



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

**Obtención de una población mesenquimal del
Ligamento Periodontal de dientes extraídos por
motivos ortodónticos.**

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA

RAMÍREZ RAMÍREZ OMAR

DICTAMINADORES:

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Dr. José Francisco Gómez Clavel

C.D. Ana Francisca Rodríguez Montemayor

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy





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.

Agradecimientos.

A mis padres.

Sabiendo que jamás encontrare palabras ni forma para agradecerles, el gran apoyo, confianza y amor incondicional que me brindan día con día

A mi padre, por instruirme en la vida y enseñarme nobles valore: amor, rectitud, justicia, caridad, verdad y el perdón. Caballero noble que me ha guiado de la mano a aspirar a lo mas alto.

A mi madre, que ha llegado conmigo hasta este momento, encontrando en su amor la fuerza para segur apoyándome,

Índice.

Tabla de contenido.

Agradecimientos.....	3
Índice.....	5
Introducción.....	8
<i>Ligamento periodontal.....</i>	<i>9</i>
<i>ORIGEN EMBRIONARIO.....</i>	<i>10</i>
<i>Componentes estructurales del ligamento periodontal.....</i>	<i>12</i>
<i>Células.....</i>	<i>12</i>
<i>ORGANIZACIÓN DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.....</i>	<i>15</i>
<i>Sustancia fundamental.....</i>	<i>17</i>
<i>Vascularización e inervación.....</i>	<i>18</i>
<i>Células Troncales Mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells).....</i>	<i>20</i>
<i>Clasificación de las células troncales.....</i>	<i>21</i>
<i>Células troncales mesenquimales de origen dental.....</i>	<i>31</i>
<i>PDLSCs Células Troncales Mesenquimales del Ligamento Periodontal.....</i>	<i>34</i>
<i>Osteogénesis.....</i>	<i>38</i>
<i>Componentes estructurales.....</i>	<i>39</i>
<i>Matriz ósea orgánica.....</i>	<i>40</i>
<i>Composición inorgánica.....</i>	<i>41</i>
<i>Osificación intramembranosa o directamente mesénquima.....</i>	<i>41</i>
<i>Remodelado óseo.....</i>	<i>41</i>
<i>Regulación de la resorción ósea.....</i>	<i>42</i>
<i>Osteocalcina.....</i>	<i>43</i>
<i>Runx2.....</i>	<i>44</i>
Justificación.....	45
Objetivos.....	49
<i>Objetivo General:.....</i>	<i>50</i>
<i>Objetivos específicos:.....</i>	<i>50</i>
Material y métodos.....	51
<i>Instrumental.....</i>	<i>52</i>
<i>Instrumental para extracción celular.....</i>	<i>52</i>
<i>Material para cultivo.....</i>	<i>52</i>
<i>Metodología.....</i>	<i>53</i>

<i>Obtención y transporte de la muestra</i>	53
<i>Técnica de extracción</i>	54
<i>Técnicas empleadas para el aislamiento celular</i>	54
<i>Ensayo para proliferación celular</i>	61
<i>Anticuerpos mesenquimales</i>	63
<i>Diferenciación osteogénica</i>	65
Resultados	67
<i>Obtención de la población celular</i>	68
<i>Evaluación de la capacidad de autorenovación de la población celular obtenida</i>	70
<i>Ensayo de Metil Tiazol Tetrazolio (MTT)</i>	70
<i>Capacidad de migración celular</i>	71
<i>Expresión de anticuerpos mesenquimales</i>	74
<i>Inmunocitofluorescencia con anti-CD90</i>	74
<i>Inmunocitofluorescencia doble con anti-CD105 y anti-vimentina</i>	75
<i>Inmunocitofluorescencia con anti-CD73</i>	76
<i>Diferenciación osteogénica</i>	78
<i>Tinción con rojo de alizarina</i>	79
<i>Expresión de Runx2</i>	80
<i>Expresión de osteocalcina</i>	81
Discusión	82
Conclusiones	91
Bibliografía	94
Abreviaturas	101
Anexos	103
<i>Anexo1. Consentimiento informado y ficha de identificación</i>	104
<i>Anexo 2 composición del D-MEM</i>	106

Introducción.

Ligamento periodontal.

El ligamento periodontal es un tejido conectivo fibroso, que se ubica entre el hueso alveolar propiamente dicho y el cemento que cubre la raíz del diente (Ilustración 1), el Ligamento Periodontal se encuentra recubriendo la raíz del diente en su totalidad y a su vez se conecta con el tejido de la encía y está compuesto de fibras, células y sustancia intercelular, esta última contiene colágeno, sustancia fundamental con contenido proteico y polisacáridos. Este tejido, al paso del tiempo ha recibido diferentes denominaciones como: periodonto, gonfosis, membrana periodontal, ligamento alveolo dental y desmodono. El ancho del ligamento periodontal varía notablemente de un individuo a otro, en los distintos órganos dentarios y aun en las diferentes zonas de un mismo diente, su espesor oscila entre los 0.10 y 0.38 mm, este espesor disminuye notablemente con la edad, teniendo un ancho promedio de 0.20 mm en individuos jóvenes y 0.15 mm en personas mayores de 50 años. El grosor también aumenta cuando los dientes entran en función masticatoria y es más delgado cuando los órganos dentales no son funcionales o retenidos; se ha determinado que la raíz del diente presenta una zona angosta, que actúa como eje de movimiento respecto a las zonas más anchas, este eje es llamado "fulcrum" y se ubica hacia la mitad de la raíz clínica, por lo general más cerca del ápice, en concreto en la unión de tercio medio con tercio apical; en dientes

unirradiculares el fulcrum es fácil de identificar, no así en los multirradiculares cuyo eje de movimientos laterales se proyecta en el tabique óseo interradicular.

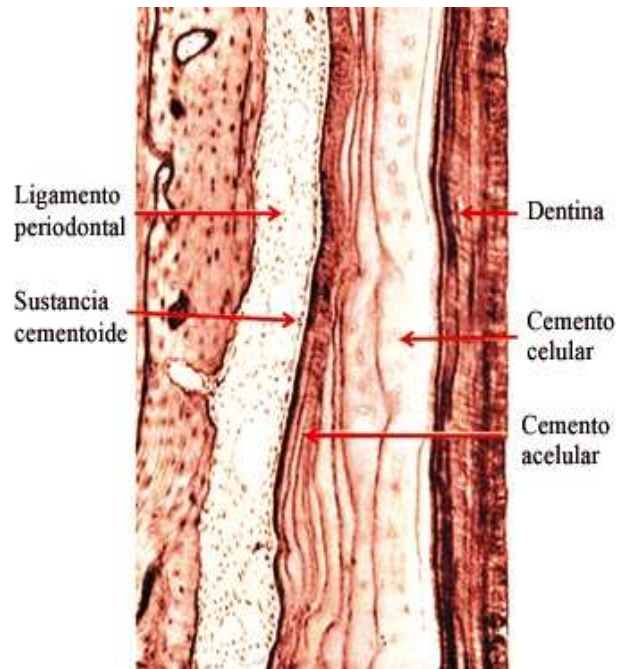


Ilustración 1 Corte histológico del periodonto de inserción. (Landín, 2012)

ORIGEN EMBRIONARIO.

Las células de la cresta neural constituyen el ectomesénquima de la cabeza y el cuello e inducen la formación de muchos tejidos conectivos de la cara, entre los cuales se incluyen las estructuras dentales. Las células de la cresta neural migran desde el pliegue neural hasta encontrar la membrana bucofaríngea, la cual ha desarrollado una prolongación de células ectodermales que están en cercanía con el neuroectodermo y constituyen el ectodermo del estomodeo o cavidad oral primitiva.

Durante la sexta semana de vida intra-uterina, en el día 37, el ectodermo que cubre la cavidad oral, está compuesto por una capa de epitelio oral de 2 a 3 células de espesor, forma una banda continua de epitelio que cubre la boca. Esta banda tiene forma de herradura y corresponde a la posición de los futuros arcos dentarios en los maxilares superior e inferior. En la región del proceso alveolar posterior, la interacción epitelio-mesenquimal induce al ectodermo oral a proliferar y formar la lámina dental. Esta banda origina dos subdivisiones, la lámina vestibular y la lámina dentaria. (Sperber, 1989.)

La lámina dentaria comienza una actividad proliferativa intensa y localizada que da origen a la formación de una serie de crecimientos epiteliales dentro del ectomesénquima en los sitios correspondientes a las posiciones de los futuros 20 dientes de la primera dentición. Desde este momento el desarrollo de los dientes se realiza en tres etapas: brote o yema, casquete, y campana. (Ilustración 2)

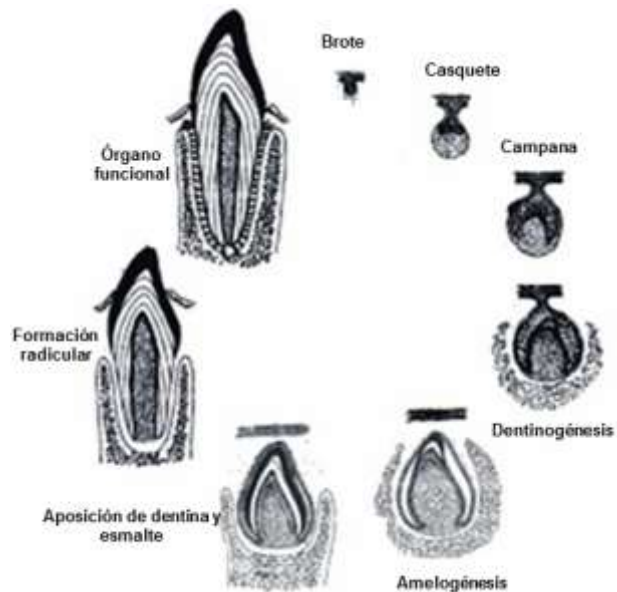


Ilustración 2 Dases de la odontogénesis (Avery, 2001)

Después de que la corona ha terminado su formación, las células del epitelio dental interno y externo se acercan, y con una mínima inclusión del estrato intermedio y del retículo estrellado, estos proliferan y forman una bicapa de células denominada: lámina radicular o vaina epitelial de Hertwig. Mientras se están formando las raíces, también se están formando los tejidos de soporte del diente, a partir del folículo dental. A medida que se fragmenta la vaina radicular, las células ectomesenquimatosas del folículo dental penetran por las fenestraciones epiteliales y se apoyan contra la recientemente formada dentina radicular. En esta situación, las células se diferencian en células formadoras de cemento o cementoblastos, que tienen como función elaborar la matriz orgánica compuesta por colágeno y sustancia fundamental, la cual se mineraliza y en la que se insertarán los haces de fibras colágenas del ligamento periodontal. Las células del ligamento periodontal y los haces de fibras también se diferencian a partir del folículo dental.

El folículo o saco dental es una condensación mesenquimal que inicialmente rodea el órgano del esmalte y encierra la papila dental. Más tarde, éste rodea la corona y eventualmente la raíz del diente.

El ligamento periodontal se origina a partir del folículo dental y es el tejido conectivo blando especializado que da anclaje al diente. Sus fibras están embebidas en el cemento sobre la superficie del diente y en el hueso alveolar en el otro extremo.

Algunos haces de fibras finas del ligamento periodontal en formación aparecen a medida que comienza la formación radicular. En este momento, las células foliculares muestran un incremento en la actividad proliferativa. Las células más internas cercanas a la raíz se diferencian en cementoblastos y producen cemento. Las más externas se diferencian en osteoblastos y construyen el recubrimiento del saco óseo. Las células que se localizan entre estas dos últimas se diferencian en fibroblastos que producen fibras colágenas que se van a adherir entre el cemento y el hueso alveolar. Al principio, todas las fibras del ligamento periodontal corren oblicuamente en dirección coronal, desde el diente al hueso. Los fibroblastos apicales son las células que proliferan y migran cervicalmente para formar el

primer grupo de fibras colágenas. A medida que la erupción del diente se produce, la oblicuidad de las fibras gradualmente decrece y la posición de la unión cemento esmalte, la cual estaba originalmente apical a la cresta de la cripta se coloca a este nivel, para luego localizarse coronal a la cresta alveolar. Este cambio entre la unión cemento-esmalte y la cresta alveolar puede relacionarse con su papel funcional durante la erupción dental. (Avery, 2001)

Componentes estructurales del ligamento periodontal.

Como todo tejido conectivo denso, está constituido por células, fibras, y sustancia fundamental amorfa, además posee vasos y nervios.

Células.

Es un tejido conjuntivo fibrilar, que presenta una alta densidad celular heterogénea en donde predominan los fibroblastos que representan el 20% del total.

Desde el punto de vista funcional podemos clasificar los siguientes grupos celulares:

- I. **Células formadoras:** fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos.
- II. **Células resortivas o remodeladoras:** osteoclastos y cementoclastos.
- III. **Células defensivas:** macrófagos, mastocitos y eosinófilos.
- IV. Células epiteliales de Malassez.
- V. Células madres ectomesenquimales. (Ferraris, 1999)

Fibroblastos.

Fueron descritos por Cate en 1998(Cate., 1998.) como las células “arquitecto, constructor y responsable del mantenimiento del tejido conectivo”. Esta célula produce la sustancia que conforma el tejido conectivo, incluyendo el colágeno, los proteoglicanos y la elastina. La importancia de esta scélulas es el alto grado de recambio que experimentan en el tejido periodontal, pues los haces de colágeno que lo forman son remodelados, removidos y reemplazados de modo constante. La degradación del colágeno es llevada a cabo por un solo grupo celular que se podría denominar “fibroclasto”.

La degradación o remodelación involucra dos fases 1) la síntesis, y posterior liberación de la colagenasa y 2) la fagocitosis por parte de los fibroclastos de los

restos de colágeno degradados que son digeridos por medio de sus lisosomas; existe un equilibrio fisiológico entre la elaboración y la degradación de los componentes para conservar la estructura normal del ligamento.

Webb ha descrito en los fibroblastos del ligamento periodontal la coexpresión de Vimentina (es una proteína que muestra alto grado de especificidad en las células de origen mesenquimal y en vías de maduración) y citoqueratina durante la fase de erupción dental. (Ferraris, 1999)

Cumplen con producción de citoquinas con la capacidad de promover la destrucción tisular y estimular la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos. (Genco, 1992.)

Los fibroblastos se disponen paralelos a los haces de fibras y en apariencia sus prolongaciones envuelven a las mismas, esta disposición permite que durante los movimientos fisiológicos del diente u ortodónticos los fibroblastos remodelen los haces de fibras colágenas del ligamento.

Los fibroblastos presentan dos receptores de superficie muy característicos el EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) y la IL-1 (Interleucina 1). El incremento de IL-1 estimula la actividad sintética del fibroblasto, produce colagenasa e IL-6 que estimulan la actividad osteoclástica.

Osteoblastos.

Son células provenientes de estirpe mesenquimal, provenientes del estroma de la médula ósea. Se encuentran en el ligamento cubriendo la superficie periodontal del hueso alveolar (zona osteógena). Funcionalmente existen dos tipos de osteoblastos, los activos que sintetizan continuamente laminillas óseas y los inactivos o de reserva.

Osteoclastos.

Derivan de las células hematopoyéticas, en concreto de la línea monocito-macrófago por lo que, la mayor parte de los precursores osteoclásticos se encuentran en el seno de la medula ósea, al igual que existen precursores

circundantes en la sangre periférica. Se han identificado precursores osteoclásticos quiescentes más diferenciados próximos a la superficie de las trabéculas óseas. (Mizoguchi T, 2009.)

Su presencia en el tejido normal, se debe a que permanentemente hay procesos de resorción y aposición, para permitir los movimientos funcionales de posición de los elementos dentarios.

Cementoblastos.

Se encuentran ubicados a la superficie del cemento, en el lado del ligamento periodontal (zona cementógena del periodonto), podemos encontrarlos como células activas o inactivas. En las raíces en desarrollo suele encontrarse una capa continua de cementoblastos activos en toda la extensión; los dientes con raíces completamente formadas solo se encuentran cementoblastos activados en tercio medio y apical.

Cementoclastos.

También pueden ser denominadas odontoclastos debido a su capacidad de resorción de dentina y cemento, son células que solo aparecen en ciertos procesos patológicos, o durante la rizoclasia fisiológica de los dientes temporales.

Mastocitos o células cebadas.

Son células que se encuentran cerca de los vasos sanguíneos y que contienen gránulos densos de heparina, histamina y enzimas proteolíticas. En ciertas condiciones patológicas estas células presentan degranulaciones debido a lesiones tisulares, aunque su función en el tejido periodontal es aún discutida.

Macrófagos.

