



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA IDENTIFICACIÓN DE
CÉLULAS MESENQUIMALES DE LA PULPA DENTAL.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ANGÉLICA CASIMIRO JUÁREZ

TUTORA: Dra. MARGARITA VICTORIA GARCÍA GARDUÑO

ASESORA: Mtra. JUANA PAULINA RAMÍREZ ORTEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Mamá y Papá Muchas Gracias por su esfuerzo, gracias por su dedicación, gracias por darme la oportunidad de tener una carrera profesional. ¡Gracias por su apoyo siempre incondicional, son una guía en mi vida!!! sin ustedes esto no hubiera sido posible.

Hermano Muchas Gracias por tu paciencia, gracias por tu comprensión, gracias por tu apoyo incondicional, eres parte de este logro.

Guille, Muchas Gracias por estar conmigo en esta etapa de mi vida, gracias por tu apoyo y tu comprensión. Gracias por alentarme a seguir en los momentos difíciles.

Joana Gracias por tu amistad, tu compañía y tu apoyo en todo momento.

Doctora Margarita García Garduño y Doctora Paulina Ramírez Ortega GRACIAS por su apoyo y su compromiso para guiarme en la realización de esta tesina, gracias por su paciencia.

Doctora Luz del Carmen González García GRACIAS por su tiempo y su compromiso para que lográramos concluir satisfactoriamente nuestra licenciatura.

Doctora Laura Vargas Ulloa Gracias por su compromiso y sus aportaciones a esta tesina. GRACIAS a cada uno de mis profesores de la Facultad de Odontología por aportarme sus conocimientos, sus experiencias y así formarme profesionalmente.

ORGULLOSAMENTE UNAM
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU".

ÍNDICE

| | Página. |
|---|---------|
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| Objetivo general | 7 |
| Objetivos específicos | 7 |
| Glosario | 8 |
| 1. CAPÍTULO 1 GENERALIDADES | 9 |
| 1.1 Pulpa dental | 9 |
| 1.2 Células mesenquimales | 11 |
| 1.3 Células troncales | 11 |
| 1.4 Células troncales mesenquimales | 13 |
| 1.4.1 Criterios para considerar a una célula, como célula troncal mesenquimal | 14 |
| 1.5 Células troncales mesenquimales de pulpa dental | 15 |
| 1.6 Regeneración de tejidos | 16 |
| 1.6.1 Factores de crecimiento | 16 |
| 1.6.2 Andamios (matrices) | 21 |
| 1.6.3 Micro andamios 3D | 23 |
| 2. CAPÍTULO 2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL | 26 |
| 2.1 Métodos de aislamiento | 26 |
| 2.1.1 Cultivo por explante | 26 |
| 2.1.2 Disgregación enzimática | 26 |
| 2.2 Medios de diferenciación | 28 |
| 2.2.1 Diferenciación osteogénica | 30 |
| 2.2.2 Diferenciación adipogénica | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.2.3 Diferenciación condrogénica..... | 30 |
| 2.3 Caracterización fenotípica..... | 35 |
| 2.3.1 Marcadores genéticos de diferenciación para la identificación de células madre mesenquimales..... | 35 |
| 2.3.2 Marcadores mesenquimales específicos..... | 37 |
| 3. CAPÍTULO 3 ALMACENAMIENTO Y CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL..... | 43 |
| CONCLUSIONES..... | 48 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |

INTRODUCCIÓN

La realización de una revisión sistemática con respecto al estudio de las células mesenquimales de la pulpa dental incluye varios aspectos que se deben estudiar y que en general se describen en las siguientes páginas. La información fue obtenida de artículos científicos en los cuales se detallaron aspectos tales como: definición de células madre mesenquimales, aislamiento, cultivo, diferenciación y caracterización de dichas células.

Las células troncales mesenquimales, en los últimos años se han considerado entre las de mayor expectativa para su aplicación en medicina regenerativa. Para poder hacer uso terapéutico de estas células es necesario conocer la metodología para su identificación, esto incluye identificación a través de marcadores de superficie, aislamiento por medio de mecanismos de digestión enzimática o explante, almacenamiento y criopreservación.

La ingeniería de tejidos es una disciplina que exige el conocimiento de conceptos básicos como son características principales de las células madre mesenquimales de pulpa dental, factores de crecimiento, andamios y micro andamios 3D; ésto con la finalidad de poder llevar a cabo procedimientos de regeneración del complejo dentino-pulpar; los procedimientos de aislamiento, identificación y diferenciación se han hecho *in vitro* y se ha experimentado con animales los beneficios de estas células. Actualmente en lo que se refiere a la identificación de las células madre mesenquimales de la pulpa dental la caracterización fenotípica es utilizada para poder diferenciarlas de otro tipo celular y esto se lleva a cabo por medios inmunofluorescencia y citometría de flujo. También son utilizadas técnicas de RT-PCR y Western blot para identificar la expresión de ciertos marcadores genéticos y así poder determinar la diferenciación celular de las células mesenquimales de pulpa dental hacia linajes osteogénico, odontogénico, condrogénico y adipogénico.

OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión sistemática de la literatura con respecto a los diferentes métodos utilizados para la identificación de células mesenquimales de la pulpa dental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir características generales del tejido pulpar.
2. Definir qué es una célula mesenquimal, describir características de las células troncales, células troncales mesenquimales y células troncales mesenquimales de pulpa dental.
3. Conocer los criterios mínimos para identificar a una célula, como célula mesenquimal.
4. Describir los métodos de aislamiento de células mesenquimales.
5. Describir cuáles son los medios de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.
6. Describir en qué consiste la caracterización fenotípica.
7. Describir cómo es que se identifican los marcadores específicos o mesenquimales de las células.
8. Conocer características principales de los marcadores específicos que se involucran en la identificación y diferenciación de las células mesenquimales de pulpa dental.
9. Conocer cómo se lleva a cabo la identificación de marcadores genéticos que ayudan a la diferenciación de las células de pulpa dental.
10. Describir en que consiste la criopreservación de células troncales mesenquimales de pulpa dental.
11. Conocer el beneficio de la utilización de células madre mesenquimales de la pulpa dental para la regeneración de diversos tejidos.

GLOSARIO.

| | |
|---------------------------------|--|
| ACAN | Agrecano. |
| ALP | Fosfatasa alcalina. |
| BSP2 | Sialoproteína ósea 2. |
| COL1A1 | Colágeno tipo 1 alfa-1. |
| COL10A1 | Colágeno tipo-X. |
| COL2A1 | Colágeno tipo 2 alfa-1. |
| LPL | Lipoproteína lipasa. |
| OCN | Osteocalcina. |
| ON | Osteonectina. |
| OPN | Osteopontina. |
| OSX | Osterix. |
| PPAR-γ | Proliferador de peroxisoma receptor gamma activado. |
| RUNX2 | Factor regulador de la expresión de genes que codifican las principales proteínas de hueso. |

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

1.1 PULPA DENTAL

Para la mejor comprensión de la obtención e identificación de células madre mesenquimales del tejido pulpar, es necesario describir las características generales de dicho tejido. La pulpa dental es un tejido conjuntivo laxo innervado y vascularizado rodeado por una capa de odontoblastos, tiene su origen embriológico en la papila dental, que es tejido ectomesenquimático derivado de la cresta neural.¹ Está formado por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica. Esta última está constituida por células y matriz extracelular representada por fibras y sustancia fundamental. Dentro del componente celular se encuentran los odontoblastos que son células específicas del tejido pulpar, situadas en la periferia adyacentes a la predentina. Las células principales y más abundantes de la pulpa son los fibroblastos, estos secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas, así como la sustancia fundamental. Las células pulpares de reserva se denominan también células mesenquimáticas indiferenciadas, pero derivan del ectodermo de la cresta neural. Son la población de reserva pulpar, por su capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos productores de dentina o en fibroblastos productores de matriz pulpar, según el estímulo que actué sobre ellas.¹ Se ubican en la región subodontoblástica o en la proximidad de los capilares sanguíneos. Son difíciles de diferenciar de los fibroblastos en cortes histológicos teñidos con HE. Se describen como células de menor tamaño y de aspecto estrellado. Las células mesenquimáticas indiferenciadas del periápice son las que pueden dar lugar a las distintas líneas celulares: fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos y ocasionalmente odontoblastos, como respuesta biológica a determinadas situaciones clínicas. El grupo de células de defensa del tejido pulpar está integrado por macrófagos y su función consiste en digerir microorganismos, y eliminar bacterias y células muertas, las células

dendríticas se distribuyen en la pulpa configurando un retículo, su función es iniciar la respuesta inmunológica primaria. También existen fibras colágenas tipo I, representa el 55% del colágeno pulpar, fibras reticulares que son fibrillas de colágeno tipo III asociadas a fibronectina y fibras elásticas que son muy escasas y se componen de elastina¹ como se observa en la figura 1.

La sustancia fundamental está constituida principalmente por proteoglucanos, que están formados por cadenas de glucosaminoglucanos (GAG). Los GAG más significativos presentes en la pulpa son: condroitín 4 y 6 sulfato (60%), dermatán sulfato (34%), keratán sulfato (2%) y ácido hialurónico (2%). Los proteoglucanos contribuyen a la viscosidad de la matriz intercelular de la pulpa y dan a la misma un carácter gelatinoso.

En la sustancia fundamental es prevalente la fibronectina, que es una glucoproteína extracelular, que actúa como mediadora de adhesión celular, uniendo a las células entre sí y los componentes de la matriz.¹

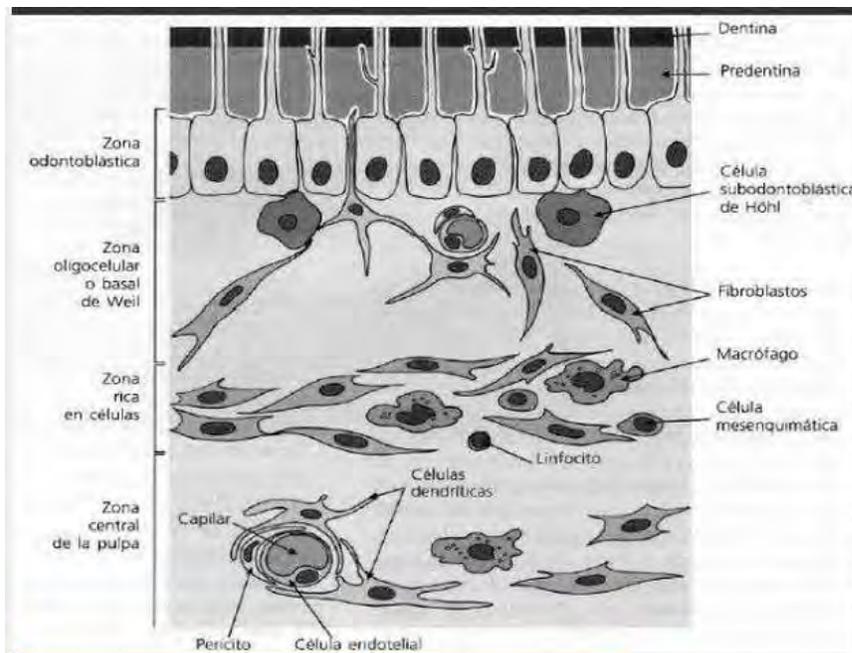


Figura 1. Componentes celulares de la pulpa dental.²

1.2 CÉLULAS MESENQUIMALES

Células con núcleo oval con cromatina fina y de nucléolo prominente, poseen numerosas prolongaciones citoplasmáticas inmersas en una matriz extracelular abundante, viscosa y con escasas fibras.³ (Figura 2)

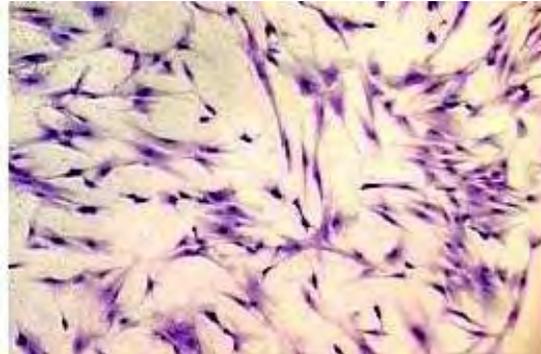


Figura 2. Morfología de células mesenquimales.⁴

1.3 CÉLULAS TRONCALES

Se define a la célula troncal con base en sus características funcionales. Tiene la capacidad de autorenovación, no diferenciadas y son capaces de generar células que pueden diferenciarse al menos en un linaje particular.

