. Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches. *Development*. 137(10):1586-1594.
- Grontos S., Mankani M., Brahim J., Robey P.G., Shi S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(25):13625-13630.
- Gunsilius E., Gastl G., Petzer. 2001. Hematopoietic stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 55(4):186-194.
- Hakki S.S., Kayis S.A., Hakki E.E., Bozkurt S.B., Duruksu G., Unal Z.S., Turaç G., Karaoz E. 2015. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *Journal of Periodontology*. 86(2):283-291.



- Harrington J., Sloan A.J., Waddington R.J. 2014. Quantification of clonal heterogeneity of mesenchymal progenitor cells in dental pulp and bone marrow. *Connective Tissue Research*. 55(S1):62-67.
- Heyworth C.M., Testa N.G. Buckle A.-M., Whetton A.D. 1997. Growth factors and the regulation of haemopoietic stem cells. En: Potten C.S. *Stem cells*. 1<sup>st</sup> ed. Academic Press. London.
- Huang C.-E., Hu F.-W., Yu C.-H., Tsai L.-L., Lee T.-H., Chou M.-Y., Yu C.-C. 2014. Concurrent expression of *Oct4* and *Nanog* maintains mesenchymal stem like property of human dental pulp cells. *International journal of molecular Sciences*. 15(10): 18623-18639.
- 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.
- Ivanovski S. Gronthos S. Bartold S.S. 2006. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Diseases*. 12(4):358-363.
- Iwasaki K., Komaki M., Yokoyama N., Tanaka Y., Taki A., Kimura Y., Takeda M., Oda S., Izumi Y., Morita I. 2013. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *Journal of Periodontology*. 84(10):1425-1433.
- Kadereit S., Deeds L.S., Haynesworth S.E., Koc O.N., Kozik M.M., Szekely E., Daum-Woods K., Goetchius G.W., Fu P., Welniak L.A., Murphy W.J., Laughlin M.J. 2002. Expansion of LTC-IC and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34+/CD38- early progenitors cultured over human MSC as feeder layer. *Stem Cells*. 20(6):537-582.
- Kekre N., Antin J.H. 2014. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21<sup>st</sup> century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 124(3):334-343.
- Kim S.J., Cho H.H., Kim Y.J., Seo S.Y., Kim H.N., Lee J.B., Kim J.H., Chung J.S., Jung J.S. 2005. Human adipose stromal cells expanded in human serum promote engraftment of human peripheral blood hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 329(1):25-31.
- Kim S.S., Kwon D.-W., Im I., Kim Y.-D., Hwang D.-S., Holliday L.S., Donatelli R.E., Son W.-S., Jun E.-S. 2012. Differentiation characteristics of undifferentiated mesenchymal stem cells originating from adult premolar periodontal ligament. *The Korean Journal of Orthodontics*. 42(6):307-317.

- Kondo M., Wagers A.J., Manz M.G., Prohaska S.S., Scherer D.S., Beilhack G.F., Shizuru J.A., Weissman I.L. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for Clinical Application. *Annual Review of Immunology*. 21:759-806.
- Laberger T., Cheung H.S. 2011. Multipotent Dental Stem Cells: An Alternative Adult Derived Stem Cell Source for Regenerative Medicine. En: Kallos M.S. *Embryonic Stem Cells - Differentiation and Pluripotent Alternatives*. INTECH. <http://www.intechopen.com/books/embryonic-stem-cells-differentiation-and-pluripotent-alternatives/multipotent-dental-stem-cells-an-alternative-adult-derived-stem-cell-source-for-regenerative-medicin>.
- Lazarus H.M., Koç O.N., Devine S.M., Curtin P., Maziars R.T., Holland H.K., Shpall E.J., Mcarthy P., Atkinson K., Cooper B.W., Gerson S.L., Laughlin M.J., Loberiza F.R., Moseley A.B., Bacigalupo A. 2005. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 11(5):389-398.
- Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., Ljungman P., Lönnies H., Nava S., Ringdén O. 2007. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 21(8):1733-1738.
- Lilly A.J., Johnson W.E., Bunce C.M. 2011. The haematopoietic stem cell niche: New insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behavior. *Stem Cells International*. 2011: 274564.
- Liu J. Yu F., Sun Y., Jiang B., Zhang W. Yang J., Xu G-T., Liang A., Liu S. 2015. Concise Reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 33(3): 627-638.
- Lo Celso C. y Scadden D.T. 2011. The haematopoietic stem cell niche at a glance. *Journal of Cell Science*. 124(21):3529-3535.
- Luan X., Li G., Wang G., Wang F., Lin Y. 2012. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34+ cells: A comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*. 45(1): 32-38.
- MacMillan M.L., Blazar B.R., DeFor T.E., Wagner J.E. 2009. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I–II clinical trial. *Bone Marrow Transplantation*. 43(6):447-454.