Son células provistas de abundantes gránulos de lisosomas, que desempeñan una función de desintoxicación y defensa del huésped, principalmente por su capacidad para ingerir, destruir y digerir microorganismos y sustancias extrañas que podrían alterar la integridad del ligamento periodontal.

Células o restos epiteliales de Malassez.

Es posible hallar en el ligamento con frecuencia, hacia el lado de la superficie cementaria, nidos o acúmulos celulares de naturaleza epitelial; son restos desorganizados de la vaina epitelial de Hertwig, su distribución y frecuencia cambia con la edad.

Células ectomesenquimáticas indiferenciadas.

Se trata de células que se encuentran en gran cantidad en el tejido conectivo periodontal, en comparación con otros tejidos del cuerpo. Son células pluripotenciales que se sitúan alrededor de los vasos sanguíneos en una extensión de aproximadamente 10 μm . Tras la división de estas células, una célula hija permanece en la zona perivascular indiferenciada o con su calidad de pluripotente y otra se diferencia hacia fibroblastos, cementoblastos u osteoblastos. (Gould Reginald, 1972.) Estas células poseen en su citoplasma abundante retículo endoplásmico rugoso y sintetizan el tropocolágeno.

ORGANIZACIÓN DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.

Las fibras del ligamento periodontal las podemos clasificar de acuerdo a su composición y a su localización con respecto a los dientes.

De acuerdo a su composición podemos clasificar a las fibras: colágenas, reticulares, elásticas, oxitalámicas y de elaunina.

Clasificación de acuerdo a su localización

Con respecto a los dientes, las fibras pueden ser clasificada en dos grupos de fibras: el **grupo gingival** que se encuentra localizado alrededor de los cuellos de los dientes; y el **grupo dentoalveolar** que se localizan rodeando a la raíz de los órganos dentales.

Las fibras dentoalveolares son predominantemente fibras colágenas estratégicamente posicionadas, con inclinaciones importantes para sus funciones a lo largo de la superficie radicular, desde la región cervical hasta el ápice de la raíz. Estos haces se encuentran incluidos en el cemento radicular y se extiende hacia el interior del hueso alveolar. ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

Grupo de fibras gingivales.		
<i>Grupo de fibras.</i>	<i>Lugar de inserción.</i>	<i>Función.</i>
Transeptales.	Región cervical del diente a diente (mesial a distal).	Resistir la separación mesial o distal del diente.
Adheridas.	Región cervical del diente a encía adherida.	Resistir el desplazamiento gingival.
Libres.	Región cervical del diente a encía libre.	Resistir el desplazamiento gingival.
Circunferenciales.	Se ubica continua alrededor del cuello del diente.	Resistir el desplazamiento gingival.
Grupo de fibras dentogingivales.		
<i>Grupo de fibras.</i>	<i>Lugar de inserción.</i>	<i>Función.</i>
Apicales.	Ápice de la raíz a hueso alveolar.	Resiste fuerzas verticales.
Oblicuas.	Tercio apical de la raíz a hueso alveolar.	Resistir fuerzas verticales e intrusivas.
Horizontales.	Porción media de la raíz a hueso alveolar.	Resistir fuerzas horizontales y de inclinación.
Crestoalveolares.	Porción cervical de la raíz a cresta alveolar del hueso alveolar.	Resistir fuerzas verticales e intrusivas.
Interradicales.	Entre raíces a hueso alveolar.	Resistir movimientos verticales y laterales.

Cuadro 1 Grupos de fibras gingivales y dentogingivales ubicación y función. (Avery James, 2007)

Fibras colágenas.

Representan la mayor parte del componente fibrilar. Las fibras están constituidas por colágeno tipo I, tipo III y tipo V. al margen de las fibras en el ligamento periodontal, se ha detectado también colágeno tipo IV en las membranas basales que rodean las terminaciones nerviosas.

Las moléculas de colágeno (tropocolágeno) que forman las fibras se agregan entre sí apenas son secretadas, constituyendo las microfibrillas del colágeno que poseen una estriación transversal característica. Las microfibrillas se agrupan en fibras, las cuales en el ligamento periodontal se disponen en haces definidos y

presentan diferente orientación según las zonas del ligamento. Cada fibra parece una cuerda retorcida y sigue un recorrido ondulado, la fibra es flexible y muy resistente a la tracción permitiéndole cierto grado de movimiento al diente.

Las microfibrillas individuales pueden ser remodeladas de forma continua, en cualquier trecho de su recorrido, mientras que las fibras mantienen su arquitectura y función intactas.

Fibras reticulares y elásticas.

Estas son escasas, por lo general se hallan formando parte de las paredes de los vasos que irrigan el periodonto, se pueden identificar con impregnaciones argénicas de ahí que reciban la denominación de fibras argirófilas.

Fibras oxitalánicas y de alauina

Estas fibras se ponen de manifiesto con la técnica de Halmi con ácido paracético y fucsina aldehídica. Son consideradas fibras elásticas inmaduras. Las fibras de oxitalán siguen una dirección axial al diente, con un extremo incluido en el cemento o en el hueso y el otro en la pared de un vaso sanguíneo o en el tejido conectivo que rodea a las estructuras neurovasculares. Son más abundantes en la zona del ápice y se cree que podrían tener la función de sostener los vasos del ligamento y participar directa o indirectamente en el sistema mecanorreceptor del ligamento periodontal.

El ligamento periodontal está compuesto por dos grupos de fibras denominadas de acuerdo con su localización respecto a los dientes.

Tenemos al grupo gingival que se encuentra localizado alrededor de los cuellos de los dientes y el grupo dentoalveolar que rodea las raíces de los dientes.

Sustancia fundamental.

La sustancia fundamental o matriz amorfa del ligamento periodontal presenta una elevada proporción de proteoglicanos unidos a proteínas (GAG). Entre los que se ha detectado: hialuronan, condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato, heparán sulfato y dermatán sulfato; siendo este último el más abundante.

Su composición química varía según los estímulos que pudiera presentar, si predominan las tensiones aumenta el dermatán sulfato, mientras que el condroitínsulfato se incrementa con las tracciones o compresiones. En las alteraciones del ligamento a medida de que aumenta la gravedad de la lesión disminuye el dermatán sulfato y aumenta el condroitín 4-sulfato.

Entre las proteínas adhesivas estudiadas en el ligamento periodontal destacan la **ondulina** que está relacionada con la organización supramolecular de los haces de colágena, la **tenascina** que se encarga de la orientación de los movimientos celulares, localizada en las zonas de adhesión entre los tejidos mineralizados y no mineralizados; y la **fibronectina** distribuida homogéneamente en el ligamento periodontal y relacionada con el contacto entre las células.

La decorina es un proteoglicano que se relaciona en la organización estructural del ligamento periodontal.

La sustancia fundamental se encuentra distribuida junto al hueso alveolar, y es esencial para el mantenimiento y la función normal del tejido conectivo, ya que se encarga del transporte de metabolitos, agua, nutrientes, etc.

La síntesis de los componentes de la sustancia fundamental se lleva a cabo en las células formadoras de los fibroblastos y su degradación se realiza a partir de metaloproteasas sintetizadas y segregadas también por dichas células.

Vascularización e inervación.

Normalmente los ligamentos no tienen desarrollados los vasos sanguíneos, linfáticos ni las estructuras nerviosas, pero el ligamento periodontal es una excepción, ya que esta ricamente inervado e irrigado, con un aporte linfático abundante.

Estas estructuras se encuentran alojadas en el espacio intersticial del ligamento correspondientes a porciones de tejido conectivo laxo.

Se forma una red de arteriolas y capilares, así como anastomosis arteriovenosas y estructuras glomerulares. El plexo más evidente se encuentra en las proximidades del hueso hacia el cemento y presenta más desarrollo en el tercio apical y cervical, las venas drenan la sangre por vasos de dirección axial principalmente hacia la zona periapical.

Se ha descrito que el aporte sanguíneo periodontal no es uniforme en todas las zonas del diente, ni tampoco en la arcada dentaria, es más abundante en la región de los molares y a nivel de la superficie mesial y distal del diente.

*La inervación sensorial del ligamento periodontal proviene de los nervios maxilar superior y alveolar inferior. Los pequeños nervios van siguiendo el trayecto de los vasos sanguíneos, ramificando desde la región periapical hacia gingival y otros que penetran los tabiques del hueso alveolar; estructuralmente las fibras nerviosas pueden clasificarse como: 1) **mielínicas**: estas tienen terminaciones complejas, mecanorreceptores especializados que funcionan como receptores de tacto, presión y propiocepción durante la masticación y la oclusión; y 2) **fibras amielínicas**: que son fibras son autónomas y controlan los vasos sanguíneos, otras son sensoriales y aparentemente dan terminaciones libres que funcionan como receptores de dolor.*

Células Troncales Mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells).

El término "Célula Troncal" (Del Inglés Stem Cell) fue utilizado por primera vez en la década de los 90's por Haynesworth (Haynesworth SE, 1992); sin embargo, debido a que no existía un consenso entre los investigadores que determinará un término correcto y las características que deberían de tener estas células, durante la siguiente década surgieron muchos nombres, como, "progenitor estromal", "célula progenitora mesenquimal", "célula estromal de medula ósea", etc. (Flores Figueroa E, 2006.).

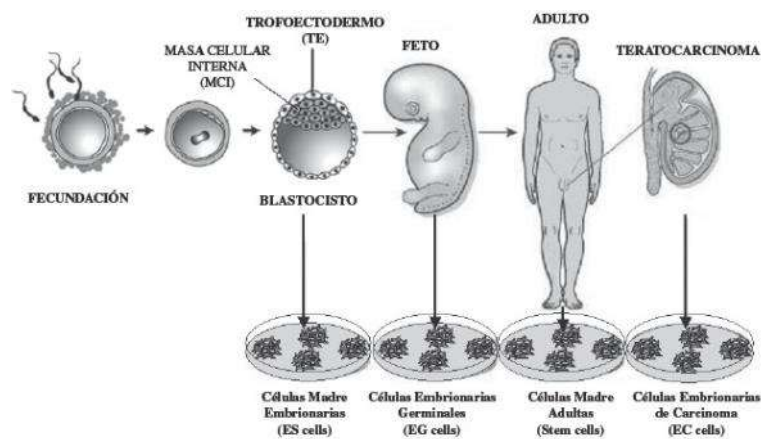
Las células troncales mesenquimales fueron caracterizadas por primera vez por Freidenstein en 1974, aisladas a partir de la medula ósea las identifico como células adherentes con morfología fibroblastoide, denominadas como unidades formadoras de colonias de fibroblastos CFU-F (Friedenstein AJ D. U., 1974.).

Actualmente, las células troncales, se han definido como células inmaduras, no diferenciadas, con alta capacidad de auto-renovación y que puede diferenciarse en otros tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo.

Para poder identificar a una población celular troncal, es necesario tomar en cuenta

criterios funcionales ya que, estas células no poseen características morfológicas específicas que puedan

distinguirse del resto de las células del tejido al que pertenecen.



Modificada de Donovan y Gearhar, 2001.

Ilustración 3 Fuentes de obtención de las células troncales. (ME Arias, 2009)

Clasificación de las células troncales.

A lo largo del desarrollo de los mamíferos, se generan diversos tipos de células troncales que son clasificadas de acuerdo a la plasticidad celular con la que cuentan. La primera clasificación se presenta en el huevo fertilizado, o cigoto, en donde se encuentra la célula troncal **totipotencial**, capaz de producir tanto al embrión, como a las estructuras extraembrionarias, que son fundamentales para su desarrollo como: la placenta, el saco vitelino y el cordón umbilical. Hasta el estadio de mórula, cada una de las células que se producen son idénticas, es decir todas son células troncales **totipotenciales**.

El desarrollo del embrión avanza hasta alcanzar el estadio de blastocisto, en el que cada una de las células que forma parte de la masa celular interna es capaz de formar cualquier tipo de tejido del organismo, de ahí que se les considere células troncales **pluripotenciales**.

A partir de las células troncales embrionarias (ESC, Embryonic Stem Cells), se producen diferentes células troncales somáticas, son consideradas **multipotenciales** ya que pueden generar diversos tipos celulares dentro de un mismo linaje. Así como también, se pueden producir células troncales no somáticas, las células troncales germinales, las cuales migran a las gónadas en desarrollo y eventualmente dan lugar a los gametos.

Células madre embrionarias.

Las células madre embrionarias (ESC) se derivan de la masa celular interna del blastocisto; estas células presentan propiedades distintivas como la capacidad de diferenciarse en cualquier derivado de las tres capas germinales, y son capaces de propagarse indefinidamente en condiciones definidas (Ying & Nichols J, 2003.)

En 1981 el Dr. Evans publicó por vez primera una técnica para el cultivo de embriones de ratón en el útero y la derivación de células ESC a partir de estos embriones (Evans M, 1981.).

En 1998 un equipo de investigadores dirigido por Thomson informo del aislamiento y cultivo de células madre embrionarias humanas (**hESC**) (1998).

El 23 de enero del 2009 la Food and Drug Administration (FDA) de EE. UU otorgó la aprobación del primer ensayo clínico en fase I, para la aplicación de oligodendrocitos derivados de hESC en pacientes con lesiones medulares.

Las hESC presentan múltiples desafíos que aún no se han esclarecido del todo, uno de los más importantes es el control de la proliferación que puede llegar a ser descontrolada, así como el control de las vías de diferenciación que deben tomar para generar una célula adulta funcional tanto en estudios "in vitro" como en modelos preclínicos.

El riesgo que conlleva aplicar una terapia celular con hESC son los efectos secundarios, como la posibilidad de formación de teratomas u otro tipo de neoplasias.

Para reducir el riesgo de la formación de alguna neoplasia en el uso clínico de las hESC, son sometidas a diferenciación específica, y se someten a clasificación por citometría de flujo para la purificación de las células que se implantaran, reduciendo así el riesgo inherente de la formación de teratomas; se reducen los genes esenciales para la autorrenovación y pluripotencialidad de las hESC.

Células Troncales Pluripotentes Inducidas (iPSC).

En los últimos años, se ha logrado desarrollar una técnica que permite la reprogramación de células maduras o diferenciadas a un estado de pluripotencialidad y posteriormente, estas pueden ser diferenciadas a células somáticas adultas mediante la expresión de genes específicos; las iPSC son similares a las ESC en muchos aspectos, tales como la expresión de genes, tiempo de duplicación, formación de cuerpos embrionarios, teratomas y tienen la capacidad de formar quimeras viables (Ying & Nichols J, 2003.)(Hopkins., 2011.).

James Thomson y su grupo de investigadores aislaron por primera vez células troncales pluripotentes de blastocistos de origen humano, en donde mantuvieron la proliferación celular durante 4 y hasta 5 meses, y observaron que las células aun mantenían el potencial para la formación de un trofoblasto y los derivados de las tres capas germinales.(Thomson JA1, 1998.).

Actualmente, se ha conseguido cultivar células pluripotentes y se han desarrollado métodos de diferenciación para obtener cualquier tipo celular por lo que, se considera que las ESC son una buena fuente de células para la aplicación en Medicina Regenerativa; sin embargo, presentan una fuerte controversia bioética y moral, en este punto es en donde radica el gran avance que se obtuvo cuando se descubrieron las células pluripotentes adultas o de origen no embrionario.

Célula troncal tumoral (CSC).

La existencia de las células troncales del cáncer se ha debatido desde hace ya muchos años; los patólogos Rodolph Virchow y Julius Cohnhein en 1855 realizaron la teoría en donde se proponía que las células cancerosas eran el resultado de la activación de tejido embrionario quiescente y remanente, sosteniendo esta teoría debido a que comparando los estudios histológicos de un feto en desarrollo con un teratocarcinoma estos compartían muchas similitudes morfológicas (Rosana Pelayo, 2011.). La primera evidencia concluyente se publicó en 1997 (Bonnet D, 1997) donde aislaron una subpoblación celular de pacientes con leucemia mieloide aguda, las cuales expresaban el antígeno de superficie CD34+ y carecía del antígeno CD38-; los autores establecieron que las subpoblaciones CD34+/CD38- eran capaces de formar tumores en estudios "in vivo".

Las CSC comparten características con las células troncales progenitoras y adultas pero no comparten la expresión de antígenos de superficie similares (Hopkins., 2011.); por lo que se cree que estos tipos celulares sufren mutaciones y expansión descontrolada. Otra hipótesis razonable es la de-diferenciación de las células cancerosas y asumen características similares a las células troncales (Hopkins., 2011.).