El término **no diferenciadas** se refiere a que estas células no tienen una función determinada en algún tejido u órgano, una célula troncal, aunque se localice en un tejido en particular no adquiere las características propias de ese tejido para llevar a cabo las funciones determinadas; mientras que la autorenovación es la capacidad que tienen las células de producir células idénticas a la inicial, lo que permite el mantenimiento de su población. Cuando una célula troncal se divide, puede dar lugar a dos células troncales, o se puede generar una célula troncal y una progenitora, esta última con la capacidad de diferenciarse a otros linajes celulares.⁵

Las células troncales tienen distintos potenciales de diferenciación, con base a esta característica, se clasifican en: totipotentes, pluripotentes y

multipotentes. Por ejemplo, cigoto es una célula troncal totipotente, ya que es capaz de generar todas las estructuras embrionarias y extraembrionarias.

Las células troncales pluripotentes son capaces de formar todos los tipos celulares de un organismo adulto. A partir de estas células se diferencian las tres capas germinales, de las cuales se generan los diferentes tejidos y órganos de un individuo: ectodermo (que origina piel y linajes neurales), mesodermo (que da origen a la sangre, tejido adiposo, músculo, hueso y cartílago) y endodermo (que origina tejidos del tracto digestivo y respiratorio).⁵

Las células troncales multipotentes o somáticas tienen capacidad de autorenovación y diferenciación limitada. Son capaces de formar todos los tipos celulares diferenciados del tejido al cual pertenecen. Algunas células troncales multipotentes cuando son cultivadas *in vitro* con medios específicos, tienen la capacidad de generar células con características de otros tejidos, a esta propiedad biológica se le denomina plasticidad celular.⁵

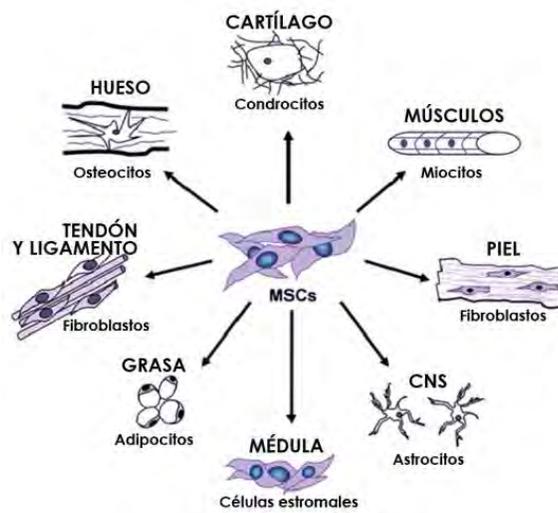


Figura 3. Plasticidad celular, capacidad de generar células con características de otros tejidos.⁶

1.4 CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES.

Las células troncales mesenquimales (MSC) son las más ampliamente estudiadas y son un tipo de célula madre adulta utilizada en terapia celular. A pesar de que presentan menor potencial de proliferación y menor plasticidad que las células madre embrionarias y las células madre inducidas, son más fáciles de obtener de los tejidos, no crean problemas éticos para su manipulación, presentan alta capacidad de expansión *in vitro* además bajo potencial para la formación de teratomas. Fueron descritas por primera vez en 1968 por Friedenstein y cols, como unidades formadoras de colonias, de aspecto fibroblastoide, que se adherían al plástico en cultivo y con capacidad de regenerar tejido óseo *in vivo*. Las MSC poseen una elevada capacidad inmunomoduladora, regenerativa y de cicatrización; regulan la secreción paracrina de factores de crecimiento, citocinas, factores antifibróticos y mediadores angiogénicos. Tienen función regenerativa en tejidos como piel, hueso, cartílago, hígado, córnea, debido a su capacidad de diferenciarse a células especializadas como los condrocitos, osteocitos, células epiteliales, células del riñón y células epiteliales pigmentarias de la retina. También tienen eficacia en la regeneración de tejido periodontal, del miocardio y el sistema nervioso⁷, se puede observar en la figura 4.

Figura 4. Función regenerativa de las células troncales mesenquimales.⁸



1.4.1 CRITERIOS MÍNIMOS PARA CONSIDERAR A UNA CÉLULA, COMO CÉLULA TRONCAL MESENQUIMAL.

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular, redefinió las características mínimas necesarias para que una célula fuera considerada célula troncal mesenquimal, quedando de la siguiente manera:

1. Las células troncales mesenquimales deben tener capacidad de adherencia al plástico en cultivo.
2. Morfología celular fibroblastoide.
3. Expresar los antígenos (marcadores) de superficie CD73, CD90 y CD105 en ausencia de otros antígenos hematopoyéticos del tipo CD34, CD45 y marcadores típicos de linfocitos B, monocitos y macrófagos.
4. Ser multipotentes y presentar una alta plasticidad para diferenciarse *in vitro* bajo condiciones estándar de cultivo a osteoblastos, osteocitos, adipocitos y condrocitos.⁷

Es importante identificar a las MSC de otro tipo celular como son los fibroblastos y esto se hace por medio de la caracterización de los marcadores específicos de superficie. Las MSC deben ser positivas a CD73, CD90 y CD105 y negativas a CD14, CD34 Y CD45, es importante identificar nuevos marcadores que diferencien MSC (CD106, CD146, ITGA11) y fibroblastos (CD10, CD26).⁷

1.5 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE LA PULPA DENTAL.

Las células troncales de la pulpa dental (DPSCs), representan un nicho de células troncales mesenquimales, que tienen la capacidad de autorenovarse y diferenciarse (Figura 5). Se ha demostrado que estas células se diferencian *in vitro* e *in vivo*, en odontoblastos, osteoblastos, neuroblastos, condrocitos, fibroblastos y endotelio según el estímulo que actué sobre ellas.⁹ Han sido ampliamente estudiadas con el fin de conseguir la regeneración *in vivo* del complejo dentino-pulpar. En el año 2000, Gronthos y cols, aislaron células madre de la pulpa dental humana de dientes permanentes, estas tenían la capacidad de regenerar un complejo dentino-pulpar similar al original. Además, se ha reportado que estas células pueden ser fácilmente criopreservadas durante largos periodos de tiempo y conservan su multipotencia y capacidad de producir hueso. Están localizadas en la región perivascular y la zona de Hohl, con abundantes células, es adyacente a la capa de odontoblastos. Shi y cols, demostraron que la expresión de los marcadores CD146+ y STRO-1+ de las células troncales de la pulpa dental es restringida en las paredes de los vasos sanguíneos y están ausentes en los alrededores del tejido fibroso y perineuro, indicando que las DPSCs se localizan en la región perivascular de la pulpa.⁹

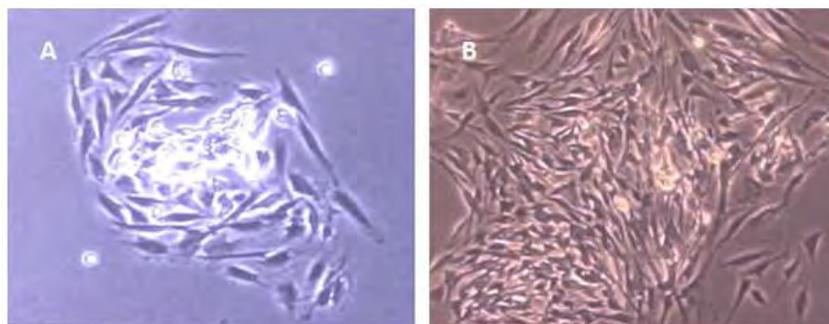
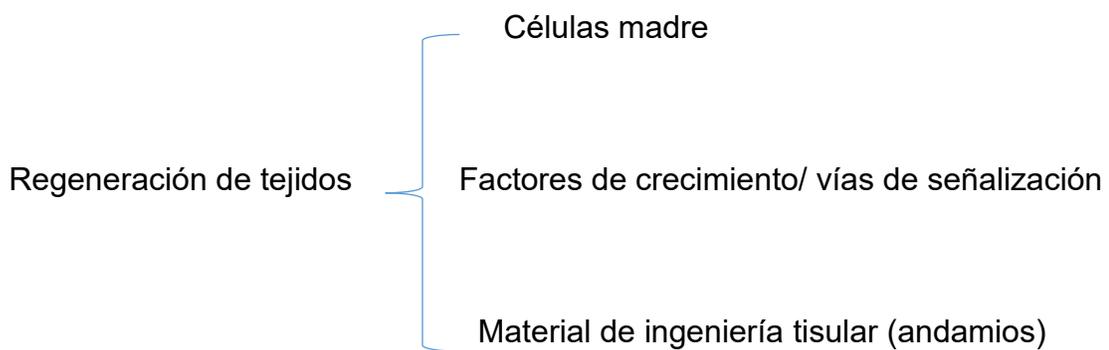


Figura 5. Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental, A. Cuatro días de cultivo, una colonia
B. Siete días de cultivo, colonias de mayor tamaño, células fusiformes y estrelladas.¹⁰

1.6 REGENERACIÓN DE TEJIDOS.

Es necesario tener presentes aspectos básicos e importantes como son los factores de crecimiento y andamios, además de lo que es una célula madre o célula troncal mesenquimal para entender las múltiples aplicaciones que tienen en la ingeniería de tejidos.¹¹ Para traducir la promesa de células madre en realidad terapéutica, cada uno de estos componentes tiene que ser optimizado sincrónicamente.



1.6.1 FACTORES DE CRECIMIENTO.

Los factores de crecimiento son polipéptidos o proteínas que se unen a receptores específicos en la superficie de las células, pueden iniciar una cascada de señalización intracelular y actuar de una manera autocrina o parácrina son utilizados para controlar la división de las células madre: al aumentar la tasa de proliferación, inducir la diferenciación, estimular a las células madre para sintetizar y secretar matriz mineralizada, así como para inducir la regeneración de tejidos.¹¹

Se ha evaluado la capacidad de distintos factores de crecimiento para desencadenar la diferenciación de células madre mesenquimatosas en células tipo odontoblasto. Por ejemplo, se ha demostrado que la aplicación

de dexametasona aumenta la diferenciación de las células de la pulpa dental humana en células tipo odontoblasto. Cambiando la composición de los factores de crecimiento se puede alterar por completo la diferenciación de las células mesenquimatosas, de modo que la misma población celular puede presentar marcadores de odontoblastos, condrocitos o adipocitos, dependiendo de su exposición a distintas combinaciones de factores de crecimiento,¹² como se describe en el cuadro 1.

Existen varios estudios en donde se ha demostrado que las DPSC son capaces de diferenciarse en osteoblastos cuando se cultivan en medio osteogénico suplementado con dexametasona, beta-glicerofosfato y ácido ascórbico.

En una revisión realizada por Kim y cols, en el año 2012, se analizaron los efectos de diversos factores de crecimiento en las células de la pulpa dental y también se exploró cómo algunos de los factores de crecimiento pueden participar en la regeneración del complejo dentino-pulpar.¹³

Es importante tener en cuenta los efectos de los factores de crecimiento, para así poder determinar su uso en los medios de diferenciación de células mesenquimales de pulpa dental. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) participa en la angiogénesis, también puede inducir la quimiotaxis, la proliferación de células mesenquimales y estimulan la síntesis de proteínas de la matriz de la dentina, pero parecen inhibir la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en las células de la pulpa dental en cultivo.