- Maitra B., Szekely E., Gjini K., Laughlin M.J., Dennis J., Haynesworth S.E., Koç O.N. 2004. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T cell activation. *Bone Marrow transplantation*. 33(6):597-604.
- Majumdar M.K., Thiede M., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S. 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*. 176(1):57-66.
- Marynka-Kalmani K., Treves S. Yafee M., Rachima H., Gafni Y., Cohen M.A., Pitaru S. 2010. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells*. 28(5):984-995.
- Mayani H., Flores-Figueroa E., Pelayo R., Montesinos J.J. Flores-Guzmán P., Chávez-González A. 2007. Hematopoiesis. *Cancerología*. 2(2007):95-107.
- Mecanin D., Mrozik K.M., Wada N., Marino V., Shi S., Bartold P.M., Gronthos S. 2014. Periodontal ligament derived stem cells exhibit the capacity for long term survival, self-renewal, and regeneration of multiple tissue types in vivo. *Stem cells and development*. 23(9):1001-1011.
- Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferrano F., Mazloom A.R., MacArthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette. P.S. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells a unique bone marrow niche. *Nature*. 466(7308):829-834.
- Meuleman N, Tondreau T, Ahmad I, Kwan J, Crokaert F., Delforge A., Dorval C., Martia P., Lewalle P., Lagneaux L., Bron D. 2009. Infusion of mesenchymal stromal cells can aid hematopoietic recovery following allogeneic hematopoietic stem cell myeloablative transplant: a pilot study. *Stem Cells and Development*. 18(9):1247-1252.
- Minguell J.J., Erices A., Conget P. 2001. Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 226(6):507-520.
- Mitrano T.I., Grob M.S., Carrión F., NovaLamperti E., Luz P.A., Fierro F.S., Quintero A., Chaparro A., Sanz A. 2010. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *Journal of Periodontology*. 81(6):917-925.
- Montesinos J.J., Flores-Figueroa E., Castillo-Medina S., Flores-Guzmán P., Hernandez-Estéves E., Fajardo-Orduña G., Orozco S., Mayani H. 2009. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*. 11(2):163-176.

- Morrison S.J., Scadden D.T. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 505(7483):327-334
- Nakao N., Nakamura T., Yahata T., Mugurama Y., Saito S., Miyata Y., Yamamoto K., Naoe T. 2010. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate haematopoiesis *in vitro* and *in vivo*. *American Journal of Pathology*. 177(2):547-554.
- Nakatsuka R., Matsuoka Y., Uemura Y., Sumide K., Iwaki R., Takahashi M., Fujioka T., Sasaki Y., Sonoda Y. 2015. Mouse dental pulp stem cells support human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells *in vitro*. *Cell Transplantation*. 24(1):97-113.
- Navabazam A.R., Nodoshan F.S., Sheikhha M.H., Miresmaeili S.M., Soleimani M., Fesahat F. 2013. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 11(3):235-242.
- Ning H., Yang F., Jiang M., Hu L., Feng K., Zhang J., Yu Z., Li B., Xu C., Li Y., Wang J., Hu J., Lou X., Chen H. 2008. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 22(3):593-599.
- Nishiwaki S., Nakayama T., Saito S., Mizuno H., Ozaki T., Takahashi Y., Maruyama S., Nishida T., Murata M., Kojima S., Naoe T. 2012. Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. *International Journal of Hematology*. 96(3):295-300.
- Oliveros J.W., Sandoval C., Cires R.S., Blum M.A., Tafur A. 2003. Trasplante de células hematopoyéticas. *Medicina*. 9(2):174-185.
- Pelayo R., Vadillo E. 2011. El sistema hematopoyético. En: Pelayo R., Santa-Olalla J., Velasco I. *Células troncales y medicina regenerativa*. 1ed. Ediciones Buena Onda. México.
- Pierdomenico L., Bonsi L., Calvitti M., Rondelli D., Arpinati M., Chirumbolo G., Becchetti E., Marchionni C., Alviano F., Fossati V., Staffolani N., Franchina M., Grossi A., Bagnara G.P. 2005. Multipotent Mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 80(6): 836-842.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411):143-147.