Tipo de tumor.	Antígeno de superficie	Referencia.
Leucemia mieloide aguda.	CD34+/CD38-	(Bonnet D, 1997)
Tumor cerebral.	CD133+	(Singh SK, 2013)
Cáncer de mama.	CD44+/CD24-	(Al-Hajj M, 2013)
Mieloma múltiple.	CD138+	(Matsui W, 2004)
Cáncer de colon.	CD133+	(O'Brien CA, 2007)
Cáncer de hígado.	CD133+	(Ma S, 2007.)
Cáncer de páncreas.	CD44+/CD24+	(Li C, 2007.)
Cáncer de pulmón.	CD133+	(Eramo A, 2008.)
Cáncer de ovario.	CD44+/CD117+	(Zhang S, 2008.)
Cáncer de próstata.	CD133+/CD44+	(Maitland NJ, 2008.)
Melanoma.	CD4+/CD25+/FoxP3+	(Schatten T, 2008.)
Cáncer gástrico.	CD44+	(Takaishi S, 2009.)'

Cuadro 2 Antígenos de superficie identificados en diversos tipos de cancer. (Hopkins., 2011.)

Células troncales mesenquimales adultas (MSC)

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (**ISCT**, *International Society for Cellular Therapy*) propuso tres criterios para definir las células troncales mesenquimales; primero estas células deben ser adherentes en cultivo, segundo expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero las células madre mesenquimales deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (Horwitz E, 2006).

Además de lo propuesto por la **ISCT**, se deben considerar dos aspectos adicionales para clasificarlas como células mesenquimales, deben realizar procesos de autorrenovación, es decir, durante la división celular solo una de las células hijas debe iniciar programas de diferenciación celular y que sean capaces de desarrollar plasticidad clonogénica o diferenciación hacia tejidos de las diferentes capas embrionarias.

Caracterización.

Morfológicamente, las células troncales adultas, se caracterizan por presentar una morfología espigada, en forma de hueso, con la presencia de un núcleo alargado, central, que contiene dos o tres nucléolos en cultivo; sin embargo, se ha reportado que la población celular aislada contiene células homogéneas en su morfología, por lo que, además deben expresar por los menos, los antígenos de superficie estandarizados por la ISCT, ya que se sabe que no todas las células troncales expresan los mismos antígenos por ello, se han investigado diversas moléculas expresadas en las células troncales mesenquimales

Fuentes de obtención de las células troncales.

Las principales fuentes de obtención para el aislamiento de las células troncales son: el tejido adiposo, medula ósea, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, tejido neural, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal. En embargo, los tejidos más estudiados son la medula ósea, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical. (Freese KE, 2015) (Zhan J, 2012) (Mazini L, 2014)

Regulación de las funciones de las células troncales.

La viabilidad autorreplicación y diferenciación de las células troncales son procesos extremadamente complejos que dependen de diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos.

Los elementos intrínsecos reguladores de la función de las células troncales incluyen a proteínas responsables de inducir divisiones celulares, tanto simétricas como asimétricas; factores de transcripción nuclear que controlan de manera positiva y negativa la expresión genética de moléculas reguladoras del ciclo celular y moléculas que actúan como relojes poblacionales de células progenitoras.

Cada célula troncal puede dar origen a dos células troncales (división simétrica) o a una célula troncal y a una célula progenitora (división asimétrica), esta división celular está influenciada por ciertas proteínas citoplasmáticas o membranales,

heredadas por cada célula hija durante la división mitótica. Es decir, las divisiones simétricas y asimétricas de las células troncales pueden depender de una distribución homogénea o heterogénea de algunas proteínas localizadas en la superficie membranal o en ciertas regiones del citoplasma.

Elementos extrínsecos, las células troncales se desarrollan dentro de microambientes específicos constituidos por diferentes tipos celulares y sus productos, el conjunto de estos elementos proporcionan señales que controlan el comportamiento de las células troncales, modulando la expresión y actividad de los elementos intrínsecos presentes en la célula, el microambiente es complejo tanto estructural como funcionalmente puesto que la interacción de sus células y la comunicación entre las células troncales puede llevarse a cabo mediante contacto físico directo, a través de moléculas de adhesión y/o interacciones ligando-receptor. La interacción entre ambos tipos celulares pueden darse de manera indirecta es decir, a través de moléculas producidas y secretadas por ellas; secretan moléculas como la colágena, fibronectina, laminina y proteoglicanos; estas forman una intrincada red molecular conocida como matriz extracelular. Las células troncales expresan en su superficie una serie de integrinas que interactúan con dicha matriz.

Otro tipo de interacción, es a través de proteínas secretadas por ambos tipos celulares y que se presentan de manera soluble. Una amplia gama de moléculas como factores de crecimiento, interleucinas, interferones, quimiocinas, etc. son producidas por las células del microambiente y llegan hasta la célula troncal, para inducir o inhibir su proliferación, diferenciación y/o migración. Dependiendo de la distancia que viajen dichas moléculas llevarán a cabo acciones de tipo endócrino, autócrino o parácrino.

Plasticidad de las células troncales mesenquimales.

Es el fenómeno por el cual se extrae una célula de su nicho natural, y es manipulada o no, ex vivo, y trasplantada en otro entorno fisiológico, siendo esta capaz de dar lugar a otros linajes celulares no previstos según su programación de desarrollo estándar. (Bernard., 2010.) En este proceso se han implicado diferentes mecanismos, no totalmente clarificados; que incluyen: dediferenciación, transdiferenciación y reprogramación (Rovó A, 2008.)

La plasticidad de las células troncales se puede definir como la capacidad de diferenciación que éstas poseen para dar lugar a la formación del tejido de donde provienen, y también a células provenientes de diferente capa germinal y bajo ciertas condiciones de cultivo se podrán transdiferenciar; la transdiferenciación describe la conversión de una célula de un linaje específico a otra de un linaje distinto, perdiendo funciones y marcadores del linaje original y adoptando las características morfofuncionales de la célula adquirida.

Por estas razones, las células troncales son una nueva opción terapéutica prometedora tanto en la Medicina Regenerativa como en la Ingeniería de Tejidos.

Inmunoregulación de las células troncales mesenquimales.

Las células mesenquimales tienen la capacidad de regular la función de diferentes componentes del sistema inmune, tanto "in vivo" como "in vitro"; entre ellos los linfocitos T, células dendríticas, linfocitos B y células NK; influyen sobre la maduración de células dendríticas; el mecanismo clave de la inhibición de los linfocitos va dirigida hacia un fenotipo supresor de la maduración de las células presentadoras de anticuerpos, dando como resultado una respuesta atenuada de los linfocitos T, sin embargo, no es estrictamente necesaria la supresión de las células presentadoras de anticuerpos; ya que pueden utilizar la estimulación directa de anticuerpos CD3 y CD28. Así como en la protección frente a patologías inflamatorias y/o autoinmunes, incluyendo el rechazo a trasplantes al inhibir la respuesta inmune. (Rasmusson, 2006.). El efecto inmunoregulador puede darse a través del contacto celular y/o mediante la secreción de diversos factores (Huang, 2009).

Marcadores específicos.

Las células troncales mesenquimales también han sido caracterizadas con anticuerpos ya conocidos y expresados en otros tipos celulares. Las células troncales mesenquimales no expresan los antígenos de células hematopoyéticas como: CD11b, CD14, CD31, CD34, CD43, CD45, CD56, CD68 y CD133; siendo positivas los marcadores como CD73, CD90, CD105, etc. (Cuadro 3)

CD73 (5'-ecto-nucleotidasa).

Es una molécula de 75 kDa que se encuentra anclada a una proteína de la superficie celular codificada por el gen *NT5E*, también conocido como *ecto-5nucleotidasa*. Como nucleotidasa, *CD73* cataliza la hidrólisis de adenosinmonofosfato (AMP) en adenosina y fosfato, además de su función enzimática *CD73* es una molécula de señalización y adhesión capaz de regular la interacción de las células con los componentes de la matriz extracelular, tales como la laminina y fibronectina; la concentración de varias moléculas de *CD73* facilitan la adhesión y activación de más moléculas de adhesión, también actúa como una molécula de transducción del sistema inmune, en particular como un coestimulante en la activación de células T, sirve como un marcador de maduración celular.

Aunque *CD 73* es uno de los principales marcadores de las MSC según la ISCT, se sabe poco sobre la función de esta molécula sobre las células, la expresión de *CD73* esta mediada por la señalización de *Wnt-β-Catenina*, una de las principales vías en la homeostasis ósea, también es regulada por otra parte por citoquinas y factores de crecimiento, tales como *TFG-β*, *IL-1β* y *TNF-α*.

Recientemente, se ha notificado que participa en la diferenciación osteogénica: la disminución en la expresión de *CD73* provoca un contenido mineral óseo menor en hueso trabecular de ratones macho acompañados con la disminución de los niveles séricos de osteocalcina. Los osteoblastos de calota de ratones *CD73*-deficientes, producen menos fosfatasa alcalina y nódulos de calcificación, por el contrario las células que expresan mayor *CD73* expresaban más osteocalcina, sialoproteína ósea y tenían mayor producción de fosfatasa alcalina y nódulos de calcificación (Andrea Ode, 2013.)

CD105 (endoglina).

Es una glicoproteína homodimérica de 180 kDa, pertenece a la familia de las proteínas extracelulares de la zona pelúcida; fue descubierta a finales de la década de 1980, como un marcador de células endoteliales humanas; estudios posteriores demostraron que se expresa en macrófagos, células precursoras de eritrocitos, sincitiotrofoblastos de la placenta terminal y en células estromales, y es considerado uno de los tres marcadores para la identificación de células troncales mesenquimales.

El gen que codifica la endoglina se localiza en el brazo largo del cromosoma 9 humano, y las mutaciones de este son las responsables de un trastorno vascular autosómico dominante llamado talangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (THHI), presenta afinidad a distintas isoformas de TGF- β en las células del endotelio humano y desarrolla un papel importante en la amelogénesis (L. García Pozo, 2008)

CD90 (Thy-1)

Es una proteína de 25-37 kDa, anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) se encuentra presente en la membrana celular, se expresa en múltiples tipos celulares; como células endoteliales, células mesenquimales, dendritas de las neuronas, y es expresado en los axones una vez que el crecimiento axonal es completo.

La función de CD90 no ha sido completamente aclarada sin embargo, se especula que interviene en diferentes procesos biológicos como la migración trans-endotelial de leucocitos y apoptosis celular, es un regulador importante en la interacción célula-célula y célula-matriz, metástasis, sin embargo, también se considera como un supresor de tumores en el cáncer de ovarios, y carcinoma nasofaríngeo, interviene en procesos inflamatorios y adhesión celular. Se sabe que co-estimula las células T a través de CD28, actuando como una señalización del receptor de estas (Hagood., 2006.)

Proteínas expresadas en las células troncales.	
Nombre.	Marcador de membrana.
Moléculas de adhesión.	
ALCAM	CD66
ICAM-1	CD54
ICAM-2	CD102
ICAM-3	CD50
L-selectina	CD62L
LFA-3	CD58
NCAM	CD56
HCAM	CD44
VCAM	CD105
Factores de crecimiento y receptores de citocinas.	
IL-1R	CD121
IL-3R	CD123
IL-4R	CD124
IL-6R	CD126
IL-7R	CD127
Interferón α R	CDw119
Factor de necrosis tumoral α 1-R	CD102a
Factor de necrosis tumoral α 2-R	CD102b
Receptor de transferrina	CD71
Integrinas.	
VLA – α 1	CD49a
VLA – α 2	CD49b
VLA – α 3	CD49c
VLA – α 5	CD49e
VLA - β	CD29
β 4- Integrina	CD104
Marcadores específicos.	
Tetraspan	CD9
5' nucleotidasa	CD73
Thy – 1	CD90
Endoglina	CD105
MUC-18	CD146
BST-1	CD157
Marcadores de matriz extracelular.	
Colageno tipo I, II, IV, y V.	
Proteoglicanos.	
Laminina.	
Hialuronan.	

Cuadro 3 Listado de proteínas expresadas en las células troncales (Deans RJ, 2000)

Células troncales mesenquimales de origen dental.

Son definidas como células mesenquimales no hematopoyéticas pluripotentes que pueden proliferar y diferenciarse en distintos tipos celulares; este tipo de células se caracterizaron por vez primera en el año de 1976 por el Dr. Friedenstein estas células mostraron propiedades específicas tales como:

- Morfología fibroblastoide.
- Capacidad de adherencia a la superficie del plástico en cultivos.
- Potencial osteogénico (Friedenstein AJ, 1976).

Estas células expresan marcadores de membrana celular específicos como CD90, CD73, CD105 y CD44 siendo también negativas para marcadores hematopoyéticos como CD34, CD31 y CD45 (Dominici M, 2006).

Debido a que estas células se encuentran en los tejidos dentales, y por su relativamente fácil técnica de extracción, se estudian ampliamente en la actualidad convirtiéndose así, en una potente herramienta en la Medicina Regenerativa y en la Ingeniería de Tejidos.

Existen 5 diferentes tipos de células troncales mesenquimales derivadas de los dientes, son clasificadas de acuerdo al tipo de tejido dental de donde son extraídas (Ilustración 4):

- DPSCs Células Troncales Mesenquimales de Pulpa Dental.
- SHEDs Células Troncales Mesenquimales de Dientes Humanos Deciduos Exfoliados.
- PDLSCs Células Troncales Mesenquimales del Ligamento Periodontal.
- DFSCs Células Troncales Mesenquimales de Folículo Dental.
- SCAPs Células Troncales Mesenquimales de la Papila Dental Apical.

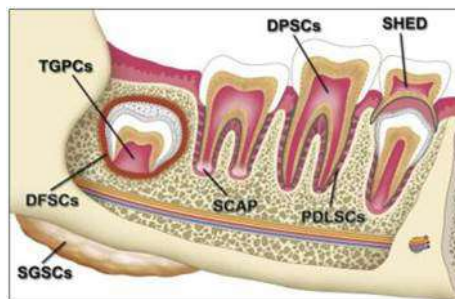


Ilustración 4 Ejemplificación de las células mesenquimales de origen dental.
(Hiroshi Egusa, 2012.)

Células Troncales Mesenquimales de Pulpa Dental (DPSCs).

Las propiedades regenerativas del complejo dentino-pulpar, dieron pie a la hipótesis de que la pulpa dental contiene células troncales responsables de la formación de dentina de reparación. En el año 2000, Gronthos informo la presencia de células mesenquimales en la pulpa dental de terceros molares de pacientes entre 19 y 29 años de edad, informo el aislamiento de **DPSCs**, las células presentaban una morfología fibroblastoide, encontró que expresaban marcadores de membrana similares a los de las **BMMSCs** y que además presentaban una mayor tasa de proliferación que estas. (Gronthos S, 2000).

El mismo grupo de investigadores demostró que las **DPSCs** pueden proliferar dando lugar a células hijas idénticas y que estas células pueden diferenciarse en diversos linajes celulares tales como adipocitos, células neurales y osteoblastos (Gronthos S B. J., 2002).

La capacidad de estas células para diferenciarse en odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, células musculares, adiposas y neurales; ha sido verificado "in vitro e in vivo", demostrando así que las DPSCs pueden ser utilizadas en la regeneración tisular o Ingeniería de Tejidos (Lymperi S, 2013).

Como en el caso de las células madre de la pulpa dental, el PDL también se trata de una fuente muy accesible para la obtención de células madre. Además, el PDL de un único diente puede dar lugar a una gran cantidad de células madre debido a su capacidad para proliferar ex vivo.

Células Troncales Mesenquimales de Dientes Humanos Deciduos Exfoliados SHEDs.

En el año 2003 Miura M., presenta la existencia de células troncales mesenquimales en la pulpa dental de los dientes deciduos aislados en pacientes entre 7 y 8 años de edad, demostrando que estas células tenían la capacidad de diferenciarse en células con características neurales, odontoblastos, osteoblastos y adipocitos (Miura M, 2003).

Basándose en estudios preclínicos realizados en ratones, se demostró que las SHEDs tienen la capacidad de producir dentina, así como la capacidad de formación de hueso en comparación con las DPSCs que no tuvieron la plasticidad para formar dentina, esto se debe a la gran diferencia en función y estructura de los tejidos, por lo tanto, las SHEDs tiene mayor proliferación y mejor respuesta al complejo dentino-pulpar (Murray PE, 2004) (Sloan AJ, 2007).

DFSCs Células Troncales Mesenquimales de Folículo Dental.

El folículo dental desempeña un papel crucial en el desarrollo del cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar; por lo que la actividad celular que presentan los folículos de terceros molares pueden ser una fuente importante para la aplicación en Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos.

Se han aislado células troncales mesenquimales de folículo dental de terceros molares en donde se reportó que las células pueden permanecer multipotentes hasta un quinceavo subcultivo (Morsezeck C, 2005.); se han diferenciado “in vitro” en osteoblastos, adipocitos y células nerviosas (Yao S, 2008).