Cuadro 1. Efecto de algunos factores de crecimiento.¹²

| Factores de crecimiento | Fuente de las células | Fenotipo | Condiciones | Autores |
|--|-------------------------------|-------------------|--------------------------|--|
| Dexametasona | Pulpa dental humana | Tipo odontoblasto | In vitro x 8 semanas | Huang et al., 2006 ⁵⁴ |
| Dexametasona y Vitamina D ₃ | Pulpa dental humana | Tipo odontoblasto | In vitro x 8 semanas | Huang et al., 2006 ⁵⁴ |
| Dexametasona y ascorbato-2-fosfato y β-glicerofosfato | Pulpa dental humana o de rata | Tipo odontoblasto | In vitro x 3 semanas | Wei et al., 2007 ¹³¹ Zhang et al., 2005 ¹⁴³ |
| Insulina e indometacina y 3-isobutil-1-metilxantina (IMBX) | Pulpa dental humana | Adipocito | In vitro x 19 días | Wei et al., 2007 ¹³¹ |
| Dexametasona e insulina y ascorbato-2-fosfato y piruvato sódico y TGF-β1 | Pulpa dental humana | Condrocito | In vitro x 8 semanas | Wei et al., 2007 ¹³¹ |
| Factor 11 de crecimiento y diferenciación 11 (Gdf11) | Pulpa dental | Tipo odontoblasto | In vitro/in vivo 10 días | Nakashima et al., 2004 ¹⁵ |
| Simvastatina (estatinas) | Pulpa dental humana | Tipo odontoblasto | In vitro/in vivo | Okamoto et al., 2009 ⁸⁸ |
| Proteína 1 de mineralización LIM (LMP-1) | Pulpa dental humana | Tipo odontoblasto | In vitro/in vivo | Wang et al., 2007 ¹³⁰ |
| Proteínas morfogénicas del hueso | Pulpa dental | Tipo odontoblasto | In vitro | Saito et al., 2004 ⁸⁸ Sloan et al., 2000 ¹⁰⁸ Chen et al., 2008 ¹⁵ |
| TGF-β1-3 | Pulpa dental de rata o mono | Tipo odontoblasto | In vitro | Sloan et al., 1999 ¹⁰ |
| Dentina desmineralizada | Pulpa humana o de roedor | Tipo odontoblasto | In vitro/in vivo | Smith et al., 1990 ¹¹² Smith et al., 2001 ¹¹¹ Tziafas, 2004 ¹⁷⁸ |
| Factor de crecimiento nervioso (NGF) | Papila apical inmortalizada | Tipo odontoblasto | In vitro | Arany et al., 2009 ¹⁷ |
| Factor 2 de crecimiento de los fibroblastos | Pulpa dental humana | Tipo odontoblasto | In vitro | He et al., 2008 ⁴³ |
| Proteína 1 de la matriz de dentina | Pulpa dental de rata | Tipo odontoblasto | In vitro | Almushayt et al., 2005 ⁷ |

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es quimiotáctico en células de pulpa dental *in vitro*. En general el efecto de TGF- β es variable dependiendo del tipo de células y tejidos. TGF- β 1 regula una amplia gama de actividades celulares, tales como la migración celular, proliferación celular, diferenciación y síntesis de matriz extracelular; en cultivos de células de pulpa dental se ha demostrado que promueve la diferenciación odontoblástica. El efecto de TGF β 1 haciendo sinergia con el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF2), demuestra el aumento de la actividad de ALP, la formación de nódulos mineralizados, la expresión de DSP y proteína de matriz de dentina-1.¹³

Otro factor de crecimiento utilizado es la Proteína morfogenética ósea (BMP) tiene fuertes efectos osteoinductivos y condrogénicos. Existe un grupo amplio de BMP, las BMP2, BMP4, BMP7 y BMP11 son de importancia clínica debido a su papel en la inducción de mineralización. La BMP2 estimula la diferenciación de las células madre de la pulpa dental en odontoblastos *in vivo* e *in vitro*. También la BMP11 estimula la diferenciación odontoblástica de las células madre / progenitoras de la pulpa dental *in vitro* y la formación de dentina reparativa *in vivo*. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tiene como efectos la proliferación endotelial y la neovascularización. Las células de la pulpa dental se vuelven positivas para CD29, CD44, CD73, CD105, CD166, pero negativas para CD14, CD34, CD45 después del tratamiento con VEGF, este factor aumenta la proliferación y la diferenciación osteogénica de las células de pulpa dental, lo que sugiere un posible papel estimulador del VEGF en la osteogénesis.¹³

El factor de crecimiento de Fibroblastos-2 (FGF-2) tiene efectos en la regeneración del complejo dentino-pulpar, además es un potente factor angiogénico, que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos en la pulpa dental junto con PDGF y VEGF. FGF2 combinado con TGF β 1 induce la diferenciación de las células de la pulpa dental en células similares a los

odontoblastos. El FGF9 promueve la condrogénesis y simultáneamente inhibe la hipertrofia de DPSCs.^{13,14}

Existe un factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) que contribuye a la odontogénesis y a la reparación del tejido dental.

Factor de crecimiento nervioso (NGF) actúa como un estimulante para la mineralización, ya que en un estudio pudo inducir la diferenciación de células de papila dental en odontoblastos *in vitro*.

Como ya se ha mencionado, la regeneración del complejo dentino-pulpar y la regeneración de otros tejidos dentales puede ser posible gracias a la ingeniería de tejidos que incluye la utilización de células madre mesenquimales, factores de crecimiento y andamios; pero estos conceptos aún están en estudio y resulta algo complicado poder utilizarlos de forma clínica. Ante esto ha surgido una técnica llamada Cell Homing utilizada para la regeneración del complejo dentino-pulpar por medio de factores de crecimiento, así se acelera el proceso de reparación y regeneración, como se ilustra en la figura 6.

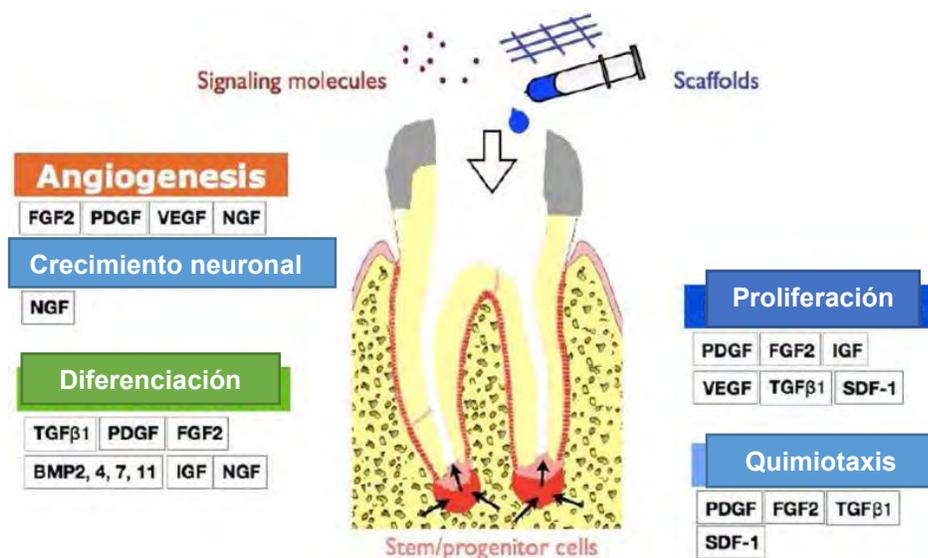


Figura 6. Factores de crecimiento utilizados en la técnica de Cell Homing para regeneración de tejido pulpar.¹⁴

Existe la posibilidad de que haya diferenciación celular sin la necesidad de inductores; así lo demostraron Laino y cols, donde las DPSCs CD34 + y CD117 + pueden ser diferenciadas en osteoblastos con medio estándar suplementado con FBS al 20% y sin inductores osteogénicos.

1.6.2 ANDAMIOS (MATRICES)

El andamiaje es un microambiente físico-químico y biológico tridimensional y debe permitir la unión, proliferación y diferenciación de las células madre sembradas en él. Además de permitir el paso de aire y tener la porosidad adecuada para el flujo de proteínas y factores de crecimiento.¹⁵

Los andamiajes se clasifican en naturales y sintéticos:

1. Naturales: contruidos a partir de los componentes de la matriz extracelular. Estos incluyen colágeno tipo I, glucosaminoglucanos, matriz de dentina desmineralizada y fibrina. Son bioactivos, biocompatibles y tiene propiedades mecánicas aceptables.
2. Sintéticos: entre estos encontramos, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico-coglucólico (PLGA), la poliépsilon caprolactona, hidroxiapatita-fosfato tricálcico, las biocerámicas e hidrogeles como alginato o variantes de polietilenglicol (PEG).

Los andamios deben ser diseñados para soportar la adhesión, la diseminación de células y la deposición de tejido nuevo, evitando la necesidad de implantes artificiales. Un andamio ideal debe tener características químicas y físicas específicas: las principales propiedades son la biocompatibilidad para optimizar la regeneración del tejido sin efectos secundarios de la respuesta inmune; debe ser biodegradable para ser absorbido simultáneamente con el crecimiento celular y tiene que tener

propiedades mecánicas específicas, para ser estables y resistir las tensiones *in vivo*.¹⁵

Se han realizado estudios utilizando DPSCs en andamios de esponjas de colágeno, hidroxiapatita (HA), quitosano, biocoral y PLGA, como se esquematiza en la figura 7.

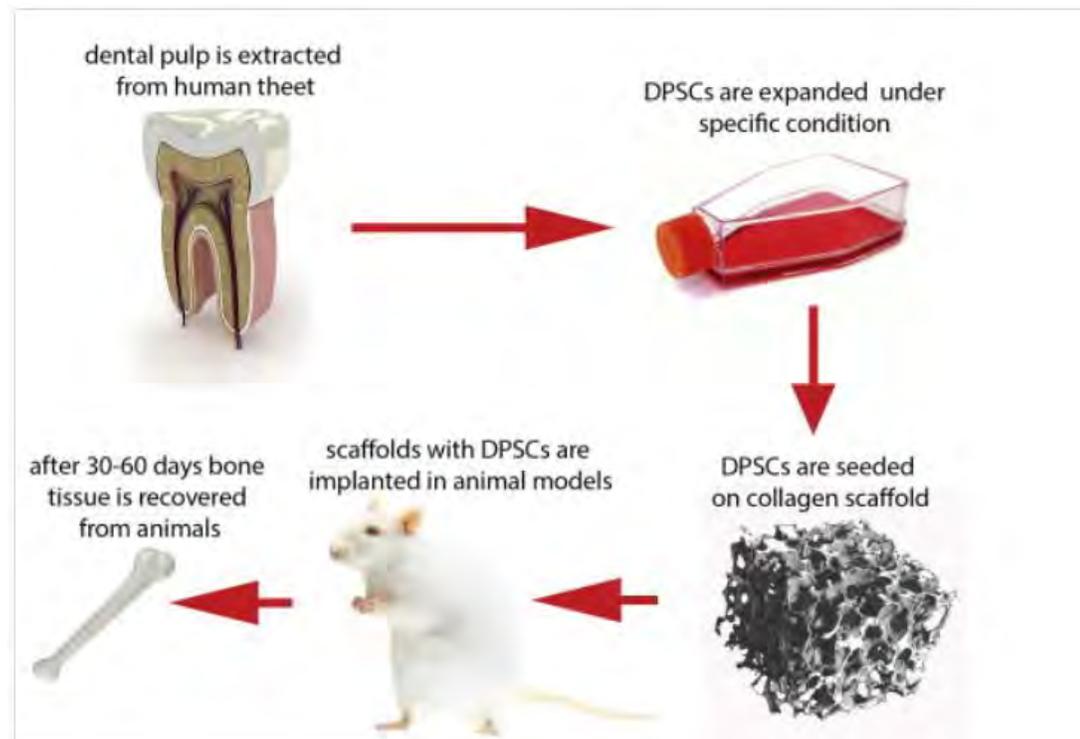


Figura 7. Diagrama de células mesenquimales de la pulpa dental y la ingeniería del tejido óseo.⁷

Es importante la macroestructura tridimensional de los andamios ya que imitan las funciones fisiológicas de la matriz extracelular. La porosidad es importante para un buen crecimiento óseo; el tamaño de poro debe estar entre 100 y 400 μm y deben estar abiertos e interconectados para permitir la difusión, penetración, adherencia y proliferación de células.