- Poltavtseva R.A., Nikonova Y.A., Selezneva I.I., Yaroslavtseva A.K., Stepanenko V.N., esipov R.S., Pavlovich S.V., Klimantsev I.V., Tyutyunnik N.V., grebennik T.K., Nikolaeva A.V., Sukhikh G.T. 2014. Mesenchymal stem cells from human dental pulp: Isolation, characteristics and potencies of targeted differentiation. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 158(1):164-169.
- Ponnaiyan D., Jegadeesan V. 2014. Comparison of phenotype and differentiation marker gene expression profiles in human dental pulp and bone marrow mesenchymal stem cells. *European Journal of Dentistry*. 8(3):307-313.
- Potdar P.D., Jethmalani Y.D. 2015. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*. 7(5):839-851.
- Pountos I., Corscadden D., Emery P., Giannoudis P.V. 2007. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 38(S4): S23-S33.
- Rao M., Mattson M.P. 2001. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mechanism of Ageing and Development*. 122(7):713-734.
- Robinson S.N., Ng J., Niu T., Yang H., McMannis J.D., Karandish S., Kaur I., Fu P., Del Angel M., Messinger R., Flagge F. de Lima M. Decker W., Xing D., Champlin R., Shapall E.J. 2006. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Bone Marrow Transplantation*. 37(4):359-366.
- Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., Smirnov V.N. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem cells*. 21(1):105-110.
- Saleh M., Shamsasanjan K., Movassaghporakbari A., Akbarzadehlaleh P., Moulaeipour Z. 2015. The impact of mesenchymal stem cells on differentiation of hematopoietic stem cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 5(3):299-304.
- Secunda R., Vennila R., Mohanashankar A.M., Rajasundari M., Jeswanth S., Surendran R. 2015. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*. 67(5):793-807
- Seo B.-M., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahim J., Young M., Robey P.G., Wang C.-Y. Shi S. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 364(9429):149-55.