SCAPs Células Troncales Mesenquimales de la Papila Dental Apical.

Las células troncales de papila dental son precursoras del tejido pulpar, por lo que los órganos dentales que se encuentran en apicoformación son ideales para la extracción de estas células. En estudios recientes se ha encontrado estas células poseen un potencial de diferenciación más elevado en comparación con las DPSCs(Lymperi S, 2013).

Se ha estudiado de igual manera el potencial de regeneración en combinación con las PDLSCs, utilizando como vehículo de implantación fosfato tricálcico de hidroxiapatita en estudios “in vivo”, obteniendo un resultado revolucionario en la regeneración de fibras de Sharpey y cemento radicular, sugiriendo así la combinación de estas células para regenerar el periodonto (Sonoyama W, 2006.).

El inconveniente es obtener los órganos dentales antes del cierre completo del ápice.

PDLSCs Células Troncales Mesenquimales del Ligamento Periodontal.

La presencia de múltiples tipos de células en el Ligamento Periodontal (LPD) dio lugar a la teoría de que este tejido podía contener una subpoblación de células progenitoras que tenían como función mantener la homeostasis tisular y la regeneración del tejido periodontal, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La regeneración periodontal es un mecanismo fisiológico continuo; en circunstancias normales, células y tejidos nuevos se forman de manera constante para sustituir a los que maduran y mueren, esto se denomina reparación de desgaste, se manifiesta por actividad mitótica en el epitelio de la encía y el tejido conectivo del ligamento periodontal, se caracteriza también por la formación de hueso y depósito continuo de cemento. La regeneración también sucede en el transcurso de la enfermedad periodontal destructiva; casi todos los tejidos gingivales y periodontales están en estados inflamatorios crónicos y en consecuencia, son lesiones de cicatrización. La regeneración es parte de la cicatrización. No obstante, las bacterias y el exudado inflamatorio que producen, son lesivos para las células y los tejidos en vías de regeneración y evitan que la cicatrización (Fermin A. Carranza. Michael G. Newman, 2004.).

La capacidad de las células del LPD para autorrenovarse y conseguir la regeneración periodontal implica que células progenitoras, y posiblemente células troncales, existan dentro del mismo tejido del ligamento (S. Ivanovski, 2006)

En 2004, Seo y colaboradores publicaron un trabajo para demostrar que era posible que el LPD humano contuviera una población de células madre postnatales multipotenciales, que podían ser aisladas y expandidas “in vitro”, proveyendo un reservorio único de células madre de una fuente tisular accesible. Estas células fueron descritas como unas células con capacidad clonogénica, con alto índice de proliferación y con capacidad de regenerar tejido periodontal (Seo, 2004)

Experimentos previos han demostrado que la médula ósea humana y el tejido de la pulpa dental adultos (en deciduos y permanentes) contienen células madre capaces de diferenciarse en osteoblastos/odontoblastos, adipocitos, y células similares a las neurales. Estas células fueron caracterizadas como progenitores STRO-1 y CD146 positivas, posiblemente derivadas de un nicho perivascular dentro del microambiente de la médula ósea y la pulpa dental. En el caso de las células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs: Periodontal LigamentStemCells) son similares a otras células troncales mesenquimales con respecto a la expresión de STRO-1, CD146, CD90, CD29, CD44, CD13, CD105 y CD166, por lo que las células mesenquimales del LPD pueden también derivar de una población de células perivasculares que conservan capacidad autorregenerativa y multipotencialidad (Seo, 2004) (Trubiani O, 2005.) (Nagatomo K, 2006.). Algunos estudios apuntan que la localización perivascular de las células progenitoras sugiere que la sangre o la médula ósea podría ser fuente de estas células (Gould Reginald, 1972.) (McCulloch CA, 1987.)

El experimento de Seo y col., en 2004, fue el primero en demostrar que las PDLSCs adultas son clonogénicas, células altamente proliferativas y capaces de regenerar tejido similar al cemento y ligamento periodontal, propiedades que las definen como células troncales mesenquimales.

Debido a la heterogeneidad de las células madre mesenquimales STRO- 1/CD146 positivas, es posible que en determinados experimentos se seleccione una población enriquecida de células madre que contendría células muy poco comprometidas. Sería necesario identificar marcadores específicos únicamente expresados por células troncales del LPD, con enfoques moleculares y genéticos, para poder establecer una población celular más homogénea.

Después de aislar PDLSCs y someterlas a determinadas condiciones de cultivo, demostraron ser una población interesante por su capacidad para expresar un fenotipo mesodérmico, diferenciándose en células similares a cementoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miofibroblastos y células formadoras de colágeno (Nagatomo K, 2006.) (Wanida Techawattanawisal, 2007.) (IC Gay, 2007.) (Coura GS, 2008.) (Kadar K, 2009.) La formación de nódulos calcificados

fue en menor medida que en el caso de las DPSCs, SHED y BMSSCs.. Las PDLSCs expresaron una serie de marcadores cementoblásticos/osteoblásticos, incluidos la fosfatasa alcalina, MEPE, sialoproteína ósea, osteocalcina y el receptor tipo I del TGF , aunque no formaron dentina ni hueso, ni sus componentes hematopoyéticos asociados “in vivo” (Seo, 2004)

Para evaluar la capacidad de las PDLSCs para diferenciarse en cementoblastos funcionales, los trasplantes fueron realizados en la superficie dorsal subcutánea de 12 ratones inmunodeprimidos. Una estructura similar al cemento-PDL fue regenerada. Mostraron la capacidad para formar fibras de colágeno, como las fibras de Sharpey, embebiéndose en el tejido similar al cemento, sugiriendo el potencial para regenerar el ligamento periodontal y cemento “in vivo” (Seo, 2004)

Para evaluar si las PDLSCs eran capaces de contribuir a la reparación del tejido periodontal, las trasplantaron en defectos periodontales creados quirúrgicamente en el área molar de mandíbula de ratas inmunocomprometidas (Seo y col., 2004).

El resultado fue que en 2 de las 6 muestras recogidas estaban integradas y en algunas zonas se podían encontrar conectadas las superficies del hueso alveolar y del diente, indicando que este tipo de células están implicadas en el proceso de reparación del tejido periodontal y su potencial para regenerar la fijación del LPD.

Cuando fueron trasplantadas en roedores inmunodeprimidos, mostraron la capacidad para generar una estructura similar a tejido cementoide y fibras colágenas que pueden contribuir a la regeneración del tejido periodontal (Seo, 2004). Este hecho es muy importante, con relación a la terapéutica dirigida a la regeneración del tejido destruido por la enfermedad periodontal, una de las principales causas de la pérdida de piezas dentales (Ripamonti T, 2009.)(Michael K. McGuire, 2008.)(Yang ZH, 2009.)

Seo y colaboradores (2005) analizaron el efecto de la criopreservación sobre las células progenitoras adultas del ligamento periodontal observando, a través del marcador celular STRO-1, la presencia de estas células después de 3 a 6 meses de congelamiento de las muestras del ligamento periodontal en nitrógeno líquido. Adicionalmente, evaluaron el potencial de diferenciación después del trasplante “in vivo”, pudiendo visualizar la formación de estructuras similares al cemento, a

dentina, a fibras colágenas y al ligamento periodontal. Se observó que las tasas de proliferación de colonias representaban solo el 40% de las descritas por estudios previos en poblaciones de células progenitoras del ligamento periodontal. (Seo BM, 2005.)

En estudios posteriores, se ha investigado el potencial de las PDLSCs para dar lugar a células propias del sistema nervioso.

Cuando el medio estaba libre de suero y con EGF Y FGF2, éstas se han propagado como agregados celulares que recuerdan a las neuroesferas, modo por el cual proliferan las CMN. Este hecho refuerza la importancia de las células de la cresta neural en el desarrollo y capacidad regenerativas de las piezas dentarias. Al analizarlas descubrieron que expresaban marcadores de células madre neurales como Nestina y Sox-2, además de Emx2, un marcador temprano del desarrollo del neocortex, y A2B5, un antígeno neuronal de superficie (Widera y col., 2007).

Si eran tratadas con ácido retinoico, adquirirían una morfología neuronal y llegaban a expresar marcadores neuronales como la β -III-tubulina, Neurofilamento-M, Neurofilamento-H, MAP2, GAD67, Neurofilamento-L y Sinaptofisina (Widera y col., 2007).

Cuando eran cultivadas con suero y dependiendo de otros componentes del medio, la morfología era fibroblástica, tenían una gran proliferación y podían llegar a expresar diversos marcadores neuronales (de la cresta neural, neuronales o gliales) en función del estudio (Widera y col., 2007; Coura y col., 2008; Kadar y col., 2009). Así, cuando las PDLSCs eran cultivadas con el 10% de suero bovino fetal durante 4 días, las células expresaban el marcador glial GFAP. La expresión de periferina, una proteína específica de neuronas periféricas, confirma la existencia de células de origen en la cresta neural en el ligamento periodontal humano.

También, existen evidencias preliminares que sugieren la producción de insulina por parte de las células del PDL humanas, indicativo de generación de células de linaje endodermal de tipo endocrino (Huang y col., 2009).

Osteogénesis.

Se le denomina así, a la formación del tejido óseo, el cual se produce mediante el proceso de osificación. El hueso como el cartílago, es un tipo de tejido conectivo especializado, que contiene células propias (osteocitos), incluidas en una matriz abundante y calcificada.

La osteogénesis puede ser estimulada mediante diversos factores como: el aumento de la vascularización y la tensión de oxígeno, así como estrés mecánico; el crecimiento óseo se puede afectar por factores mecánicos, hormonales y metabólicos especialmente los relacionados con la regulación del calcio.

Desde el punto de vista anatómico, y por su aspecto macroscópico se distinguen dos tipos de hueso: hueso compacto y esponjoso.

Hueso compacto (cortical): *constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como, la parte externa de los huesos del cuerpo, tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de los canales de Havers que se extienden longitudinalmente; los canales de Havers se conectan a los canales de Volkmann que perforan al periostio. Ambos canales son utilizados por vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada, se encuentran las lagunas osteocitarias donde se albergan los osteocitos, que son las células que llevan a cabo el intercambio de nutrientes con el líquido intersticial, cada laguna dispone de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones de los osteocitos conectándolos entre sí.*

Hueso esponjoso (trabecular): *está conformado por láminas intersticiales, dispuestas de forma irregular formando trabéculas, por lo que se conforma una estructura esponjosa dejando huecos que están saturados de médula ósea roja; dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas, la irrigación sanguínea se da directamente al hueso esponjoso mediante vasos sanguíneos que penetran directamente, permitiendo el intercambio de nutrientes con las células.*

Componentes estructurales.

El hueso o tejido óseo está constituido por una matriz en la que se encuentran células dispersas, está conformada por el 25% de agua, 25% de proteínas y 50% de sales minerales.

Osteoblastos: *Proviene de células mesenquimales, que son derivadas de células pluripotentes, se encuentran en las superficies de avance y crecimiento del hueso en desarrollo, son los responsables de la formación de la matriz ósea y de diversos factores de crecimiento. El hueso maduro o adulto retiene células osteogénicas potenciales en el periostio y endostio, que tienen la capacidad de diferenciarse en osteocitos durante la reorganización interna del hueso o durante la reparación de fracturas. Los osteoblastos se distribuyen en la superficie del hueso en formación o espículas óseas, donde se forma una capa celular y comienzan a generar componentes orgánicos de la matriz ósea, que consiste en fibras colágenas y sustancia amorfa. Lagunas de estas células van quedando incluidas en la matriz y se denominan osteocitos, presentan prolongaciones citoplasmáticas que se extienden hasta la superficie, rápidamente inicia la disposición de sales inorgánicas en la matriz para su mineralización, mientras otras permanecen en la superficie como osteoblastos depositando una nueva capa de matriz dando lugar a una nueva laminilla ósea.*

Osteoclastos: *son células gigantes multinucleadas, responsables de la resorción del hueso, son derivaciones de células hematopoyéticas, en concreto del linaje monocito-macrófago, por lo que se encuentran en la médula ósea y se puede estimular la diferenciación de monocitos circulantes a osteoclastos, se ha reportado la presencia de precursores osteoclasticos quiescentes próximos a las trabéculas óseas. Estas células, son un reservorio de precursores listos para iniciar un nuevo ciclo de remodelado, en caso de que sea requerido. (Mizoguchi T M. A., 2009,).*

Matriz ósea orgánica.

La matriz orgánica u osteoide corresponde al 50% del peso seco de hueso, más del 90 % de ella corresponde a fibras de colágeno tipo I, que se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que se requieren otras proteínas para el depósito mineral, organizadas en laminillas de 5 μm de grosor. El resto de los componentes orgánicos son principalmente glicoproteínas ricas en ácido γ -carboxiglutámico como la Osteocalcina y proteoglicanos de condroitín y queratán-sulfato. Son moléculas ricas en grupos ácidos, con gran tendencia a asociarse entre sí, capaces de unirse al calcio y que juegan un rol importante en el proceso de mineralización de la matriz ósea.

<i>Proteínas de matriz osteoide.</i>	
Colágeno.	<i>Tipo I, III, V, XII.</i>
Proteoglicanos.	<i>Condroitín sulfato. Decorina. Biglicano. Hialuronano.</i>
Proteínas con ácido γ-carboxiglutámico.	<i>Osteoclacina.</i>
Glicoproteínas.	<i>Osteonectina. Fosfatasa alcalina. Proteínas con RGD_ -fibronectina. -trombospondina. -osteopontina. -vitronectina. -sialoproteínas óseas.</i>
Proteínas del plasma.	<i>Albumina. α2-SH- glicoproteína</i>
Factores de crecimiento.	<i>IGF-I y II (Insulin growth factor) TGF-β (Transforming growth factor) PDGF (Platelet derived growth factor)</i>

Cuadro 4 proteínas de la matriz ósea orgánica.

Composición inorgánica.

Las sales minerales inorgánicas depositadas en la masa osteoide, que confieren al tejido su rigidez y dureza, actúan como reserva de sales minerales sensibles a estímulos endocrinos.

Las sales más abundantes son fosfato de calcio amorfo, cristales de hidróxido de calcio y de fosfato llamados hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Los cristales de hidroxiapatita son aplanados y se adosan a lo largo de las fibrillas colágenas.

Osificación intramembranosa o directamente mesénquima.

La osificación intramembranosa o desmoide, característica de la bóveda del cráneo y del macizo facial (hueso palatino, maxilar) y mandíbula; el mesénquima vascular condensado forma una membrana donde se depositan bandas de matriz orgánica (tejido osteoide); las cuales se unen para formar trabéculas.

Las células mesenquimatosas se acumulan en la superficie de las espículas y trabéculas; y se diferencian en osteoblastos; grupos de osteoblastos forman los centros de osificación y la matriz producida de estos, se calcifica con rapidez, las espículas crecen en todas direcciones a medida que las trabéculas óseas se van engrosando, los osteoblastos quedan incluidos como osteocitos. El primer hueso formado es trabeculado y sus espacios se rellenan con mesénquima y vasos sanguíneos, que más tarde se modifican para formar médula ósea.

El depósito continuo de hueso dentro de los espacios produce un hueso denso, que da lugar a las láminas de hueso compacto de las tablas, externa e interna; el hueso interpuesto entre las tablas externa e interna forma el diploe.

Remodelado óseo.

El remodelado óseo es el resultado de dos actividades: I) la producción de nuevo hueso, que es mediado por los osteoblastos y II) la resorción del mismo que es realizada por los osteoclastos, la cantidad de masa ósea depende del ritmo de recambio óseo, correlacionado con la presencia de ciertos marcadores bioquímicos en el suero y en la orina que resulta de la actividad en el hueso en todo el esqueleto.

Regulación de la resorción ósea.

Estos procesos están controlados por una compleja interacción entre las células osteoblásticas y osteoclasticas; las células encargadas de este proceso son los osteoclastos activados por las células del estroma, de la línea osteoblástica, que expresan el ligando del activador del receptor de NF κ B (Factor Nuclear de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células B) RANKL (Ligando del Receptor Nuclear K B), el efector parácrino para la activación durante largo tiempo de los osteoclastos. RANKL estimula de forma potente la activación osteoclastica: aumenta la diferenciación e incrementa la actividad y disminuye la apoptosis de los osteoclastos.

El papel de las citocinas sigue siendo controvertido, explicando la interacción de las células de la medula ósea con las células de la línea osteoblástica; así la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) y prostaglandina E2, parecen aumentar la activación osteoclastica; sin embargo, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) reduciría la pérdida ósea, aumentando la apoptosis de los osteoclastos.