1.6.3 MICRO-ANDAMIOS 3D

El cultivo convencional de células en superficies planas bidimensionales es un enfoque poco natural y conduce al aplanamiento de células sin la presencia de matriz extracelular natural. Los modelos de cultivo de células tridimensionales (3D) imitan la estructura *in vivo* y facilitan su diferenciación, señalización intercelular y expresión,¹⁵ observar figura 10. Los micro andamios porosos debido a su geometría proporcionan una gran área superficial, utilización mínima de los medios e imitan el micro ambiente *in vivo* para el crecimiento celular, son biodegradables y se pueden trasplantar directamente *in vivo* y conservar las proteínas de la célula proliferadas en su forma nativa 3D. Debido a su tamaño micrométrico, estos soportes miniatura de cadenas de andamios pueden ser inyectados fácilmente y pueden ser trasplantados directamente en los tejidos diana utilizando un procedimiento mínimamente invasivo.¹⁵ Las DPSCs proliferaron adecuadamente y se adhirieron a través de los micro-andamios formando una construcción de célula-micro-andamio 3D, como se muestra en la figura 8.

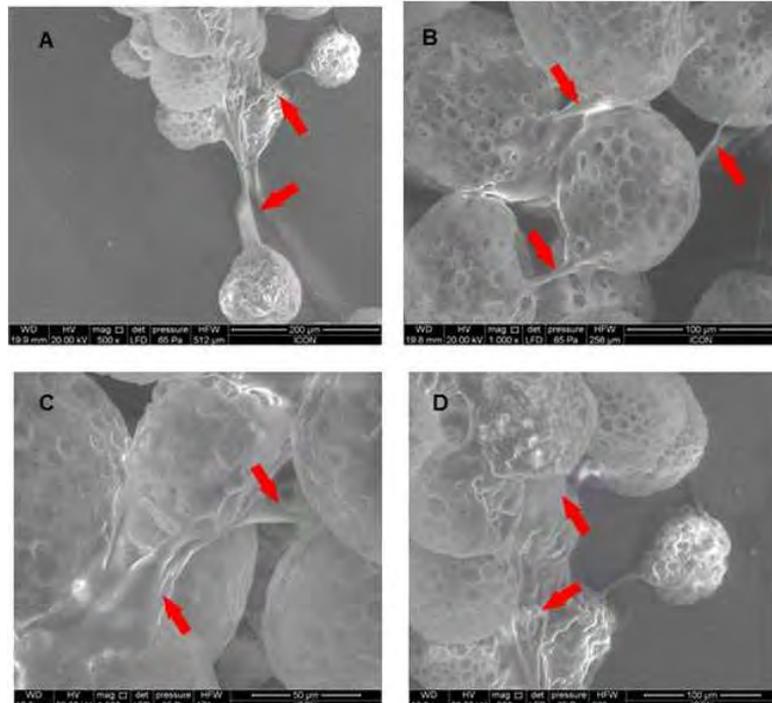


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido. Construcción de micro andamios y DPSCs como lo indican las flechas.¹⁵

El PLGA es uno de los materiales de andamio más estudiado debido a que es biodegradable, biocompatible, tiene alta resistencia mecánica y tiene aprobación de la FDA, en la imagen 9 se muestran micro andamios de PLGA.

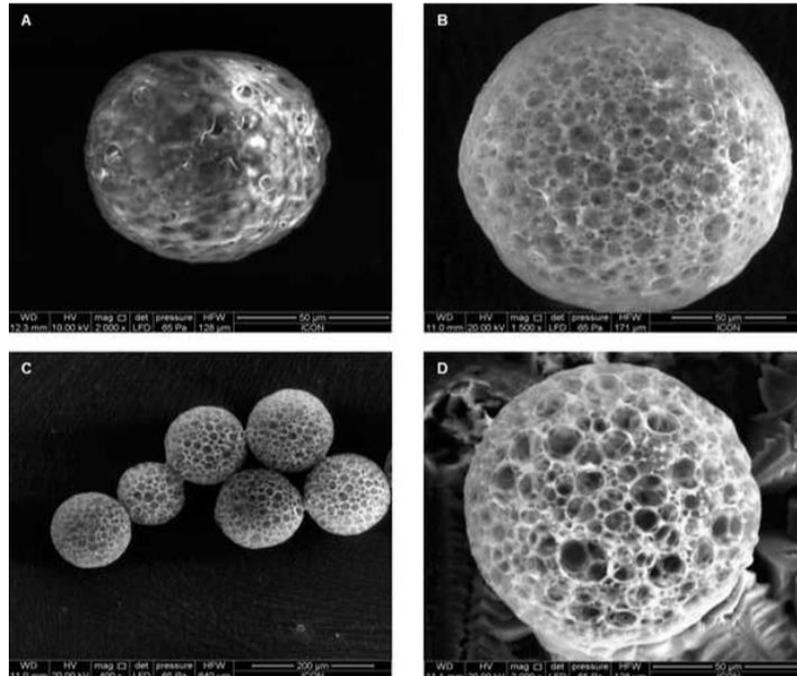


Figura 9. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de micro andamios PLGA porosos.¹⁵

OPLA (polímero sintético de Ácido Poliláctico) es un andamio que tiene una estructura abierta 3D la cual es efectiva para cultivar células de alta densidad. Estos proveen un sustrato adhesivo que sirve como un soporte físico tridimensional para un cultivo de células *in vitro* como también para la regeneración tisular *in vivo*.¹⁶

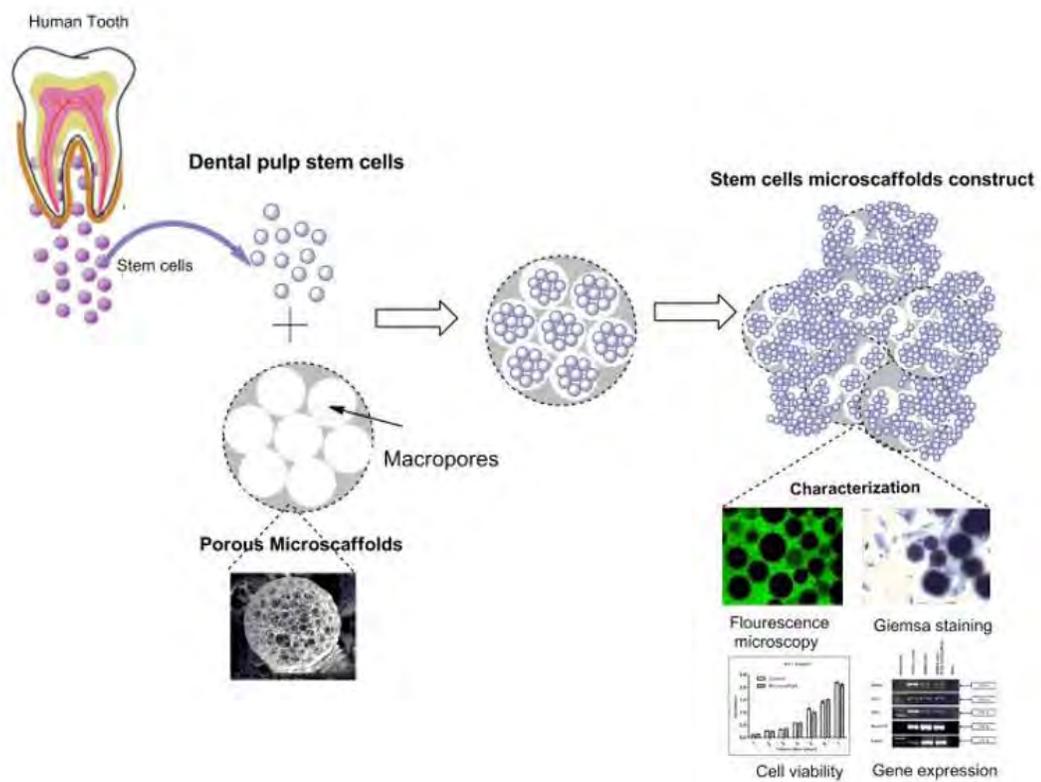


Figura 10. Esquema representativo de la obtención de células madre mesenquimales de pulpa dental y su cultivo en micro andamios porosos.¹⁵

CAPÍTULO 2 AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE LA PULPA DENTAL.

2.1 MEDIOS DE AISLAMIENTO

El protocolo de aislamiento se basa en la capacidad de las células troncales para adherirse a las placas de cultivo y formar colonias celulares. La obtención de las células la podemos hacer por medio de dos técnicas, las cuales se esquematizan en la figura 11:

2.1.1 TÉCNICA DE CRECIMIENTO POR EXPLANTE

Consiste en la utilización de fragmentos de tejido de tamaño microscópico que va de 1 a 3 mm y estos son mantenidos en cultivo. El medio de cultivo está compuesto por α -MEM, 20% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina, estreptomina y fungisona); para que las células migren del tejido y realicen confluencia.

2.1.2 TÉCNICA DE DISGREGACIÓN ENZIMÁTICA

Consiste en aplicar colagenasa-dispasa en una caja de polipropileno con el tejido pulpar entero (3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa disueltas en DMEM), posteriormente se lleva a incubación por lapso de dos horas a una temperatura de 37°C y a una concentración de 5% de CO₂. Esta técnica se realiza con la finalidad de eliminar la matriz extracelular y aislar las células de interés. Las enzimas más utilizadas son las colagenasas, las dispasas y la tripsina.^{17,18}

Es importante tener en cuenta que tanto el método de aislamiento como las condiciones de cultivo han demostrado que pueden afectar las características y los tipos de células madre formadas durante el crecimiento *in vitro*. Un estudio realizado por Huang y cols, reveló que las células mesenquimales de la pulpa dental que se sometieron a digestión enzimática

tienen un mayor potencial de proliferación en comparación a las que fueron sometidas a un crecimiento por explante.¹⁹

Las DPSCs cultivadas por el método de digestión enzimática pueden formar complejos dentina-pulpa in vivo.