- Shi S., Gronthos S. 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*. 18(4): 698-704.
- Short B., Brouard N., Occhiodoro-Scott T., Ramakrishnan A., Simmons P.J. 2003. Mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research*. 34(6):565-571.
- Siegel G., Kluba T. Hermanutz-Klein U., Bieback K., Northoff H., Schäfer R. 2013. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Medicine*. 11(146):1-20.
- Song M., Kim H., Choi Y., Kim K., Chung C. 2012. Skeletal myogenic differentiation of human periodontal ligament stromal cells isolated from orthodontically extracted premolars. *Korean Journal of Orthodontics*. 42(5):249-254.
- Sottocornola R. y Lo Celso C. 2012. Dormancy in the stem cell niche. *Stem Cell Research and Therapy*. 3(10):1-6.
- Stephens P., Genever P. 2007. Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Diseases*. 13(1):1-10.
- Suchánek J., Soukup T., Ivančáková R., Karbanová J., Hubková V., Pylík R. 2007. Human dental pulp stem cells- Isolation and long term cultivation. *Acta Medica*. 50(3):195-201.
- Sukhikh G.T., Malaitsez V.V., Bogdanova I.M. Dubrovina I.V. 2001. Mesenchymal stem cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 133(2): 103-109.
- Taichman R.S., Reily M.J., Emerson S.G. 1996. Human osteoblast support hematopoietic progenitors in bone marrow cultures. *Blood*. 87(2): 518-524.
- Taichman R.S., Emerson S.G. 1998. The role of osteoblast in hematopoietic microenvironment. *Stem cells*. 16(1):7-15.
- Tang L. Li N. Xie H. Jin Y. 2010. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *Journal of Cellular Physiology*. 226(3):832-842.
- Tieu K.S., Tieu R.S., Martinez-SAgosto J., Sehl M.E. 2012. Stem cell niche dynamics: From homeostasis to carcinogenesis. *Stem Cells International*. 2012:1-9.
- Tran H.L.B., Doan V.N. 2014. Various methods for isolation of multipotent human periodontal ligament cells for regenerative medicine. *In Vitro Cell & Developmental Biology Animal*. 50(7):597-602.
- Travlos G. 2006. Normal structure, function and histology of the bone marrow. *Toxicologic Pathology*. 34(5):538-565.

- Ugarte F. y Forsberg E.C. 2013. Haematopoietic stem cell niches new insights inspire new questions. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 32(19):2535-2547.
- Vasandan A.B., Shankar S.R., Prasad P., Jahnavi V.S., Bhonde R.R., Prasanna S.J. 2014. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 18(2):344-354
- Wagner W., Roderburg C., Wein F., Diehlmann A., Frankhauser M., Schubert R., Ecstein V., Ho A.D. 2007. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 25(10):2638-2647.
- Walenda T., Bokermann G., Ventura F.M.S., Piroth D.M., Hieronymus T., Neuss S., Zenke M., Ho A.D., Müller A.M., Wagner W. 2011. Synergistic effect of grow factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Experimental Hematology*. 39(6):617-628.
- Wang H., Yan H., Wang Z., Zhu L., Liu J., Guo Z. 2012. Cotransplantation of allogenic mesenchymal and hematopoietic stem cells in children with aplastic anemia. *Pediatrics*. 129(6):e1612-e1615.
- Wang J.-F., Wang L.-J., Wu Y.-F., Xiang Y., Xie C.-G., Jia B.-B., Harrington J., McNiece I.K. 2004. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34+ hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Stem Cell Transplantation*. 89 (7):837-844.
- Weissman I.L. 2000. Stem Cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100(1):157-168.
- Wognum A.W., Eaves A.C., Thomas T.E. 2003. Identification and isolation of Hematopoietic Stem Cells. *Archives of Medical Research*. 34(6):461-475.
- Xiong Y.-Y., Fan Q., Huang F., Zhang Y., Wang Y., Chen X.-Y., Fan Z.-P., Zhou H.-S., Xiao Y., Xu X.-J., Dai M., Xu N., Sun J., Xiang P., Huang X.-J., Liu Q.-F. 2014. Mesenchymal stem cells versus mesenchymal stem cell combined with cord blood for engraftment failure after autologous hematopoietic stem cell transplantation: A pilot prospective, open-label, randomized trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 20(2):236-242.
- Yamazaki S., Ema H., Karlsson G., Yamaguchi T., Miyoshi H., Shioda S., Taketo M.M., Karlsson S., Iwama A., Nakauchi H. 2011. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *147(5):1146-1158*.

- Zhang J., An Y., Gao L.-N., Zhang Y.-J., Jin Y., Chen F.-M. 2012. The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. *Biomaterials*. 33(29):6974-6986.
- Zhang Q., Shi S., Liu Y., Uyane J., Shi Y., Shi S., Le A.D. 2009. Mesenchymal stem cells derived from human gingival are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *The Journal of Immunology*. 183(12):7787-7798.
- Zhang Q.Z., Nguyen A.L., Yu W.H. Le A.D. 2012. Human oral mucosa and gingival: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research*. 91(11):1011-1018.