Las hormonas que estimulan la resorción ósea, generalmente no actúan directamente sobre los precursores de las células osteoclasticas, sino sobre las células del estroma-osteoblásticas.

Tanto la ParahormonaPFH 1,25 dihidroxi-vitamina D y las hormonas tiroideas, incrementan la expresión de RANKL y en algunos casos, inhiben la síntesis de Osteoprotegerina (OPG) dando como resultado incremento de la resorción ósea.

El efecto de los estrógenos parece ser indirecto, a través de la regulación de diversos mediadores, ya que su papel de control en el sistema RANKL-RANK se lleva a cabo, exclusivamente incrementando los valores de OPG, efecto supresor sobre la síntesis de IL-1, IL-6, PGE2, GM-CSF y TNF- α , frenando la diferenciación y activación de los preosteoclastos. Los estrógenos también actúan sobre los osteoclastos ya activados, incrementando su apoptosis, tanto directamente como potenciando la síntesis TGF- β . La calcitonina inhibe directamente la actividad osteoclastica, de forma transitoria, por un fenómeno rápido de regulación de sus receptores expresados sobre los osteoclastos.

Osteocalcina.

La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante secretada en la etapa tardía de la diferenciación osteoblástica, puede ser sintetizada por los propios osteoblastos, odontoblastos y condrocitos hipertróficos y es expresada en matriz solo en la fase de la mineralización

La osteocalcina está codificada por el gen óseo cuya codificación está regulada principalmente por el factor de transcripción Runx2/Cbfa 1; Runx2 es el regulador esencial de la transcripción específica del hueso basal, la vitamina D3 es el principal potenciador de la expresión de la osteocalcina, después de que se inicia la transcripción basal.

La proteína en su forma activa puede unirse a los iones de calcio para la estabilización de la molécula, por consiguiente a la hidroxiapatita mediando así la unión al contenido mineral del hueso; la fracción no unida es liberada al torrente sanguíneo, por lo que la concentración plasmática refleja de alguna manera el metabolismo de las células óseas.

Esta proteína cumple con dos funciones en el hueso; en primer lugar la actúa como un regulador de la mineralización ósea, en segundo lugar regula la actividad osteoblasto/osteoclasto.

La osteocalcina depende de la vitamina K para su γ -carboxilación, esta peculiaridad la comparte con 17 proteínas, 7 de ellas implicadas en la cascada de la coagulación, todas involucradas en el metabolismo del calcio.

El aumento en la expresión de osteocalcina no afecta el grado de mineralización del hueso pero promueve el reclutamiento y maduración de los monocitos circundantes y se sugiere que interviene en la interacción monocito-macrófago

Runx2.

Runx2 es un factor de transcripción para la diferenciación de los osteoblastos, ameloblastos producción de matriz extracelular y su mineralización, es necesario para la maduración osteoblástica y condrocítica por lo que es expresado por células que se encuentran en una etapa con la capacidad de diferenciarse en tejido óseo o condroide.

Controla la expresión de los principales genes de las proteínas de la matriz ósea, a través de un sitio de unión específico llamado OSE2 que está presente en los genes osteoblasto específico tales como osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea y colágeno tipo 1.

En el estado inmaduro del hueso Rux2 mejora la ontogénesis sin embargo, no es esencial para mantener la expresión de las proteínas de la matriz en los osteoblastos maduros y es necesario ser suprimida para la formación de hueso maduro.

La expresión normal de Runx2 es importante durante la formación ósea debido a que en estudios “in vivo” demuestra que la disminución de Runx2, durante su estadio embrionario; tuvo como resultado la muerte después del nacimiento por la falta de osificación del esqueleto; debido a la detención de la maduración de los osteoblastos por la falta de la expresión de osteocalcina; proteína esencial en la calcificación ósea, como se mencionó anteriormente Runx2 es un factor de transcripción esencial para la calcificación del esqueleto (Takeda, 2011.) (Otto, 1997.) .

En humanos las mutaciones de Runx2 son asociadas a displasias cleidocraneal exhibiendo la formación defectuosa de hueso endocondral e intramembranoso, esto es caracterizado por hipoplasia y/o aplasia de clavículas, presencia de dientes supernumerarios, baja estatura, y otros cambios en el patrón del esqueleto y del crecimiento.

Justificación.

El conocimiento de la diversidad celular contenida en el ligamento periodontal, ha llevado a muchos investigadores a estudiar la presencia de células troncales mesenquimales en este tejido; los cuales han publicado diversos protocolos para la extracción de las células; demostrando la presencia de poblaciones celulares, adherentes al plato de cultivo con morfología fibroblastoide; con capacidad proliferativa, multipotente y de diferenciación. Una gran variedad de investigadores a nivel Mundial están dedicando sus esfuerzos al avance en los conocimientos y las posibles alternativas terapéuticas que pueden ofrecer la Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos; es por ello, que debemos cuestionar la presencia y la capacidad de estas células. Edienten nuestro país hay poca investigación al respecto, y la poca que hay son grandes grupos que han encaminado sus esfuerzos a la diferenciación neurogénica por ello, nosotros con esta tesis nos adentramos en un tema relativamente nuevo, al menos en nuestro país y creemos que podemos aportar novedades en el campo de conocimientos de la Odontología y en la misma Medicina.

Los premolares sanos extraídos por motivos ortodónticos son órganos que comúnmente son desechados. Nosotros en la elaboración de esta tesis los usamos para lograr la obtención de una población celular como se ha descrito en artículos publicados anteriormente.

La importancia de realizar esta investigación tiene su fundamento principal en evaluar la presencia de células con caracteres mesenquimales en el ligamento periodontal.

Como han demostrado ya algunos investigadores, las poblaciones obtenidas del Ligamento Periodontal tienen la capacidad de regenerar diversos tejidos entre los cuales se encuentran principalmente los tejidos periodontales; como Cirujano Dentista es necesario encontrar nuevas alternativas de tratamiento para la rehabilitación de las patologías orales entre las que destacan la enfermedad periodontal, patología multifactorial causante de la pérdida de los tejidos de sostén del diente; cuyos tratamientos se limitan a la detención de la progresión de la enfermedad y los tratamientos enfocados a la reparación tienen grandes

limitantes, ya que no cumplen con la estimulación de proliferación y diferenciación de las células encargadas de reparar tanto el hueso, ligamento periodontal y el cemento radicular, por lo que es difícil recuperar la funcionalidad de los tejidos.

Como alternativa se sugiere conocer mediante este tipo de estudios el funcionamiento y características de las células que componen estos tejidos tan difíciles de regenerar y al mismo tiempo, pensar en esta estirpe celular como una nueva terapéutica a usar en beneficio de la gran cantidad de pacientes que sufren de enfermedad periodontal y que tarde o temprano los llevara a la pérdida dental, tal vez si pudiéramos implementar una nueva terapia, evitaríamos más pacientes edéntulos por enfermedad periodontal.

En la actualidad, la investigación Biomédica ha encaminado muchos de sus esfuerzos hacia la Medicina Regenerativa, a su vez, está ha encontrado diversas estrategias terapéuticas como lo es la aplicación de terapia celular y en especial, en la Ingeniería de Tejidos, ya que esta nos permite la neo-formación tisular, regeneración de los tejidos dañados, todo esto a partir de un injerto autólogo de PDLSCs.

Las PDLSCs son células que tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos mesenquimales y se ha evaluado la capacidad también su capacidad de transdiferenciación; han demostrado tanto en estudios "in vivo" como "in vitro" que poseen alta capacidad de regeneración periodontal y de diversos tejidos, por lo que es de suma importancia realizar investigaciones para conocer la capacidad y potencial de regeneración que tienen y poder emplearlas en los pacientes en un futuro pero con toda la seguridad.

El ligamento periodontal, se considera que es una fuente accesible, ya que los órganos dentales son considerados tejidos de desechos una vez extraídos y su obtención es en teoría, no traumática en comparación con las células derivadas de la médula ósea, debido a que no se requiere un tratamiento altamente invasivo para la obtención de tejido para aislar las células mesenquimales, ya que en el

caso de los pacientes que están bajo tratamiento de ortodoncia, muchas de las ocasiones la extracción es la mejor alternativa de tratamiento.

Personalmente, la investigación y la exploración de un campo poco conocido como es la Biología Celular; es un gran reto, debido a que durante nuestra formación académica como Cirujano Dentista, no obtenemos los conocimientos mínimos para iniciar una investigación de este tipo; tener la oportunidad de realizar esta investigación traerá una gran satisfacción; teniendo en mente los grandes avances científicos que se han logrado con la aplicación de la Medicina Regenerativa en distintos campos Biomédicos, y llevar esto a la población odontológica daría lugar a mejores pronósticos para pacientes comprometidos estomatológicamente.

Objetivos.

Objetivo General:

Obtención de una población de células mesenquimales, pluripotenciales o troncales derivada del ligamento periodontal.

Objetivos específicos:

- 1. Obtención del cultivo celular de células mesenquimales, pluripotenciales o troncales derivada del ligamento periodontal.***

- 2. Evaluación si la población celular obtenida presenta características mesenquimales o troncales .***
 - i. Evaluación de la población celular con respecto a los estándares de la ISCT*

- 3. Evaluación del potencial de diferenciación osteogénica de la población celular mesenquimal obtenida.***
 - i. En la matriz extracelular Evaluación de depósitos de calcio.*
 - ii. Etapa temprana de la diferenciación ósea.*
 - iii. Etapa final de diferenciación.*

Material y métodos.

Instrumental**Instrumental para extracción celular.**

Tubos tipo Falcon de 15 y 50 ml.

Cajas petri de 60x15 mm.

Mango para bisturí N° 3.

Hoja de bisturí N° 11.

Pipetas Pasteur.

Pipetas de 5 y 10 ml.

Micropipetas.

Puntas para micropipeta.

Cajas de 6, 24, 96 multipocillos.

Frascos de cultivo de 25 y 75 cm².

Parafilm.

Tubos para criopreservación.

Cámara de Neubauer,

Material para cultivo.	Número de lote:	Marca.
Medio esencial mínimo modificación de Dulbecco	L0103-580	BioWest.
Medio de diferenciación ósea.	A10072-01	Sigma Aldrich.
(FBS) Suero Fetal Bovino.	S1650-500	Sigma Aldrich.
Antibiótico/Antimicótico	15240-062	Gibco
(PBS) Buffer fosfato salino.	D1408	Sigma Aldrich.
Solución de Hanks.		
Tripsina /EDTA.	L0931-500	BioWest
Colagenasa tipo 1	7100-017	Gibco
Fluoroshield con DAPI	F6057	Sigma Aldrich.
Azul tripan.		Sigma Aldrich
Rojo de alizarina.	cat. 922	HYCEL
MTT/DMCO	M2003	Sigma Aldrich

Metodología.

Obtención y transporte de la muestra.

Los órganos dentales se obtuvieron de la clínica de especialidades Ortodónticas Naucalpan que pertenece a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México; en donde se llevan a cabo tratamientos integrales de Ortodoncia; donde cotidianamente se realizan múltiples extracciones de premolares. La que nos permitió recolectar los premolares necesarios para realizar este estudio; una vez que explicamos con una presentación oral la finalidad de la investigación a los académicos y estudiantes.

Antes de disponer de los órganos dentales se le informo al paciente y/o tutor del paciente de manera verbal y por escrito los fines de este proyecto; firmaron el consentimiento informado (anexo 1) previamente avalado por el comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, el cual nos permitían el uso de sus órganos dentales extraídos para los fines descritos.

La cantidad de muestras obtenidas en un promedio de tiempo de 8 meses fue de 36 premolares sanos, y se selecciono con los criterios que a continuación:

Criterios de inclusión de las muestras obtenidas para el estudio:

- Se incluyeron solo pacientes sin alteraciones sistémicas.
- Los pacientes incluidos debían tenían buena salud periodontal.
- Solo incluimos primeros y segundos premolares, tanto maxilares como mandibulares, izquierdos y derechos.

Los criterios de exclusión fueron:

- Paciente con enfermedades sistémicas.
- Pacientes con gingivitis.
- Los premolares con presencia de cálculo dental y/opresencia de caries invasivas y/o con reacción periapical.

Técnica de extracción.

Los pacientes que eran candidatos a extracciones eran remitidos con los alumnos de servicio social; quienes se encargaban de realizar las extracciones correspondientes, antes de realizar la extracción se le indicaba al paciente que realizara un colutorio utilizando 3ml. de gluconato de clorhexidina al 0.12% durante cinco minutos; consecutivamente se realizaba la debridación de la encía y se procedía a realizar la luxación del diente empleando un elevador recto; una vez luxado el diente la extracción se culminaba con fórceps; con el cual se depositaba inmediatamente el diente, en un tubo tipo Falcon de 15 ml con 3 mililitros de medio D-MEM suplementado con 1% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin Gibco® N° Cl. 15140-122), las muestras eran transportadas a una temperatura de 4°C, a la Unidad de Bimedicina ubicada en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala; una vez en el laboratorio la muestra se conservó siempre en refrigeración hasta que fueron procesadas en una campana de flujo laminar, de seguridad biológica tipo B2; la viabilidad de la muestra a una temperatura de 4°C es de 48 horas máximo.

Técnicas empleadas para el aislamiento celular.

Digestión enzimática con Colagenasa tipo I. Técnica de. (Anoop Babu V, 2013.)

1. El diente se manipuló sobre cajas Petri estériles, en las que se le realizaron 4 lavados, utilizando PBS al 1X (PhosphateBufferedSaline) adicionado con 1% de antibiotico/antimicótico, para eliminar el exceso de sangre y cualquier agente contaminante
2. La disección del ligamento periodontal se realizó del tercio medio y apical, con escalpelo (Hoja N°11), el tejido se cortó lo más fino posible.
3. El tejido se digirió con 500 µl de colagenasa tipo I, a una concentración de 0.5 mg/ml durante 12 horas a una temperatura de 37°C.
4. Se inactivó la reacción adicionando 1 mililitro de D-MEM completo (Adicionado con 10% de FBS y 1% de antibiótico).

5. Para eliminar el sobrenadante, el tejido se centrifugo a 1200 RPM durante 10 minutos.
6. Se decantó el sobrenadante, el tejido sedimentado se resuspendió con 2 mililitros de D-MEM.
7. Utilizando placas de 6 multipocillos se sembraron 300 μ l de la suspensión en cada pozo; se incubó en condiciones estándares (37°C con presencia del 5% de CO₂).
8. A las 24 horas de incubación del cultivo se realizó cambio del medio para eliminar el tejido sobrenadante.
9. El medio de cultivo se cambió cada 72 horas hasta observar desarrollo celular.

Digestión enzimática con Colagenasa tipo I. Técnica modificada de (Seo, 2004).

1. Los premolares se lavaron durante 5 minutos con D-MEM completo para la eliminación de sangre y elementos contaminantes.
2. La disección del ligamento periodontal se realizó del tercio medio y apical, con escalpelo (Hoja N°11), el tejido se cortó lo más fino posible.
3. La digestión enzimática del tejido se llevó a cabo con 500 μ l de colagenasa tipo I en una concentración de .5 mg/ml durante 1 hora a una temperatura de 37 °C.
4. Se inactivo la reacción adicionando 1 mililitro de D-MEM completo.
5. La suspensión se filtró con una maya de 70 μ m de diámetro dentro de un tubo tipo Falcón.
6. Para eliminar el sobrenadante, el tejido se centrifugó a 1800 RPM durante 15 minutos.
7. Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 2 mililitros de D-MEM.
8. Se sembraron 500 μ l de la suspensión en placas de 6 multipocillos, en condiciones estándares,

9. Se dejó en crecimiento durante 7 días para cambiar el medio de cultivo esperando el desarrollo celular.

Disgregación mecánica, cultivo de explantos técnica de (Keiko Tanaka, 2011.)

1. Los premolares fueron lavados 5 veces, con duración de 30 segundos por lavado, utilizando D-MEM completo.
2. La disección del ligamento periodontal se realizó del tercio medio y apical, con escalpelo (Hoja N°11), el tejido se cortaba lo más fino posible.
3. Los fragmentos de tejidos fueron colocados estratégicamente en cajas de 6 multipocillos con una cantidad mínima de D-MEM.
4. Se incubaron en condiciones estándares durante un periodo de 6-8 horas, esperando la adhesión de los explantos al plato de cultivo.
5. Una vez concluido el intervalo de tiempo se adicionaron 500 µl de D-MEM completo.
6. El medio se cambió a las 24 horas para eliminar el tejido flotante, y en intervalos de 72 horas hasta observar el desarrollo celular.

Digestión enzimática con tripsina/EDTA 0.25%/0.1%. (Keiko Tanaka, 2011.)