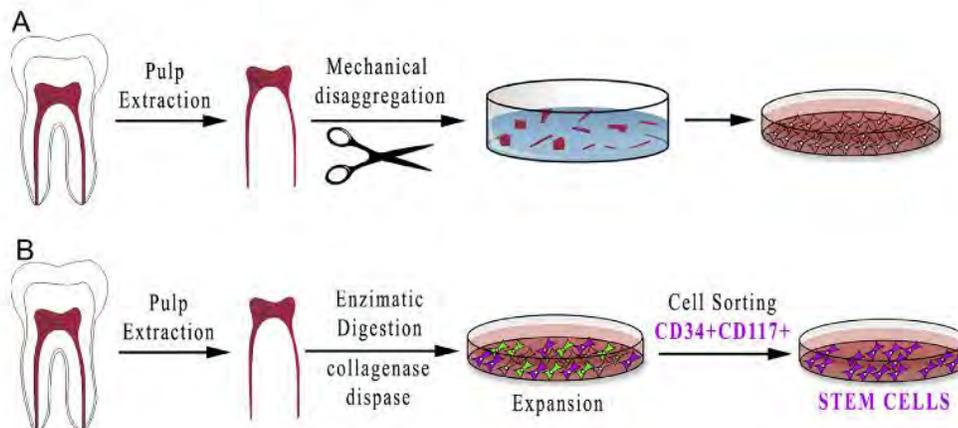


Figura 11. Métodos de aislamiento. A. Técnica por explante. B. Técnica de digestión enzimática.²⁰

Después de una semana de que las células son aisladas, las colonias son fácilmente identificables en los recipientes de cultivo. Cuando las células alcanzan aproximadamente un 80% de confluencia (por lo general después de 2 a 3 semanas) debe realizarse un pasaje celular. Para realizar un primer pasaje celular es necesario colocar 1 ml de tripsina durante 5 minutos a una temperatura de 37°C, para después lavar en solución fosfatada tamponada PBS 1x (Hyclone) y centrifugar a 1680 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 ó 4 pasajes las muestras son caracterizadas por citometría de flujo mediante de la evaluación de los anticuerpos CD90, CD105, CD45, CD, 34 y STRO-1.²¹

2.2 MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN

Las células de la pulpa dental generalmente son cultivadas en medio basal de eagle (EBM), medio mínimo esencial de eagle (MEM), MEM alfa, o medio modificado de eagle Dulbecco (DMEM) y actualmente para el aislamiento y la expansión de las células madre requieren el uso de grandes cantidades de sueros animales, como es el suero fetal bovino (SFB), la composición de este suero es desconocida, y pueden estar contaminado con virus, micoplasmas, priones u otros agentes patógenos, tóxicos o inmunogénicos. Debido a estos riesgos para la seguridad en los cultivos podría ser conveniente comenzar a usar suero humano. En un estudio realizado por Ferro y cols, donde utilizó un medio de cultivo añadido con una pequeña cantidad de suero humano (HS) autólogo y heterólogo lo que permitió aislar una población altamente proliferativa de células madre de pulpa dental (DPSC), esta población expresó marcadores mesenquimales celulares y mostró una capacidad de diferenciación osteoblástica comparable a un medio que contenía mayores cantidades de SFB. Dependiendo de los porcentajes de HS, las DPSC eran pequeñas, altamente proliferativas y exhibían una morfología fibroblastoide homogénea con escaso citoplasma.²²

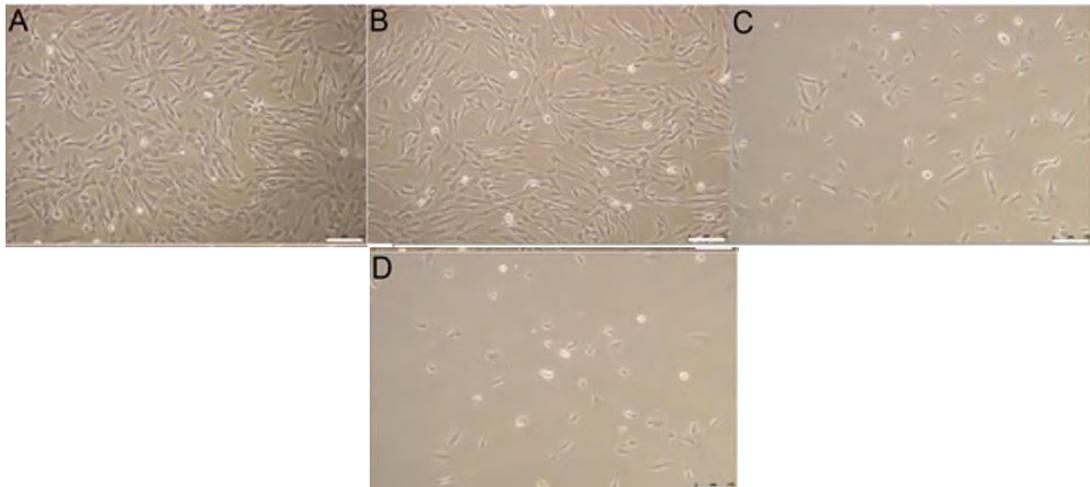


Figura 12. Morfología celular obtenida dependiendo de la concentración de suero humano (HS). (A) en medio HS 2.5%, (B) en medio HS 1.25%, (C) en medio HS 0.5%, (D) en medio HS 0.25%.²²

Cada uno de los componentes de los cultivos de células madre mesenquimales de la pulpa dental cumple un objetivo, por esta razón es necesario evaluar y comparar los distintos medios de diferenciación.

Después de aislar las células se necesita contar con medios de cultivo que ayuden a la diferenciación celular hacia un linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico. De acuerdo con Brizuela y cols, en su estudio realizado en el año 2013 las diferenciaciones a los distintos linajes celulares se realizaron según protocolos descritos en el Technical Manual Stem Cell Technologies (2008), versión 1.2.0.

Las diferenciaciones se realizaron en el pasaje 4 con una confluencia celular del 80%, las células fueron sembradas en 3 placas diferentes, para la inducción hacia la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica y aparte células madre mesenquimales sin inducción. Durante la diferenciación se realizaron cambios de medio fresco de inducción cada 4 días.

2.2.1 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.

Medio de diferenciación específico con alfa-MEM, SFB 10%, penicilina y estreptomina (1%), Dexametasona (0.1mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2-fosfato (50 mg/ml). Las células se mantuvieron incubadas en estufa a 37°C con 5% de CO₂ y después de 4 semanas las células fueron sometidas a inducción osteogénica, se tiñeron con Alizarin Red para evaluar el grado de mineralización los cultivos se lavaron 3 veces con agua bidestilada para eliminar residuos de la tinción.²³

2.2.2 DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA.

Medio de diferenciación con: alfa-MEM, SFB10%, Penicilina y Estreptomina (1%), Dexametasona (0.11mM), Insulina (10 mg/ml), Indometacina (0.02 mg/ml).¹ Las células obtenidas de la diferenciación adipogénica se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma) durante 10 minutos, se tiñeron con 0.5% de Oil Red en isopropanol (Sigma).²³

2.2.3 DIFERENCIACIÓN CONDROGÉNICA.

Medio de diferenciación específico con alfa-MEM, SFB 10%, penicilina y estreptomina (1%), Dexametasona (0.1mM), Insulina (5 mg/ml), TGF-Beta 1 (10ng/ml), ascorbato-2-fosfato (50 mg/ml). Las células obtenidas de la diferenciación se tiñeron con solución de azul Alcian al 1% (p/v) en ácido acético al 3% (pH 2.5, Sigma) durante 30 minutos, se lavaron repetidamente con ácido acético al 3% y agua destilada.²³

Es importante saber que dependiendo de cada investigación sobre la diferenciación de las células mesenquimales de la pulpa dental, el medio de cultivo puede variar en cuanto a las sustancias utilizadas para llevar a cabo dicha diferenciación, por ejemplo, en un estudio realizado por Jang JH y cols,

el medio de cultivo para la diferenciación condrogénica contenía: DMEM y F12 (GIBCO, Karlsruhe, Alemania) con penicilina de 100 U / ml, estreptomina 100 mg / ml, glutamina 2 mM, 1% de suplemento ITS Premix (BD Biosciences) y complemento condrogénico. El ITS Premix es un medio de suplemento disponible comercialmente que contiene insulina, transferrina, ácido selenioso, albúmina sérica bovina y ácido linoleico, mientras que el suplemento condrogénico contenía dexametasona, ascorbato-fosfato, prolina, piruvato y TGF- β 3.²³

En la actualidad no se ha establecido la combinación óptima de condiciones de cultivo y administración de factores de crecimiento para dirigir la diferenciación celular. Al hacer la revisión de diferentes estudios, se hace evidente que existen variaciones en la concentración de los factores de crecimiento y sustancias diferenciadoras.²¹

Existen diferentes medios de cultivo para la diferenciación celular que son comercializados y estos son comparados entre sí en estudios para determinar su eficacia con respecto a la diferenciación de distintos tipos de células como son las células mesenquimales de pulpa dental, ligamento periodontal, folículo dental entre otras.

En un estudio realizado por Carrillo y cols, donde se comparó la capacidad de osteodiferenciación de las células madre provenientes del ligamento periodontal y pulpa dental, se utilizaron 4 diferentes medios de osteodiferenciación y un medio sin suplementos de osteodiferenciación,²¹ los cuales se describen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados para la diferenciación

| Medio | Composición de los medios de cultivo |
|-------------------------------|---|
| Medio 1 (control negativo) | Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM low Glucose-Sigma) |
| Medio 2 | DMEM low Glucose-Sigma, 10% suero bovino -Gibco, 1% antibiótico-Invitrogen, 100nM Dexametasona-Sigma, 200µM ácido ascórbico -Sigma-, 10mM B-Glicerofosfato Sigma-, 50µM Melatonina-Sigma |
| Medio 3 | STEMPRO® Kit de Diferenciación Osteogénica (Invitrogen) |
| Medio 4 | DMEM low Glucose-Sigma, 10% suero bovino -Gibco, 1% antibiótico -Invitrogen, 100nM Dexametasona-Sigma, 200µM ácido ascórbico -Sigma-, 10mM B-G Sigma |
| Medio 5 | DMEM low Glucose-Sigma, 10% suero bovino -Gibco, 1% antibiótico -Invitrogen, 100nM Dexametasona -Stemcell Technologies, 50µM I-ascorbato-2-fosfato -Stemcell Technologies, 10mM B-Glicerofosfato-Stemcell Technologies. |

osteogénica.²¹

Al comparar la capacidad de osteoinducción de los diferentes medios no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a la expresión de genes o sustancias, hubo una expresión significativamente mayor de Runx2 para las células de ligamento periodontal cuando estas fueron cultivadas en el medio número 5 comparado con otros medios, mientras que las células obtenidas de pulpa dental presentaron una mejor respuesta al medio 4 particularmente para la expresión de colágeno tipo 1. Runx2 es considerado un marcador de osteodiferenciación temprana debido a su característica de factor de transcripción regulador de la expresión de los

genes que codifican para las principales proteínas constitutivas de hueso, se podría sugerir que la etapa de osteodiferenciación en la que se encuentran las células originarias de tejido periodontal es inmadura en comparación con las células obtenidas de tejido pulpar, ya que éstas últimas presentan un marcado incremento de la expresión de genes característicos de osteoblastos maduros como osteopontina y colágeno tipo I.²¹

De acuerdo a la composición de los medios de osteodiferenciación el medio 4 contenía una mayor concentración de ácido ascórbico (200µM) en comparación con el medio 5, las células de pulpa tuvieron una mayor expresión de Colágeno tipo I en el medio 4; hallazgo que puede ser explicado por la importante función del ácido ascórbico como cofactor de la prolyl-4-hidroxilasa en la hidroxilación de residuos de prolina necesaria para la adecuada síntesis de colágeno. Este hallazgo permite concluir que el suplemento de ácido ascórbico es de gran importancia para la inducción de síntesis de colágeno en células madre extraídas de pulpa dental.²¹

En otro estudio realizado por Brizuela y cols, se compara el potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales de pulpa dental y las células madre mesenquimales del folículo dental. El objetivo de este estudio fue aislar, cultivar células madre mesenquimales de los nichos mencionados y caracterizar su inmunofenotipo y su potencial de diferenciación a linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico.

Cuando ambos cultivos se realizaron bajo las mismas condiciones de tiempo, espacio y medio de inducción, las células mesenquimales de folículo dental presentaron un mayor potencial de diferenciación en comparación a las células madre mesenquimales de pulpa dental. Otro resultado interesante de este estudio fue que las células del tejido pulpar no se diferenciaron en adipocitos mientras que las del folículo dental si lo hicieron.

El método utilizado para aislar células mesenquimales de la pulpa dental es un factor determinante, el cual influye en la capacidad de diferenciación hacia los linajes básicos (osteogénico, condrogénico y adipogénico) y en la morfología celular, estos métodos de aislamiento incluyen: digestión enzimática y método de crecimiento por explante que fueron comparados en un estudio realizado por Jang JH y cols, en el año 2016, donde se utilizaron por separado los dos métodos antes mencionados y en otro cultivo se utilizaron en combinación. En términos de morfología celular, las DPSCs aisladas por explante (DPSCs-OG) exhibió una morfología homogénea y una forma fibroblástica típica, principalmente se compone de células similares a fibroblastos que presumiblemente habían migrado fuera de los fragmentos del tejido. Las DPSCs aisladas por digestión enzimática (DPSCs-ED) se presentaron en forma heterogénea, aunque la mayoría presentaron una forma similar a los fibroblastos, otros parecían cuboidales o poligonales. En contraste las que se aislaron en combinación de métodos mostraron una morfología mixta.²³ (Figura 13)

Este estudio también examinó la expresión de marcadores mesenquimales CD105, CD90 y CD73. Estos marcadores de superficie MSC se expresaron altamente en las DPSCs obtenidas por todos los métodos de cultivo (DPSCs-OG, DPSCs-ED y combinado).

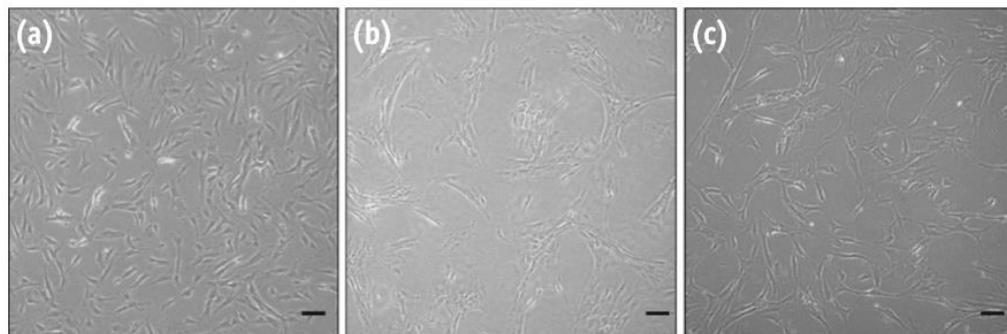


Figura 13. Morfología de células mesenquimales de pulpa dental, obtenidas a partir de método de explante (a), método de digestión enzimática (b) y combinación de ambos (c).²³

2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.

2.3.1 MARCADORES GÉNETICOS DE DIFERENCIACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.

En lo que se refiere a la relación que existe entre el método de aislamiento y cultivo con la capacidad de diferenciación de las DPSCs se utilizó la identificación por medio de marcadores genéticos por medio de RT-PCR y el análisis de Western blot. (Cuadro 3) se obtuvieron los siguientes datos:

En cuanto a la diferenciación osteogénica la mineralización en el medio de DPSCs-ED fue inducida por una mayor expresión de marcadores de diferenciación osteogénica, incluyendo BSP, COL1A1, OCN, ON, OSX y RUNX2, mientras que en el medio de DPSCs-OG se mostró un nivel más alto de marcadores como ALP y OPN.

Cada uno de los marcadores genéticos tiene distintas aplicaciones en relación a la diferenciación, por ejemplo, ALP actúa como un indicador temprano de la actividad celular y la diferenciación, es una proteína ubicua y no puede ser considerado específica de hueso, BSP es mitógeno de los pre osteoblastos y puede promover su diferenciación en osteoblastos maduros, estimulando en última instancia la mineralización del hueso. La expresión de OCN está restringida a las células del linaje osteoblástico, OPN es una glicoproteína fosforilada que contiene RGD, ligada al calcio y es aislada originalmente de la matriz ósea. RUNX2 tiene un papel fundamental en la diferenciación osteoblástica. BSP y OCN se expresan comúnmente en huesos y dientes.²³

Aunque no existen marcadores de diferenciación odontoblástica específicos, se han utilizado BSP, ALP, OCN y ON como indicadores para la diferenciación odontoblástica. Estos resultados indican que el cultivo de DPSCs-ED tienen un fuerte potencial para la regeneración de tejidos duros destinados a producir componentes de la matriz ósea.²³

Los marcadores génicos expresados en la diferenciación adipogénica incluyen: PPAR- γ que es un receptor de hormonas activado por lípidos con funciones en la diferenciación adipogénica, mientras que LPL se cree que es un marcador temprano de esta diferenciación. El cultivo DPSCs- OG presentó mayores niveles de expresión de genes adipogénicos. En un estudio realizado por Chung y cols, descubrieron que las DPSCs aisladas por medio de explante tienen capacidad de diferenciación condrogénica y adipogénica *in vitro* y que son capaces de regenerar los tejidos blandos para la cicatrización de heridas.²⁴

En cuanto a la diferenciación condrogénica, los genes marcadores incluyeron ACAN, COLA1, COL2A1 y ALP que son factores esenciales durante la diferenciación y SOX9 se expresa en progenitores mesenquimales que dan lugar a condrocitos, el alto nivel de expresión de este factor implicó que las DPSCs derivadas de ambos métodos de cultivo presentaran una alta diferenciación condrogénica.

Cuadro 3. Genes marcadores de diferenciación para la identificación de células madre mesenquimales.²³

| | Osteogenesis | Adipogenesis | Chondrogenesis |
|--------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| | ALP | PPAR- γ | ALP |
| | BSP2 | LPL | COLA1 |
| | COL1A1 | | SOX9 |
| Marker | OCN | | COL2A1 |
| Genes | ON | | COL10A1 |
| | OPN | | ACAN |
| | OSX | | |
| | RUNX2 | | |

Se concluyó que las células mesenquimales de la pulpa dental aisladas por digestión enzimática tuvieron una alta capacidad de diferenciación osteogénica mientras las que se aislaron por el método de explante tuvieron capacidad de diferenciación hacia adipocitos. Es importante el desarrollo de métodos de cultivo para producir DPSCs con un potencial de diferenciación adecuado y así estas células puedan ser utilizadas en la regeneración del tejido pulpar y la ingeniería de tejidos dentales.

2.3.2 MARCADORES MESENQUIMALES ESPECÍFICOS.

La identificación de los marcadores mesenquimales de superficie son un criterio necesario para poder determinar que las células obtenidas de la pulpa dental son células madre mesenquimales, y esto se lleva a cabo por medio de la caracterización fenotípica. Debido a que ningún tipo de célula mesenquimal puede ser identificado mediante un único marcador específico, estos tipos celulares se tienen que definir en base a una combinación de marcadores fenotípicos y propiedades funcionales.⁷ En el cuadro 4 se describen las propiedades de algunos marcadores mesenquimales.

Cuadro 4. Funciones de los principales marcadores de las células madre mesenquimales.⁷

| Marcadores presentes en las células madre mesenquimales | Función |
|---|--|
| CD29 o <i>integrin β 1</i> (ITGB1, «integrina beta 1» CD44 o ECM-III o HCAM o HUTCH-1 o Pgp-1 o antígeno herpes | Adhesión celular y reconocimiento de señales Migración, adhesión celular, proliferación y la interacción célula-célula |
| CD51 o <i>integrin α V</i> (ITAGV, «αV integrina») CD58 o LFA-3 CD71 o <i>transferring receptor 1</i> (TR1, «proteína receptora de transferrina 1») | Adhesión y transducción de señales Adhesión y activación de linfocitos T Transporte de hierro al interior celular en estado proliferativo |
| CD73 o ecto-5'-nucleotidasa CD90 o Thy-1 CD105 o endoglina | Marcador de linaje y mediador de la adhesión celular Marcador de precursores mesenquimales tempranos Regula los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina y el colágeno |
| CD106 o VCAM-1 o INCAM-110 | Molécula de adhesión, desempeña un papel fundamental en los procesos de inmunosupresión |
| CD146 o MCAM o MeICAM o glucoproteína de superficie celular MUC18 | Adhesión celular y regulación del estado de multipotencia celular |
| CD166 o ALCAM o MEMD o SC-1/DM-GRASP/BEN (en pollo) o KG-CAM (en rata) | Adhesión celular e interviene en el mantenimiento del estado indiferenciado |
| CD271 o LINGFR o p75 NTR | Parece estar involucrado en los procesos de desarrollo, supervivencia y diferenciación celular. Se ha descrito como uno de los marcadores más específicos para la caracterización y purificación de las MSC |
| Gangliósido GD2 | Determinante en la comunicación célula-célula y en el reconocimiento celular |
| STRO-1 <i>Integrin alpha 11</i> (ITGA11, «α11 integrina») | Antígeno específico para estado no diferenciado Caracteriza poblaciones derivadas a partir de médula ósea con un mayor potencial de diferenciación osteogénica y un menor potencial de diferenciación adipogénica. Es una de las principales moléculas que se están empleando para aumentar el conocimiento sobre relaciones de linaje dentro de las MSC y facilitar el estudio de poblaciones más homogéneas |

MSC: células madre mesenquimales

Siguiendo los criterios mínimos propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para que una célula pueda ser considerada una MSC debe expresar determinados antígenos de superficie: CD73, CD90, CD105, CD166 y niveles variables de marcadores estromales STRO-1, CD29, CD44, CD71, CD271; así como la ausencia de antígenos hematopoyéticos u otros antígenos típicos de otras poblaciones celulares presentes en los mismos tejidos tales como CD45, CD11b, CD34, CD14, CD19, CD79a y el complejo principal de histocompatibilidad clase II.⁷

Es necesario tener en cuenta las características principales de cada uno de los marcadores analizados dentro de los cultivos de las células madre mesenquimales de la pulpa dental, ya que éstos también llegan a influir en lo que se refiere a diferenciación hacia distintos linajes celulares.

- **CD90** es una proteína que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas. Está involucrada en la interacción célula-célula. Se piensa que este marcador se expresa en precursores mesenquimales tempranos que tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos.
- **CD105** es una glicoproteína principalmente asociada con el endotelio vascular, es un componente del complejo receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y se une TGF- β 1 con alta afinidad. Se expresa en monocitos activados, macrófagos activados, precursores eritroides, fibroblastos, células foliculares dendríticas, melanocitos, células cardíacas, células vasculares de músculo liso y células endoteliales.
- **STRO-1** es un marcador que se expresa en el desarrollo temprano de las células troncales mesenquimales, se expresa cuando los genes asociados a la diferenciación y expansión osteogénica como el Factor de Unión Core A1 (CBFA1) interactúa con osteopontina y osteocalcina.

- **CD146** glicoproteína de superficie celular MUC18, está asociada con la progresión tumoral y el desarrollo de la metástasis en el melanoma maligno. Es constitutivamente expresada por células endoteliales, pericitos, células de músculo liso, algunos linfocitos. También es un marcador temprano de MSC de diversos orígenes, incluyendo médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical y pulpa dental, se detecta preferentemente en MSC con alto potencial de clonogenicidad, multipotencia y diferenciación. En el tejido pulpar CD146 se inmunolocalizó en nichos de células perivasculares.²⁵
- **CD34** es un antígeno de células precursoras del sistema hematopoyético, no es expresado por las células mesenquimales, pero es utilizado para la caracterización fenotípica.
- **CD271** es importante para la supervivencia de células neuronales, pero también se encuentra en hueso trabecular y cortical.²⁶
- **CD56** Se expresa ampliamente en el sistema nervioso central, en el que media varias funciones neuronales controlando la adhesión intercelular, la migración, proliferación, supervivencia y diferenciación celular. También se relaciona con la diferenciación de células madre en mioblastos, condrocitos y osteoblastos.

Aunque no se han identificado marcadores mesenquimales definitivos hasta ahora, las poblaciones de células mesenquimales de la pulpa dental se caracterizan principalmente por la expresión de moléculas de superficie celular que incluyen el antígeno de membrana de células de médula ósea STRO-1, la molécula de adhesión de células de melanoma MCAM / CD146.