1. Los premolares fueron lavados durante 2 minutos en D-MEM completo para eliminar sangre y elementos contaminantes.
2. La disección del ligamento periodontal se realizó del tercio medio y apical, con escalpelo (Hoja N°11), el tejido se cortó lo más fino posible.
3. La digestión enzimática del tejido se llevó a cabo en 500 µl de Tripsina al 0.25% con EDTA al 0.1%, durante 60 min a una temperatura de 37°C.
4. En intervalos de 10 minutos la muestra era agitada a 800 RPM durante 30 segundos usando un Vortex para favorecer la digestión del tejido, se volvía a incubar la suspensión.
5. Para detener la reacción enzimática se adicionaron 500 µl de D-MEM completo.

6. La suspensión se filtró con una maya de 70 μm de diámetro dentro de un tubo tipo Falcón, para eliminar los fragmentos de tejidos.
7. Se centrifugo la suspensión a 1800 RPM durante 15 minutos.
8. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 2 mililitros de D-MEM completo.
9. En placas de 6 multipocillos se colocaron 500 μl de la suspensión en cada pozo.
10. El cambio de medio se llevó a cabo cada 72 horas hasta observar el desarrollo celular.

Digestión enzimática con colagenasa tipo I transporte de la muestra en solución de Hanks. Técnica modificada de (Gholamrezanezhad, 2011.).

1. La muestra fue transportada en solución salina de Hanck, a una temperatura de 4°C.
2. La muestra se lavó con solución de Hanck hasta eliminar la sangre de la superficie radicular del órgano dental.
3. La disección del ligamento periodontal se realizó del tercio medio y apical, con escalpelo (Hoja N°11), el tejido se cortaba lo más fino posible.
4. El tejido se centrifugó con solución de Hank a 1500 RPM durante 10 minutos.
5. Se eliminó el sobrenadante y el tejido se resuspendió con 500 μl de colagenasa tipo I, la digestión enzimática se realizó durante una hora a una temperatura de 37°C.
6. La inactivación de la reacción se llevó un mililitro de D-MEM completo.
7. La suspensión fue centrifugada a 1500 RPM durante 10 minutos.
8. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 2 mililitros de D-MEM completo, se cultivaron 200 μl de la suspensión en placas de 6 multipocillos durante 4 horas a 37°C.

9. *Pasado este lapso se agregaron 500 µl de medio completo para mantener el cultivo hidratado el medio fue sustituido por primera vez a los 5 días, y el cambio de medio se realizó posteriormente las 72 horas esperando desarrollo celular.*
- 10.

Técnica estandarizada, digestión enzimática y cultivo de explantos.

1. *La muestra se transportó en D-MEM completo a una temperatura de 4°C.*
2. *Una vez en el laboratorio se realizaron 3 lavados de 5 minutos, con 3 ml de D-MEM suplementado con 5% de antibiótico.*
3. *La disección del ligamento periodontal se realizó del tercio medio y apical, con escalpelo (Hoja N°11), el tejido se cortó lo más fino posible.*
4. *Se realizó la digestión enzimática del tejido obtenido con 500 µl de tripsina/EDTA 0.25%/0.1%, durante 20 minutos, a una temperatura de 37°C.*
5. *En intervalos de 5 minutos el tejido se agitó con un Vortex a 1000 RPM durante 30 segundos, para favorecer la tripsinización del tejido.*
6. *La inactivación de la reacción se realizó con 500 µl de D-MEM completo.*
7. *Para obtener el tejido se centrifugo a 1800 RPM durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el tejido con 1 mililitro de D-MEM completo.*
8. *La suspensión con el tejido fue cultivada directamente en placas de 6 multipocillos con una cantidad mínima de medio completo (aproximadamente 150-200 µl), se dejó en incubación durante 24 horas esperando la adhesión del tejido al plato de cultivo.*
9. *Pasando las 24 horas se adiciono medio completo para mantener el cultivo hidratado, se incubó en condiciones estándares y se cambió el medio a los 4 días posteriores al sembrado.*
10. *El medio se cambió cada 72 horas para mantener el cultivo hasta que se observó crecimiento celular.*

Una vez que los pocillos se encontraban en confluencia se realizaba la expansión del cultivo.

1. *Tripsinización.*

- a) Al cultivo celular en confluencia se le realizó 1 lavado con solución de Hank durante 30 segundos.
- b) Se agregaron 500 μ l de tripsina/EDTA al 0.25%/0.1%, durante 1-3 minutos, a una temperatura de 37°C.
- c) Se verificó al microscopio que las células se encontraran completamente en suspensión para poder inactivar la reacción enzimática con 500 μ l de medio completo.
- d) La suspensión se centrifugo a 1800 RPM durante 7 minutos.
- e) Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron con 1 mililitro de D-MEM para su cuantificación.

2. *Cuantificación con cámara de Neubauer.*

- 1) Se tomaron 10 μ l de la suspensión celular homogeneizada, se colocó en un tubo Eppendof, se adicionó la misma cantidad de azul tripano para contrastar las células viables.
- 2) Se homogenizó en un Vortex a 500 RPM durante 30 segundos.
- 3) Se tomaron 10 μ l de la suspensión y se montó en cámara de Neubauer por capilaridad para que el líquido se dispensara de forma uniforme.
 - a) Se contaron los cuatro cuadros externos destinados para la cuantificación de leucocitos.
 - b) *Calculo:* N° de células en 1ml = $\frac{N^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10000.}{N^{\circ} \text{ de cuadros contados} \times \text{factor de dilución.}}$

4) *Sembrado celular.*

- a) Se homogenizó la suspensión y se cultivaron 250 μ l de la suspensión en cajas de 75 cm², se adicionaron 6 mililitros de D-MEM completo y se incubó en condiciones estándares.

- b) A las 24 horas se cambió el medio de cultivo para eliminar las células flotantes, posterior a esto se realizó cambio de medio cada 72 horas para mantener la viabilidad de las células.

3. *Tripsinización.*

- a) Una vez que las células llegaron a confluencia se le realizó un lavado con solución de Hank durante 20 segundos.
- b) Se decantó la solución de Hank y se reemplazó con 1.5 mililitros de tripsina/EDTA y se incubó a 37°C durante 2-3 minutos.
- c) Se revisó al microscopio que las células se encontraran en flotación, para inactivar la reacción enzimática adicionando la cantidad proporcional de D-MEM completo.
- d) La suspensión se homogenizó y se transportó a un tubo tipo Falcon para ser centrifugado a 1800 RPM durante siete minutos.
- e) Se resuspendió el sedimento con un mililitro de D-MEM y se realizó la cuantificación de células en cámara de Neubauer (antes descrita).
- f) Se utilizó la cantidad de células necesarias para los ensayos, se realiza un subcultivo de las células para mantener reservas celulares viables en caso de repetir algún ensayo, las células sobrantes se congelaron.

4. *Congelación celular.*

- a) Las células que se destinaron para criopreservación se centrifugaron nuevamente a 1800 RPM durante 7 minutos para eliminar el exceso de D-MEM.
- b) Las células se resuspendieron con un mililitro de CEL-freez.
- c) Se mantuvieron durante una hora a 4°C.
- d) Posterior a esto se pasaron a -20°C durante 30 minutos.
- e) Las células se mantienen de manera temporal en un revco a menos 86°C.
- f) El protocolo para descongelación se realiza de manera inversa subiendo la temperatura de manera gradual para evitar la lisis celular.

5. *Técnica de sembrado.*

- a) Una vez determinado el número de células suspendidas en un mililitro de medio se realizó el cálculo siguiente para poder sembrar aproximadamente 500 células para cada ensayo.
- $N^{\circ} \text{ de células a sembrar} = \frac{500 \text{ cel} \times 1000 \mu\text{l}}{\text{total de células}}$ dando como resultado la cantidad de microlitros que contienen el valor celular estimada.
- b) El sembrado se realizó en cajas de 6, 24 multipocillos, y en frascos de 15, 45 cm².
- c) Pasadas 24 horas se le realizó cambio de medio a los cultivos para eliminar las células flotantes, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS al 1X y cambio de medio cada 72 horas para mantener la vitalidad celular.

Ensayo para proliferación celular.

1. Ensayo de MetilTiazolTetrazolio (MTT).

- a) Para realizar esta técnica realizaron sembrados celulares en cajas de 24 multipozos en la cual se sembraron 500 células por pocillo.
- b) La evaluación de la proliferación celular se realizó a 1, 3, 5, 7 y 14 días después del sembrado.
- c) Se realizó un lavado de los pocillos a medir con PBS 1X, para eliminar los residuos de medio de cultivo.
- d) Se adicionaron 50µl de MTT y se incubo durante un periodo de 4 horas a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂.
- e) Pasado este lapso de tiempo se elimina el sobrenadante de MTT y se colocan 100µl de DimetilSulfóxico (DMSO).
- f) Se pipetea vigorosamente para liberar el los cristales de formazan compuesto de color azul-morado.
- g) Se realizó la lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro a una de longitud de onda de 540 nm.
- h) Los resultados fueron graficados.

2. Evaluación de migración celular.

- a) *Se realizó el sembrado celular en cajas de 6 multipozos, 500 células por cada pozo.*
- b) *Se mantuvo el cultivo en condiciones estándares, hasta llegar a confluencia, con cambio de medio cada 72 horas.*
- c) *Una vez que las células estaban en confluencia se realizó una lesión a lo largo del cultivo, causando la pérdida de continuidad.*
- d) *Se monitoreo el cultivo mediante fotografías a las 24, 48 y 72 horas.*

Anticuerpos mesenquimales.**1. Inmunocitofluorescencia.**

Los anticuerpos utilizados para la tinción inmunofluorescente de las células fueron:

Anti-CD90 Abcam.	Anti-CD73 Abcam.	Anti-CD105 Abcam.	Anti-Vimentina Santa cruz.
Mouse monoclonal (50µg)	Rabbit monoclonal (50µl)	Mouse monoclonal (50µl)	Rabbit monoclonal 50µl)
Anticuerpos secundarios.			
Goat anti-mouse IgG- FITC	Goat anti-rabbit IgG- PE TRITC	Goat anti-mouse Alexa Fluor® 647 TRITC	Goat anti-rabbit IgG- FITC
VERDE	ROJO	ROJO	VERDE

Tabla con los anticuerpos utilizados.

Para poder realizar esta técnica fue necesario cultivar células en cajas de 24 pozos, en las cuales se montaron cubreobjetos circulares de vidrio, con la finalidad de poder montar las células y observarlas en el microscopio de fluorescencia invertido.

- a) El primer paso a obtener los cultivos en semi-confluencia, fue fijar las células con paraformaldehído al 3% durante 10 minutos.
- b) Se realizaron 3 lavados con PBS 1X con una duración de 5 minutos por lavado.
- c) Se adiciono un tampón de bloqueo y permeabilización; para descartar zonas de unión inespecíficas se uso PBS complementado con 1% de FBS, 3% BSA y 0.1% de Triton, durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- d) Se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos por lavado.
- e) Los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución 1:250 (previa titulación) ,y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.
- f) Posterior a la incubación, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS 1X.
- g) Los anticuerpos secundarios unidos a una molécula fluorescente se utilizaron a una dilución de 1:200 (instrucción del fabricante), se incubaron durante 30 minutos a 37°C, a partir de este momento las muestras se protegieron de la luz

- h) Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS 1X.*
- i) En caso de la tinción inmunológica doble se repitieron los pasos del b al h.*
- j) Una vez concluido el procedimiento, los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente de los pozos y se montaron con Fluroshield® en portaobjetos.*
- k) Se mantuvieron a 4°C durante por lo 24 horas en oscuridad.*
- l) Las muestras fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Zeiss ().*

Diferenciación osteogénica.

Se utilizaron células del pasaje número 3 para realizar la evaluación de diferenciación osteogénica.

1. Sembrado e inducción osteogénica.

- a) Se cuantificaron 500 células para cultivar sobre cubreobjetos redondos en cajas de 6 y 24 multipocillos en condiciones estándares.
- b) A las 24 horas posteriores del sembrado, se realizó cambio de medio para eliminar las células en suspensión.
- c) Se realizó cambio de medio cada 72 horas para mantener la viabilidad del cultivo.
- d) Una vez en estado de confluencia, a las células se les adicionó Medio "STEM PRO Osteogenesis Differentiation Kit" de la marca Gibco. Adicionado con 100 nM de dexametasona, 50 µg de ácido ascórbico y 5 nM de β-glicerol Fosfato. (150 µl para los cultivos en cajas de 24 pozos y 500 µl para las cajas de 6 pocillos)
- e) El medio osteogénico fue sustituido cada 72 horas; se mantuvieron las células en diferenciación durante 14 días.
- f) Pasado el lapso de diferenciación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos.

2. Tinción con rojo de alizarina.

- a) Se les realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X a las células diferenciadas y fijadas a los 7 y 14 días en las cajas de 6 multipocillos
- b) Se agregó directamente al cultivo, ya fijado, 500 µl de rojo de alizarina a una concentración de 0.1% con agua destilada y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- c) Se eliminó el colorante y se le realizaron los lavados necesarios para eliminar el exceso del mismo.
- d) Se dejaron hidratadas las muestras a 4°C con 2 mililitros de PBS 1X.
- e) Se realizaron fotografías tanto macroscópicas como microscópicas.

3. Técnica de inmunocitofluorescenciapara verificar la expresión de marcador temprano de diferenciación.

- a) Los cultivos diferenciados y fijados en cajas de 24 multipocillos se utilizaron para realizar la tinción inmuno-fluorescente.
- b) Se realizó el mismo procedimiento antes descrito, utilizando como marcador temprano de diferenciación RUNX2 (Santa Cruz Rabbit monoclonal) a una concentración de 1:250; y el anticuerpo secundario (anti-RabbitIgGFITC) a una concentración de 1:200.
- c) Las muestras fueron montadas en portaobjetos utilizando Fluroshield®, las muestras se mantuvieron a 4°C durante 24 horas para posteriormente observar al microscopio.

4. Tinción inmuno-fluorescente para identificar la expresión de Osteocalcina.

- a) Se utilizaron los cultivos realizados en cajas de 24 multipocillos diferenciados a 14 días y fijados inmediatamente.
- b) Se realizó el mismo procedimiento de inmunofluorescencia antes descrito, se utilizó como anticuerpo primario OsteocalcinRabbitpoliclonal santa cruz a una concentración de 1:250; y como anticuerpo secundario anti-rabbitIgGFITC a una concentración de 1:200.
- c) Las muestras fueron montadas en portaobjetos utilizando Fluroshield®, con DAPI.
- d) las muestras se mantuvieron a 4°C durante 24 horas para posteriormente observar al microscopio.

Resultados.

Obtención de la población celular.

La población se logró obtener empleando la metodología estandarizada después de al menos 10 ensayos de prueba y error; ya que con las metodologías publicadas previamente no obtuvimos los resultados esperados.

La poca especificidad técnica de los artículos encontrados, pensamos que influyo para lograr la obtención de la población celular; los cultivos eran muy susceptibles a contaminarse por tratarse de órgano dentales, que como sabemos se encuentran en la cavidad bucal, la cuál esta llena de microorganismos. Durante la disección del tejido; después de repetir por lo menos 10 veces las técnicas antes publicadas y no obtener resultados decidimos experimentar una nueva técnica, que fue implementada de acuerdo a la mejora de las técnicas ya descritas.

Después de la extracción de los órganos dentales se transportaban inmediatamente a la Unidad de Biomedicina para ser procesados lo mas pronto posible.

El diente se manipulaba dentro de la cabina de flujo laminar; inicialmente se realizaban tres lavados durante cinco minutos por lavado utilizando D-MEM suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico; ya que el diente estaba libre de sangre y otros tejidos, procedía a realizar la disección del ligamento periodontal utilizando un escalpelo, únicamente se obtenía el tejido del tercio medio y apical del órgano dental. El tejido era tripsinizado con tripsina/EDTA durante 20 minutos; realizando una agitación de 30 segundos cada cinco minutos a 1000 rpm, se inactiva la reacción con D-MEM completo y se centrifugaba a 1800 rpm para obtener el tejido digerido y sembrarlo en placas de seis multipocillos en condiciones estándares.

Se han realizado por lo menos en más de 10 repeticiones esta técnica y siempre se ha logrado obtener el crecimiento de las células; por lo que podemos decir que nuestra técnica es reproducible y repetible

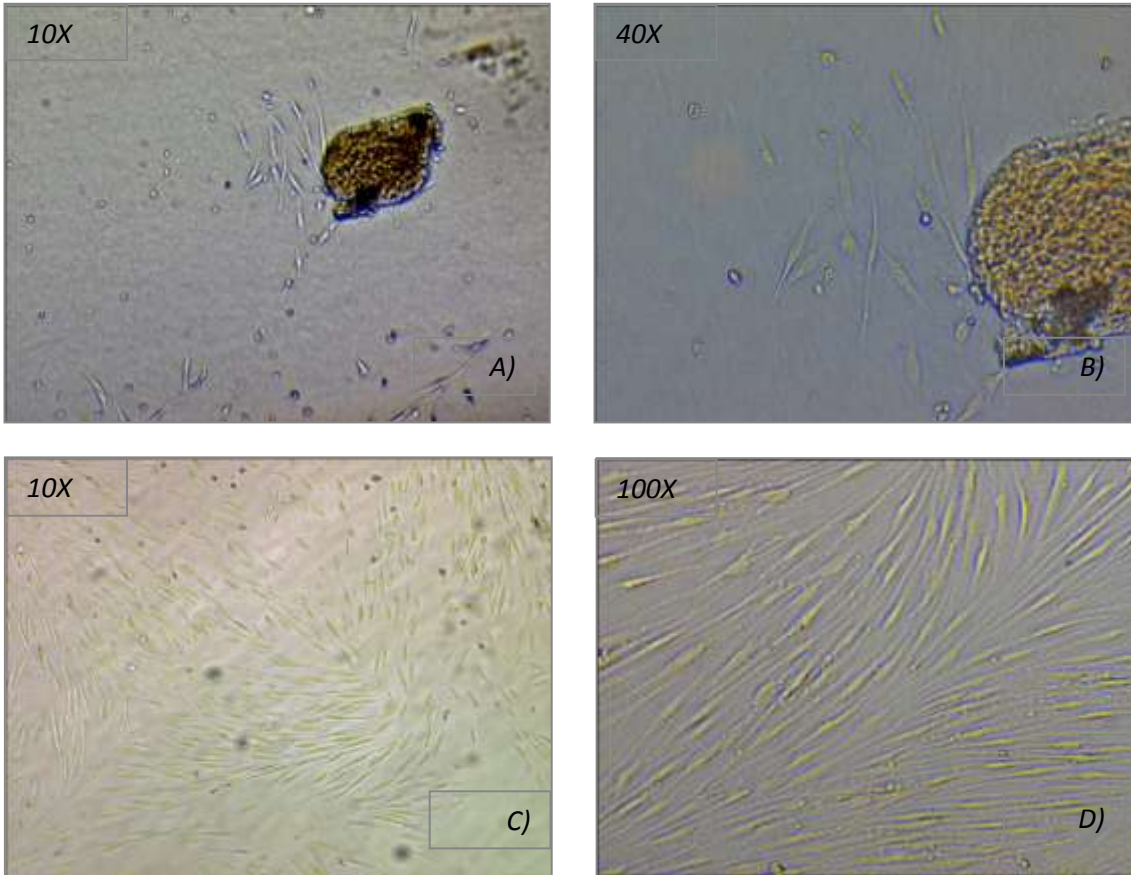


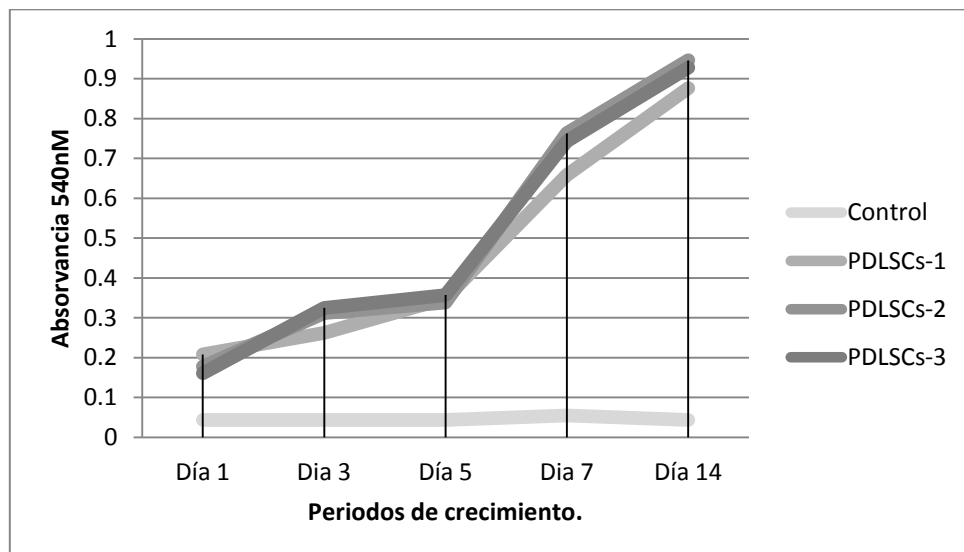
Ilustración 5 En las imágenes A) y B) tomadas a las 72 horas se observa el crecimiento de células alrededor del explanto. En la imagen C) tomada a los 5 días de cultivo las células se encontraron en subconfluencia; a los 7 días el cultivo alcanzó completamente confluencia celular imagen D) a los 8 días de mantener el cultivo.

Una vez que se realizó la disección y sembrado del tejido periodontal, el cultivo primario se mantuvo en observación esperando el crecimiento de las células. Las primeras células aparecieron a las 72 horas de mantener el cultivo en condiciones estándares, aparecieron células con apariencia fibroblastoide en la periferia de los explantos cultivados (Ilustración 5-imagen A y B) al mantener el cultivo en óptimas condiciones, a los 5 días aumento el número celular llenando el plato de cultivo en un 65 a 70%, los explantos se eliminaban con los lavados realizados (Ilustración 5-imagen C). A los 7 días el plato de cultivo se encontraba con las células completamente en confluencia, por lo que era necesario tripsinizarlas para su expansión (Ilustración 5-imagen D).

Evaluación de la capacidad de autorenovación de la población celular obtenida.

Ensayo de MetilTiazolTetrazolio (MTT).

Este ensayo colorimétrico es utilizado para medir la viabilidad y/o proliferación de las células, se empleó 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)2,5 bromuro difeniltetrazolio MTT; el cual es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de las células viables, formando cristales de formazan purpuras solubles en DimetilSulfóxido (DMSO). La absorbancia medida por espectrofotometría es proporcional a la viabilidad/proliferación de las células.



Grafica 1. La lectura fue medida a 540 nM de longitud de onda a 5 tiempos diferentes. Los resultados fueron graficados.

Una vez sembradas 500 células en cajas de 24 multipocillos se evaluaron a 1, 3, 5, 7 y 14 días; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nM; obteniendo como resultado una gráfica ascendente, demostrando que las células mantuvieron su proliferación durante 14 días en condiciones estándares de cultivo. (Grafica 1)

Capacidad de migración celular.

La evaluación de la capacidad de reparar lesiones "in vitro" de nuestra población celular se realizó monitoreándola mediante fotografías microscópicas observando cómo las células invadían nuevamente el área lesionada hasta cubrir en un 100 % la lesión causada.

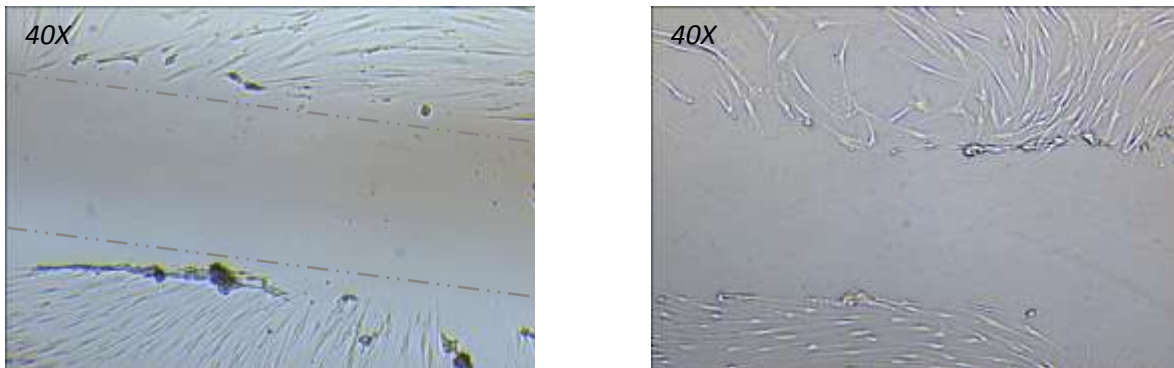


Ilustración 6. Fotografía tomada inmediata después de realizar la lesión en el cultivo.

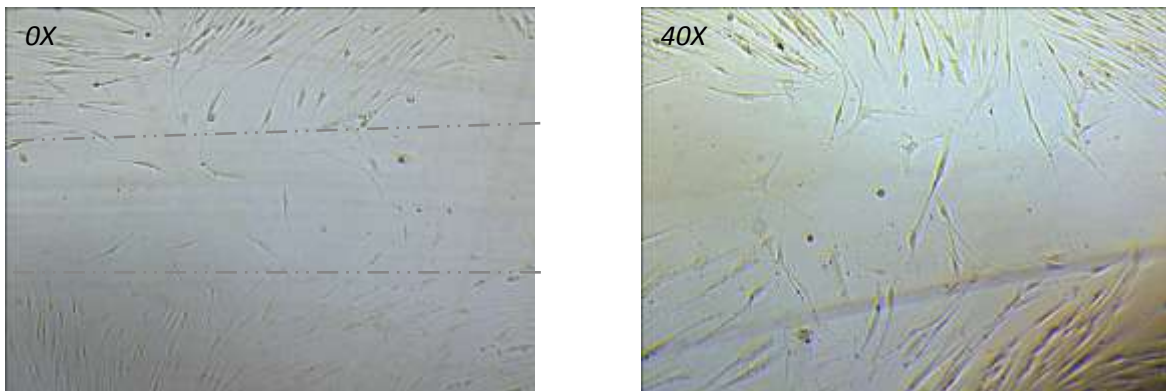


Ilustración 7 Fotografía tomada a las 12 horas después de la lesión en donde observamos migración de un grupo de células recolonizando del 10 al 20% de la lesión.

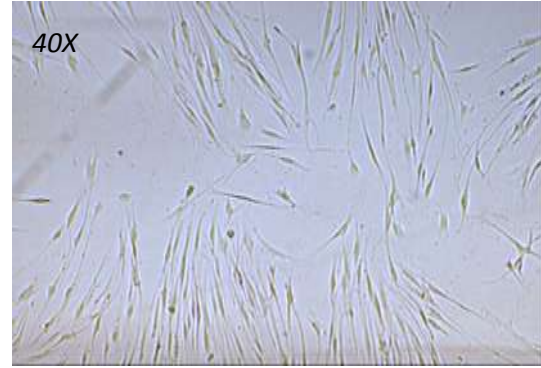
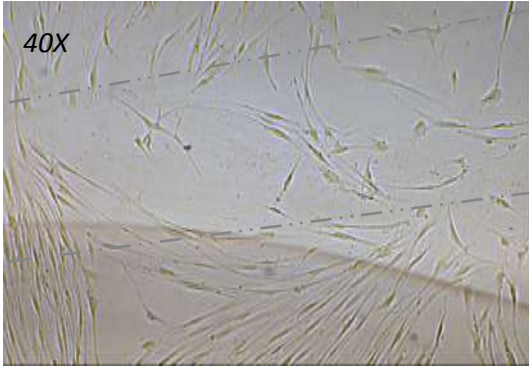


Ilustración 8. Fotografía tomada a las 24 horas después de la lesión en donde observamos migración de un grupo de células recolonizando el área dañada en un 40-60%.

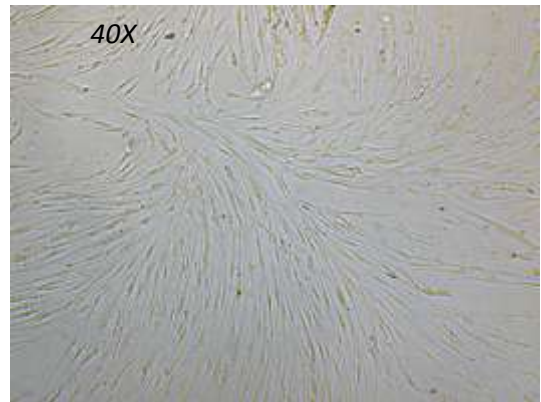


Ilustración 9. Fotografía tomada a las 48 horas después de la lesión en donde podemos observar que las células han cubierto en un 80-90%.

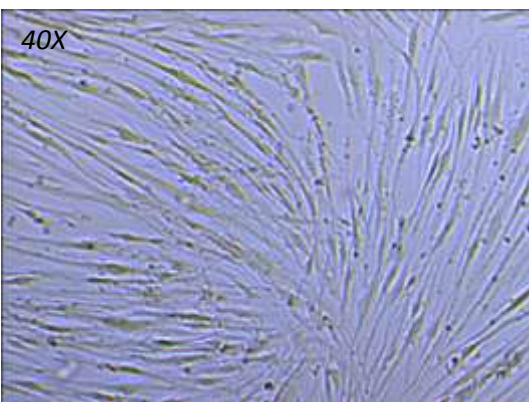


Ilustración 10. Fotografía tomada a las 72 horas después de la lesión en donde podemos observar que las células llegan a confluencia nuevamente.

Se mantuvo el cultivo hasta llegar a confluencia y se le realizó la lesión utilizando la punta de una micropipeta desprendiendo las células adheridas al cultivo; se mantuvo en condiciones estándares esperando que las células migraran nuevamente al espacio lesionado.

La migración de las células hacia el área lesionada se observó a partir de las 12 horas después de realizarla, las células cubrían entre un 10-20% del área crítica, a las 24 horas aumento el número de células las cuales cubrían ya en un 40-60%, a las 48 horas de mantener el cultivo, las células se encontraban ya en semiconfluencia y fue hasta las 72 horas que las células alcanzaron nuevamente a cubrir por completo el área , esto es observable en las imágenes.

Expresión de anticuerpos mesenquimales.

Inmunocitofluorescencia con anti-CD90.

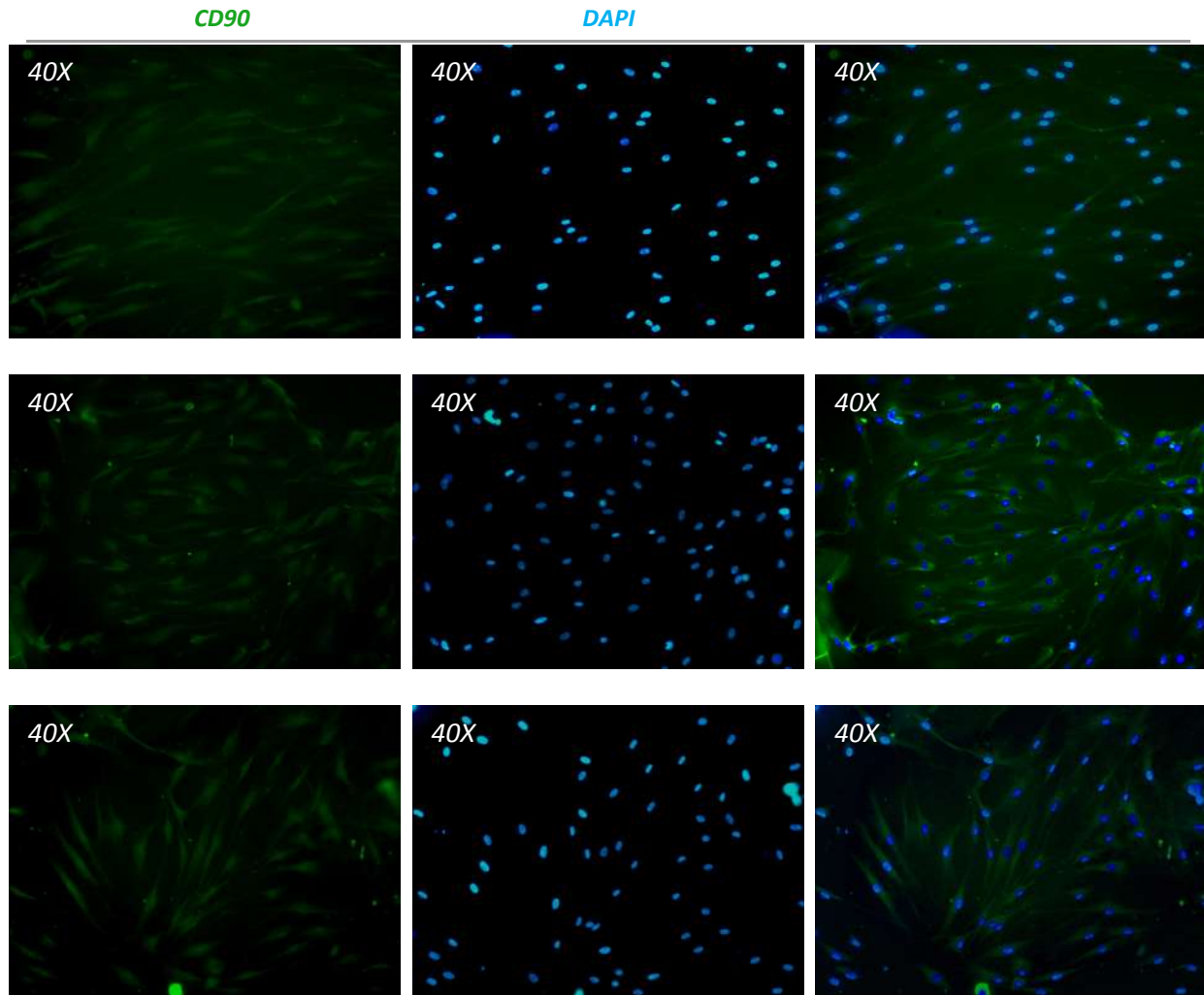


Ilustración 11. Imagen tomada con microscopio de fluorescencia con la cual podemos apreciar la expresión positiva de CD90 de izquierda a derecha en color verde, contrastadas con la tinción del ADN nuclear DAPI en color azul.