En un estudio realizado por Ducret y cols, se demostró mediante la citometría de flujo que todas las células mesenquimales de pulpa dental expresaron los marcadores de células mesenquimales CD10, CD13, CD29, CD44, CD90, CD105 y CD166 *in vitro*, pero no expresaron los marcadores hematopoyéticos CD14, CD34, CD45, CD79a y HLA-DR o el marcador de

células endoteliales y leucocitos CD31. STRO-1 y CD271 se expresaron por un número muy bajo ($\leq 1\%$) de DPSC cultivadas, mientras que CD146 y MSCA-1 se expresaron aproximadamente 40 y 15% de DPSC, respectivamente. Estos resultados sugieren que la población de células mesenquimales del tejido pulpar es heterogénea y puede contener varias poblaciones con diferentes propiedades fenotípicas y biológicas.^{27,28}

Ducret realizó otro estudio en el cual se analizó con citometría de flujo la expresión de CD56, CD146, CD271, MSCA1 y STRO-1 en células CD31 – de pulpa dental (DP) para excluir las células endoteliales y leucocíticas que pueden expresar algunos de los marcadores anteriores, aunque no son MSC.²⁸ El análisis de los marcadores específicos de superficie es necesario para la identificación de células madre mesenquimales de la pulpa dental y así diferenciarlas de otro tipo de célula, como de las hematopoyéticas, las células de defensa, las células endoteliales, los fibroblastos, entre otras.

Se encontró que la población de células CD31– DP representaba el 98.4% de las células vivas en la totalidad de la pulpa dental y que contenía aproximadamente el 1.4% de las células CD56 +, el 1.5% de las células CD146 +, el 2.4% de las células CD271 +, el 6.3% de las células MSCA-1 +. Con el fin de aumentar el conocimiento de las células de la pulpa dental que expresan estos marcadores mesenquimales, se siguieron las poblaciones de células CD56 +, CD146 +, CD271 + y MSCA-1 + y analizaron la expresión de estos cuatro marcadores y se concluyó en el estudio que las células CD146 + CD271 + constituyen las poblaciones de células mesenquimales más abundantes en la pulpa dental.

En un estudio realizado en el año 2015 por Álvarez y cols, se concluyó que las células mesenquimales de la pulpa dental que son CD271+ podrían potencialmente utilizarse para aplicaciones clínicas futuras en odontología y medicina regenerativa; en este estudio se evaluó y comparó la capacidad de diferenciación de la combinación de ciertos marcadores como: CD51+/

CD140 α +, CD271 + y STRO-1 + / CD146 + aislados y se indujo a que las células mesenquimales experimentaran una diferenciación odontogénica.²⁹

Los tres grupos de células mesenquimales aislados tuvieron formación de nódulos mineralizados después de un tratamiento prolongado con medios de inducción odontogénica durante 14 días.

En contradicción un estudio llevado a cabo en el año 2016 por Tomlinson y cols, concluyó que CD271 no es un marcador específico para células madre mesenquimales de pulpa dental y que no debe utilizarse para aislar éstas células. Se mostró que, aunque CD271 está presente en la pulpa dental, se produce un número significativamente mayor de colonias celulares a partir de la fracción negativa de CD271. El análisis fenotípico de las células CD271 negativas expandidas mostró que estas células son idénticas a las células del estroma de la pulpa dental aisladas mediante adhesión plástica no selectiva.²⁶ (Figura 14)

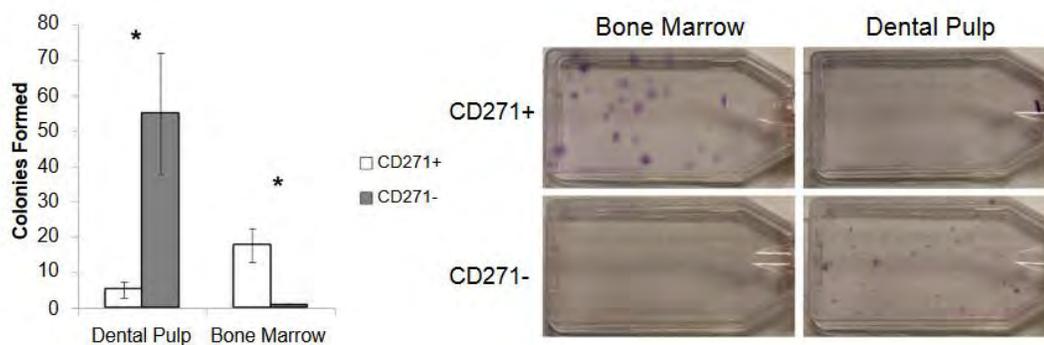


Figura 14. Formación de colonias de células CD271+ y células CD271-, obtenidas de médula ósea y pulpa dental.²⁶

Son necesarios más estudios para determinar si la expresión de marcadores mesenquimales específicos confiere a las células de pulpa dental propiedades específicas que pueden llegar a utilizarse para la regeneración de tejidos humanos, incluida la pulpa dental, con medicamentos estandarizados basados en células.²⁶

CAPÍTULO 3. ALMACENAMIENTO Y CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL.

El objetivo de la criopreservación es reducir la actividad metabólica de las células durante largos períodos de tiempo, preservando al mismo tiempo la viabilidad, el fenotipo y el potencial de diferenciación. Los métodos de almacenamiento no tienen que limitar los usos terapéuticos de las células madre. Estos métodos deben implicar una pérdida mínima de la viabilidad celular y la capacidad de diferenciación, así para tener aplicaciones clínicas de las células y desarrollar investigación sobre éstas. Para criopreservar la pulpa dental es necesario realizar ciertas técnicas de extracción pulpar; en un estudio realizado por profesores de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM, se realizó una descripción detallada de las técnicas para hacer la extirpación y recolección del tejido pulpar para cultivar células madre mesenquimales provenientes de dicho tejido y criopreservarlas. Las pruebas de las técnicas se realizaron en un tercer molar y en premolares extraídos por indicaciones ortodóncicas. El tercer molar después de la extracción, se lavó con agua tridestilada y pasó a un tubo Falcon (vial) con crioprotector de glicerina al 10% en medio amortiguador de fosfato el cual pasó a nitrógeno líquido a -196°C , durante 50 minutos. El vial se descongeló gradualmente con agua corriente y al molar se le hizo una muesca transversal a nivel amelocementario con una fresa de bola de diamante de 1.5 mm de diámetro. Después el molar se envolvió en una gasa estéril y se fracturó con un fórceps 151. Con la ayuda de un aplicador estéril se desprendió la pulpa coronal, como se observa en figura 15. Los premolares se congelaron a -4°C por 11 días sin pasar al nitrógeno líquido, posteriormente se realizó la descongelación con agua corriente y en ellos se cambió la técnica de corte transversal por una técnica de corte longitudinal – coronoaxial, como se observa en figura 16.

En uno de los premolares después del corte la pulpa dental se mostró intacta y con facilidad de extirpación.³⁰



Figura 15. Corte trasversal y fractura del molar para la posterior extirpación del tejido pulpar.³⁰

Con este estudio se concluyó que una muesca en sentido longitudinal permite mantener la integridad de la pulpa dental luego de la fractura con el fórceps, evitando el corte del tejido durante su recolección en comparación con la técnica convencional en la que el tejido pulpar presenta resistencia al desalojo, en especial en la porción apical, en la que puede ocasionarse algún daño.³⁰



Figura 16. Corte longitudinal y extirpación del tejido pulpar.³⁰

Cuando las células se mantienen en criopreservación durante mucho tiempo, más de 3 años, pueden surgir ciertas complicaciones y limitaciones, como:

- reducción en su potencial de diferenciación
- senescencia y apoptosis como resultado de pases en serie
- alteraciones genéticas potenciales
- costos altos

Zhang y cols, informaron que después de almacenar en nitrógeno líquido durante dos años las DPSCs mantienen su potencial de proliferación y diferenciación en linajes celulares específicos, aunque la tasa de éxito de aislamiento de las DPSC post- criopreservadas puede disminuir debido a la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación.³¹ Por lo tanto, se sugiere el uso de crioprotectores celulares como dimetil sulfóxido (DMSO), es el más utilizado en diferentes métodos de criopreservación, penetra en las células y forma enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, evitando el flujo de agua al citoplasma, minimizando la deshidratación y formación de hielo intracelular, existen otros crioprotectores celulares como el etilenglicol (Ethylene Glicol EG) y el almidón hidroxietilo (Hydroxyethyl starch, HES).

Pero aún no se ha establecido el protocolo de criopreservación más eficaz para mantener la viabilidad celular.

Munévar y cols, en el año 2015, llevaron a cabo un estudio que tuvo el objetivo de evaluar el efecto de dos métodos de criopreservación, uno de ellos descrito por Papaccio y cols. y otro por Kamath, que utilizaron el mismo crioprotector (DMSO), para evaluar la viabilidad y el fenotipo de las células madre mesenquimales obtenidas de la pulpa dental humana tras someterse a criopreservación durante 1, 7 y 30 días. El método descrito por Papaccio contenía: 10% de DMSO + 90% de suero bovino fetal (FBS) y el método de Kamath: 10% DMSO + 70% FBS + 20% NH medio de células madre.³²

Para determinar la eficacia de los protocolos después de los tiempos de congelación, las células se descongelaron a 37°C, seguido por centrifugación a 2000 rpm. La viabilidad celular se evaluó utilizando citometría de flujo con 7-AAD (7 Aminoactinomicina D), una tinción fluorescente que es excluida por las células viables y tiene alta afinidad por el ADN en las células muertas, y la expresión de marcadores fenotípicos CD105 + / CD73 + / CD34- / CD45- se evaluó con Citómetro de flujo FACS CANTO II (Becton & Dickinson).

Los resultados obtenidos de este estudio en las células que fueron criopreservadas durante 30 días, el método de Papaccio mostró mayor porcentaje de viabilidad (59.5%) que el método de Kamath (56.2%). Sin embargo, el método Kamath proporcionó mejores resultados de viabilidad para las células criopreservadas durante 1 y 7 días (65.5% y 56%, respectivamente).

En cuanto a la caracterización fenotípica en el método de Papaccio se observó que las células mostraron una mayor expresión de los marcadores CD105 + / CD34- después de 1 y 7 días de congelación (99.9%) que después de 30 días (89%), los valores en el método Kamath (95.8%, 97.8% y 94.5% después de 1, 7 y 30 días, respectivamente). Hubo mayor expresión de CD105 + / CD45- con el método de Papaccio para los 3 tiempos de crioconservación (95.4%, 96% y 93.2%, respectivamente) que con el método Kamath (93.5%, 94.2% y 81.3%, respectivamente). Se encontró que el marcador CD73 a los 30 días, tenía una expresión 72.8% con el método Papaccio, en contraste con el 94.8% con el método Kamath.³²

Otro estudio recientemente realizado por Ma y cols, pudo corroborar que las células criopreservadas por un largo periodo de tiempo, equivalente a dos años, pudieron mantener su capacidad de autorenovación, multipotencialidad, regeneración ósea y dental y también su función de inmunomodulación, lo que concluye que la criopreservación es un método de

almacenamiento eficiente ante las posibles aplicaciones terapéuticas que pudiesen tener las células madre mesenquimales conservadas.^{33,34}

Existen diversos métodos de criopreservación desarrollados actualmente tal es el caso de Gioventú y cols, que desarrollaron un método para criopreservar la pulpa dental sin la necesidad de extraer este tejido de las piezas dentales, solo utilizando láser Nd:YAGa al nivel de la unión amelocementaria sin causar daño a la pulpa. Se hacen perforaciones con el láser para que penetre el medio crioprotector. este método resultó ser eficiente en comparación con el método en donde se extirpa la pulpa dental.³⁵

Existe preservación celular denominada congelación magnética que parece representar una gran ventaja sobre la criopreservación convencional. Ya que evita de manera menos dañina el uso de vitrificantes, la formación de cristales de hielo que pudieran provocar daño a las estructuras celulares.³⁶

Actualmente no existe una Norma Oficial Mexicana por parte de las autoridades de la Secretaría de Salud que determine con detalle el uso, resguardo, reglamentación, manipulación, propiedad de las mismas y aplicaciones terapéuticas de las células madre de cualquier tipo, incluyendo las dentales. De acuerdo a la Ley General de Salud, hasta ahora cualquier terapia o tratamiento médico en seres humanos con células madre dentales se encuentran prohibidos por la legislación mexicana, además que realizarlo sería un acto completo de irresponsabilidad, ignorancia y falta de ética profesional, por no existir aún los fundamentos y bases científicos necesarios para realizarlos en pacientes.³⁷

CONCLUSIONES.

La identificación de células mesenquimales de pulpa dental es un tema que promete mucho a la ingeniería de tejidos no solo dentales, sino que también a la medicina regenerativa ya que estas células tienen capacidades multipotenciales para poder diferenciarse en distintos tipos de células como osteoblastos, neuroblastos, endotelio, condrocitos, entre otras, dependiendo del estímulo que actúe sobre ellas y esto se logra tanto en *in vitro* como *in vivo* utilizando factores de crecimiento que son proteínas que tienen receptores específicos en las células para que se desencadene una cascada de señalización para llevar a cabo la diferenciación. Actualmente se utilizan micro-andamios biocompatibles porosos 3D que son indispensables para que las células proliferen, facilitan la señalización y la diferenciación ya que estas estructuras imitan la función de la matriz extracelular.

Es necesario identificar las células madre mesenquimales de la pulpa dental ya que este tejido está conformado por diversas células como los odontoblastos en su periferia, los fibroblastos células más abundantes, macrófagos y fibras de colágeno. Existen criterios para diferenciar a una célula como célula mesenquimal: adherencia al plástico en cultivo, morfología fibroblastoide, presentar marcadores de superficie y deben ser multipotentes y tener plasticidad para diferenciarse en condiciones específicas de cultivo.

Varios son los factores que influyen en las propiedades y en la identificación de las células mesenquimales del tejido pulpar. El método que se maneje para aislarlas puede determinar si estas células pueden ser utilizadas para regenerar tejidos duros o tejidos blandos de la cavidad oral. Los medios de diferenciación varían dependiendo de los factores de crecimiento utilizados para lograr una diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica y con base a esta diferenciación también podemos determinar que genes

están involucrados en dicha diferenciación. La identificación de genes involucrados se puede realizar con técnicas de RC-PCR y Western blot.

Para poder diferenciar a las células mesenquimales de las células hematopoyéticas, células leucocitarias, de los fibroblastos y células endoteliales es necesario realizar una caracterización fenotípica con inmunofluorescencia y citometría de flujo para identificar la presencia de marcadores específicos mesenquimales (CD90+, CD105+, CD73+, CD45-, CD34-), cada tipo celular presenta un conjunto de marcadores de superficie.

La criopreservación de las células pulpares también llega a influir en el proceso de cultivo y utilización terapéutica de estas. Una célula pulpar puede ser conservada por 2 ó hasta 3 años, ya que los medios criopreservantes pueden llegar a dañar la estructura celular e interferir en los procesos de proliferación y diferenciación.

Es cierto que la pulpa dental es una fuente rica en células madre mesenquimales que ha demostrado ser de gran utilidad para la regeneración de tejidos, pero esto de manera *in vitro*. Para poder llegar a utilizarlas de forma clínica se considera necesario conocer más sobre ellas y poder realizar protocolos que incluyan la utilización en conjunto de los andamios, los factores de crecimiento y las células madre mesenquimales.

Con la información obtenida de artículos de investigación y experimentación se cumplió con los objetivos específicos planteados en un principio. El conocimiento de este tema es prometedor para la odontología del futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Gómez de Ferraris, ME, Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. México: Editorial Médica Panamericana, 2009: 232-253.
2. <https://www.slideshare.net/julietaDiazO/pulpa-dental-61062489>
3. Fecha 21 de marzo del 2017 hora 11:02pm
4. Ponce Bravo S, Histología Básica Fundamentos de biología celular y del desarrollo humano. México: Editorial Médica Panamericana, 2016: 236.
5. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762006000500011 Fecha 21 de marzo del 2017 Hora 11:42 pm
6. Castro Manreza ME, Montesinos JJ, Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas. Rev Med UV, Enero-Junio 2015: 38-44
7. <http://factorstem.es/celulas-madre/> Fecha 22 de marzo 2017 hora 12:17 am
8. Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez- Martín P. Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. Med Clin (Barc), 2017: 1-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2016.11.033>
9. <http://infantident.blogspot.mx/2015/07/madre-en-dientes-decduos-las-celulas.html> Fecha 22 de marzo del 2017 Hora 12:06 am
10. Romero Stefanny, Córdoba Katherine, Martínez Valbuena Carlos A., Gutiérrez Quintero Juan G., Durán Riveros Juan Y, Munévar Niño Juan Carlos. Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología. Rev. Odont. Mex [revista en Internet]. 2014 Sep [citado 2017 Abr 04] ; 18(3): 156-163. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-199X2014000300002&lng=e

<http://www.actaodontologica.com/ediciones/2013/3/art-4/#> Fecha 21 de marzo del 2017 Hora 11:33pm

11. Rendón, J., Giménez, L., Urrego, P. Células madre en odontología. (Stem cells in dentistry). CES Odontología, Norteamérica, 24, jul. 2011. Disponible en: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/1475> . Fecha de acceso: 05 Apr. 2017.
12. Cohen S, Hargreaves KM, Cohen Vías de la Pulpa/ Barcelona; México: Elsevier España, 2011; 602-606.
13. Kim, S. G., Solomon, C., Zheng, Y., Suzuki, T., Mo, C., Song, S., ... Mao, J. J. (2012). Effects of Growth Factors on Dental Stem/Progenitor Cells. Dental Clinics of North America, 56(3), 563–575. <http://doi.org/10.1016/j.cden.2012.05.001>
14. Lu, J., Dai, J., Wang, X., Zhang, M., Zhang, P., Sun, H., Shen, S. G. Effect of fibroblast growth factor 9 on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells and dental pulp stem cells. Molecular Medicine Reports, 2015; 11(3), 1661–1668. <http://doi.org/10.3892/mmr.2014.2998>
15. Bhuptani, Ronak S., Patravale, Vandana B., Porous microscaffolds for 3D culture of dental pulp mesenchymal stem cells. International Journal of Pharmaceutics <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.040>
16. Brizuela C.C, Saint J.N, Inostroza S.C. Biocompatibilidad de Células Madres Mesenquimales de Tejido Gingival Humano en Cultivo con un Andamiaje de Polímero Sintético de Ácido Poliláctico (OPLA). Int. J. Morphol. [Internet]. 2014 Sep [citado 2017 Mar 29]; 32(3): 767-772. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071795022014000300004&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000300004>.

17. Brizuela C C, Galleguillos G S, Carrión A F, Cabrera P C, Luz C P, Inostroza S C. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *Int. J. Morphol.* [Internet]. 2013 Jun [citado 2017 Mar 29] ; 31(2): 739-746. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071795022013000200063&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200063>
18. Magallanes Fabián M, Carmona Rodríguez B, Álvarez Pérez M A. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Rev. Odont. Mex* [revista en Internet]. 2010 [citado 2017 Abr 05] ; 14(1): 15-20. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-199X2010000100015&lng=es.
19. Karamzadeh, R., Eslaminejad, M.B., Aflatoonian, R. Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. *J. Vis. Exp.* (69), e4372, doi:10.3791/4372 (2012).
20. La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, et al. Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *J Dent* 2014;42(7):761-8
21. Carrillo-Mendigaño Natalia, García-Robayo Dabeiba Adriana, Otero-Mendoza Liliana Margarita. Aislamiento y capacidad de osteodiferenciación de las células madre provenientes del ligamento periodontal y pulpa dental. *CES odontol.* [Internet]. 2015 Dic [citado 2017 Abr 05] ; 28(2): 20-34. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2015000200003&lng=es.
22. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F (2012) Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Derived Stem Cells by

Using Media Containing Low Human Serum Percentage as Clinical Grade Substitutes for Bovine Serum. PLOS ONE 7(11): e48945. doi:10.1371/journal.pone.0048945
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048945>

23. Jang, J.-H., Lee, H.-W., Cho, K. M., Shin, H.-W., Kang, M. K., Park, S. H., & Kim, E. (2016). In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 41(4), 283–295. <http://doi.org/10.5395/rde.2016.41.4.283>
24. Chung CR, Kim HN, Park Y, Kim MJ, Oh YJ, Shin SJ, Choi YJ, Kim KH. Morphological evaluation during in vitro chondrogenesis of dental pulp stromal cells. *Restor Dent Endod* 2012;37:34-40.
25. Ducret, M., Fabre, H., Degoul, O., Atzeni, G., McGuckin, C., Forraz, N., Farges, J.-C. (2016). Immunophenotyping Reveals the Diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells In vivo and Their Evolution upon In vitro Amplification. *Frontiers in Physiology*, 7, 512. <http://doi.org/10.3389/fphys.2016.00512>
26. Tomlinson, M. J., Jones, E. A., Giannoudis, P. V., Yang, X. B., and Kirkham, J. CD271 negative human dental pulp cells yield significantly more adherent colony forming cells than the positive phenotype. *Int. J. Stem Cell Res.* 2016. Ther. 3, 025.
27. Ducret M., Fabre H., Degoul O., Atzeni G., McGuckin C., Forraz N., et al. . (2016). A standardized procedure to obtain mesenchymal stem/stromal cells from minimally manipulated dental pulp and Wharton's jelly samples. *Bull. Group. Int. Rech. Sci. Stomatol. Odontol.* 53, e37.
28. Ducret M., Fabre H., Farges J.-C., Degoul O., Atzeni G., McGuckin C., et al. . (2015b). Production of human dental pulp cells with a medicinal manufacturing approach. *J. Endod.* 41, 1492–1499. [10.1016/j.joen.2015.05.017](http://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.017)

29. Alvarez R., Lee H.-L., Hong C., Wang C.-Y. (2015). Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp. *Int. J. Oral Sci.* 7, 205–212. 10.1038/ijos.2015.29
30. Díaz E.P, González L.R, Vargas U.L, García G.M, Oropeza M.M.P, Cano S. P. Innovación de la Técnica para Extracción de la Pulpa Dental Humana para Cultivo de Células Madre Mesenquimales y su Crioconservación. *Ortodoncia Actual / año 12, núm. 50, Septiembre de 2016.* 4-10.
31. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng Part C* 2006; 12:2813-2823.
32. Munévar Juan C, Gutiérrez Nicole, Jiménez Nury T, Lafaurie Gloria I. Evaluation of two human dental pulp stem cell cryopreservation methods. *Acta odontol. latinoam.* [Internet]. 2015 Ago [citado 2017 Abr 03]; 28(2): 114-121. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-48342015000200004&lng=es.
33. Cea-Sanhueza M., Sánchez-Sanhueza G. Células madre mesenquimales orales: estado del arte en Odontología. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2016 Abr [citado 2017 Mar 30]; 32(2): 97-105. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852016000200004&lng=pt
34. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. *PLoS One* 2012; 7(12):e51777
35. Gioventù S, Andriolo G, Bonino F, Frasca S, Lazzari L, Montelatici E, et al. A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfus Apher Sci* 2012;47(2): 199-206.

36. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine?: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning Adv Appl* 2014;7:89-99.
37. Grageda N.E. Guardar un diente, ¿salva una vida?, *Revista odontológica Mexicana*, 2014, 18 (1): 6-8.