La inmunofluorescencia realizada con el tercer subcultivo de nuestra población celular, tuvo un marcaje positivo en la expresión del anticuerpo CD90 en color verde, se contrastaron las imágenes con DAPI que se expresa en color azul

tiñendo el ADN nuclear de las células. Podemos observar que hay marcaje en más del 80% de las células como se muestra en la Ilustración 11.

Inmunocitofluorescencia doble con anti-CD105 y anti-vimentina

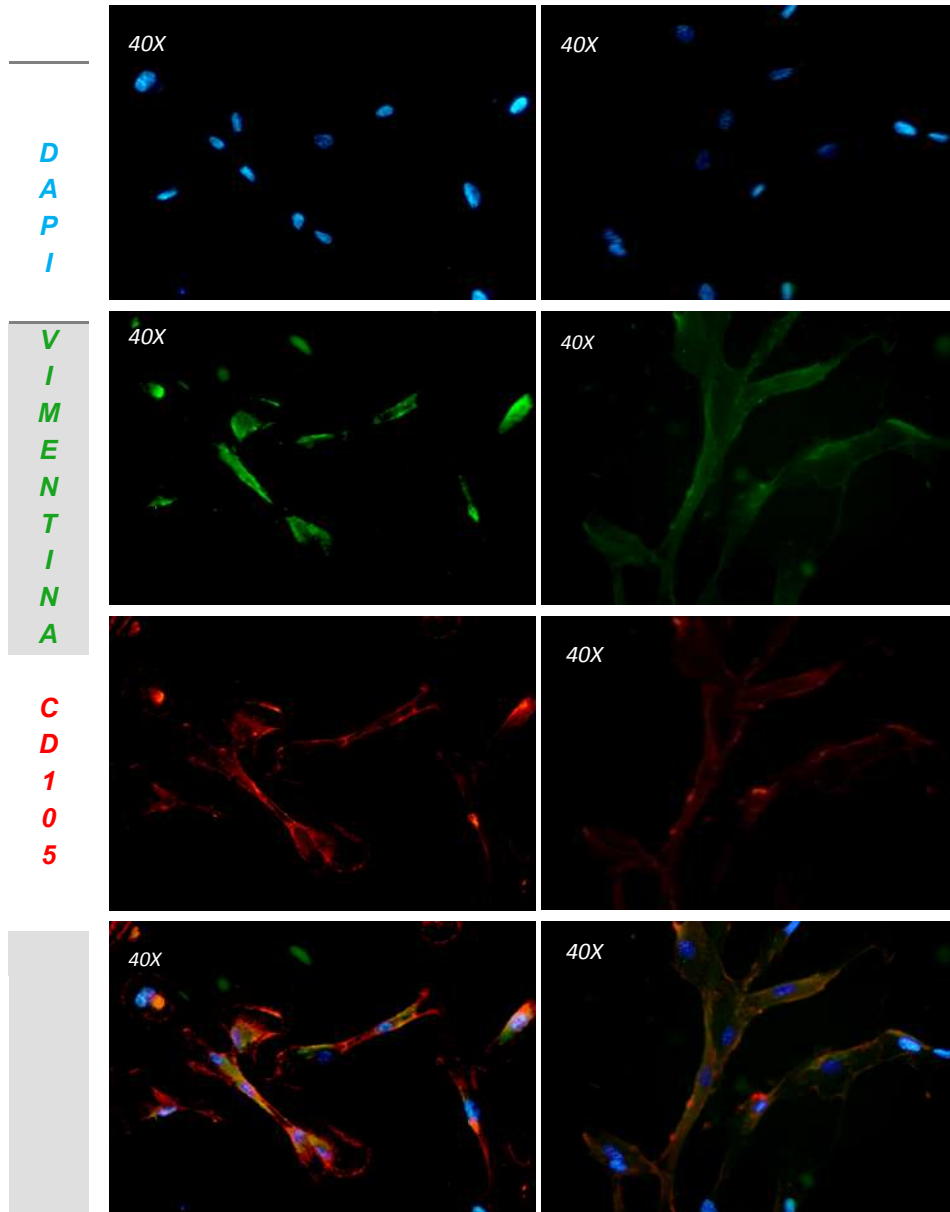


Ilustración 12. Imagen tomada con microscopio de fluorescencia con la cual podemos apreciar la expresión positiva de CD105 en color rojo, vimentina en color verde, contrastadas con la tinción del ADN nuclear DAPI en color azul.

La inmunotinción realizada con el tercer subcultivo de nuestra población celular tuvo un marcaje positivo en la expresión del anticuerpo CD105 en color rojo en un

60% de la población, vimentina en color verde que se expresa en un 90 % de la población, se contrastaron las imágenes con DAPI que se expresa en color azul tiñendo el ADN nuclear de las células. Ilustración 12.

Immunocitofluorescencia con anti-CD73.

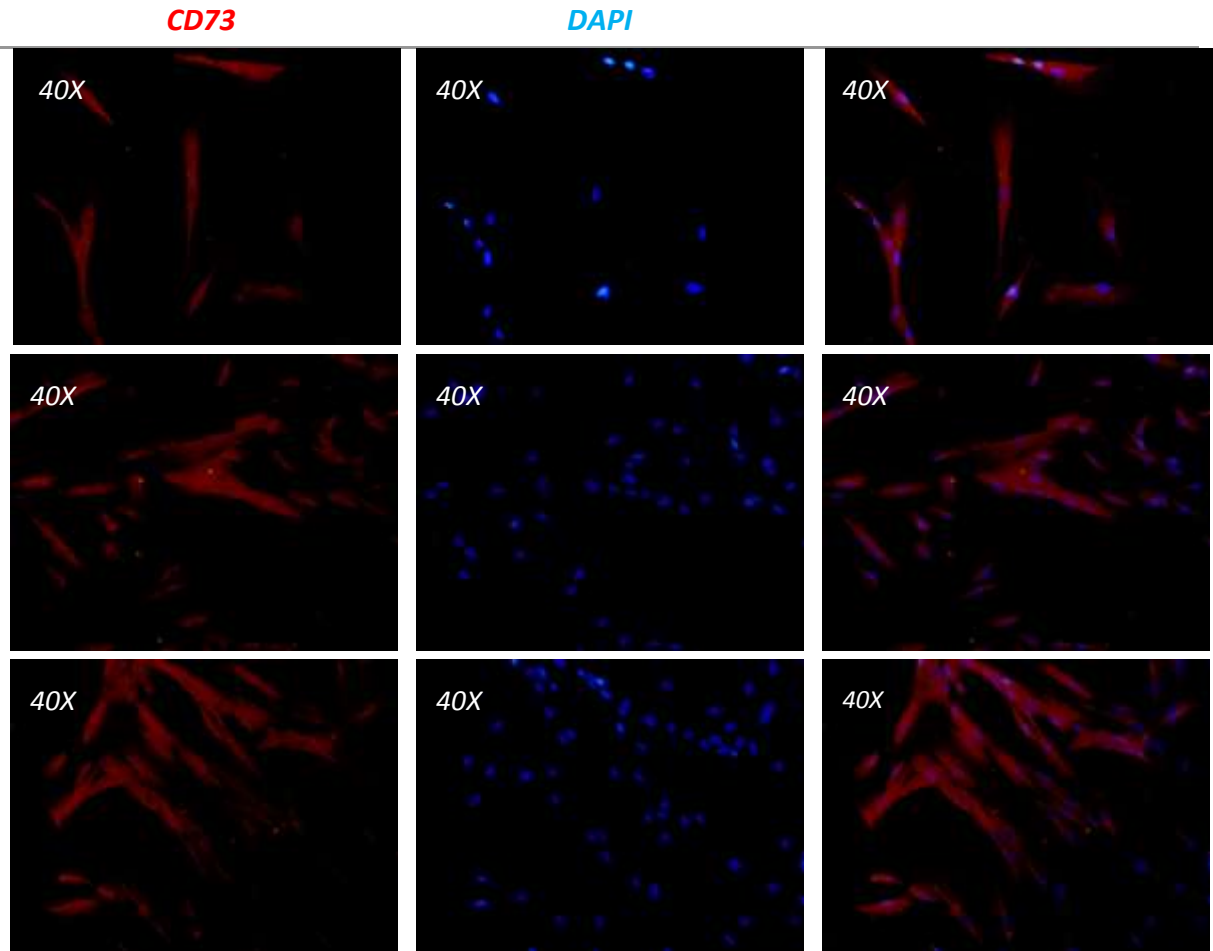


Ilustración 13. Imagen tomada con microscopio de fluorescencia con la cual podemos apreciar la expresión positiva de CD73 en color rojo contrastada con la tinción del ADN nuclear DAPI en color azul.

La técnica de inmunocitofluorescencia realizada con el tercer subcultivo de nuestra población celular tuvo un marcaje del 70 % de positividad en la expresión del

anticuerpo CD73 en color rojo, se contrastaron las imágenes con DAPI que se expresa en color azul tiñendo el ADN nuclear de las células. Ilustración 13.

Diferenciación osteogénica

Una vez inducida la diferenciación ósea, las células pierden su morfología fibroblastoide a los 7 días de mantenerlas en medio osteogénico y adquieren una morfología prismática, de apariencia más cuboide y menos alargada, aparece mayor cantidad de matriz extracelular y presencia de lo que parecen ser nódulos de calcificación que serán revisados más adelante mediante las técnicas adecuadas.

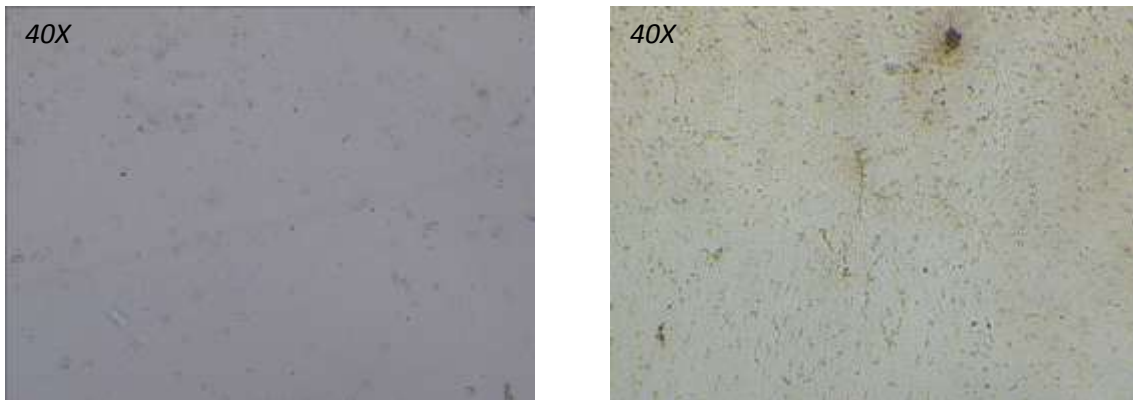


Ilustración 14. Fotografía microscópica de cultivos en diferenciación a los 7 días.

Tinción con rojo de alizarina.

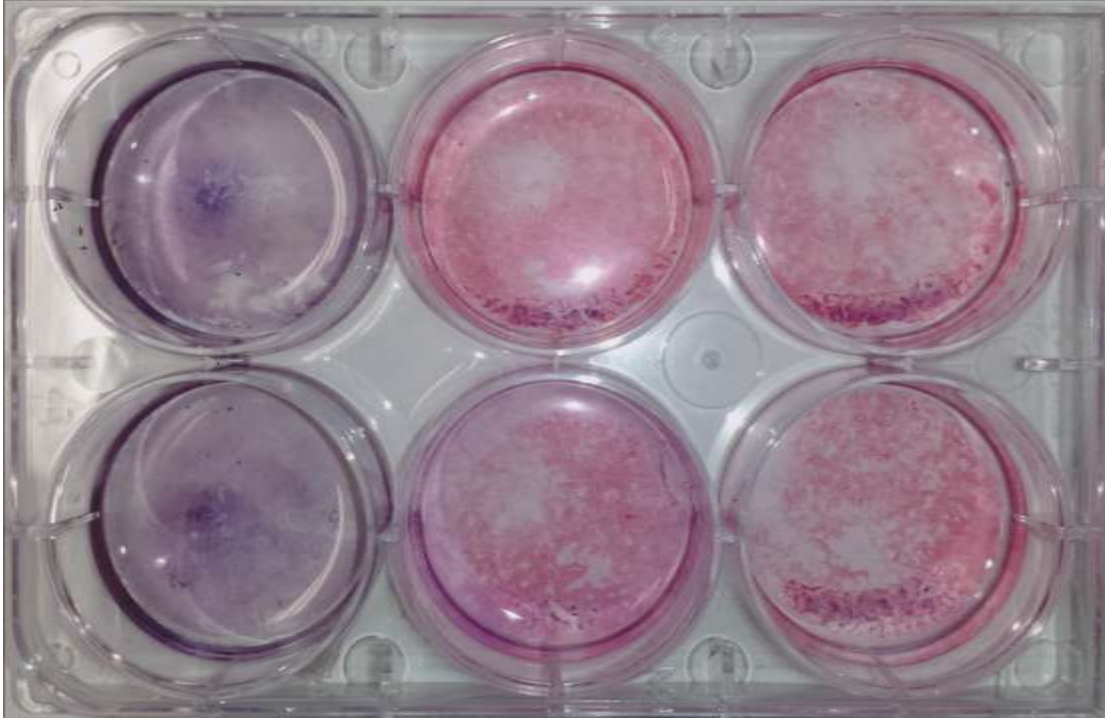


Ilustración 15 Fotografía macroscópica de la tinción con rojo de alizarina con hematoxilina de las células diferenciadas y control de células sin diferenciar teñidas con hematoxilina.

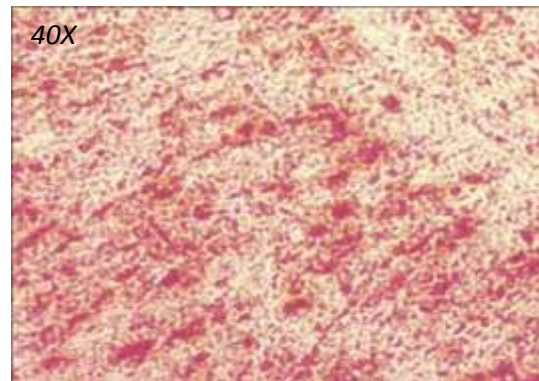
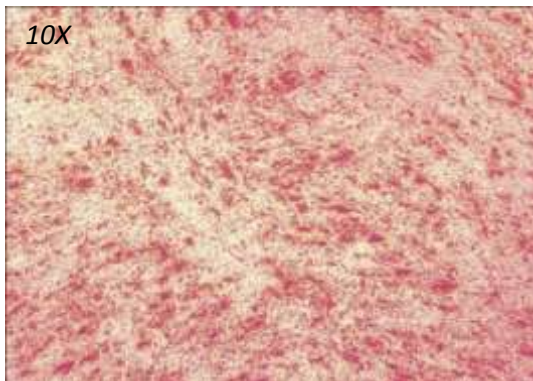


Ilustración 16. Fotografías microscópicas de la tinción con rojo de alizarina de las células diferenciadas.

En las fotografías macro y microscópicas apreciamos que el cultivo diferenciado es positivo a la presencia de depósitos de calcio; por lo que podemos decir que nuestras células están en la etapa de mineralización de la matriz extracelular formada.

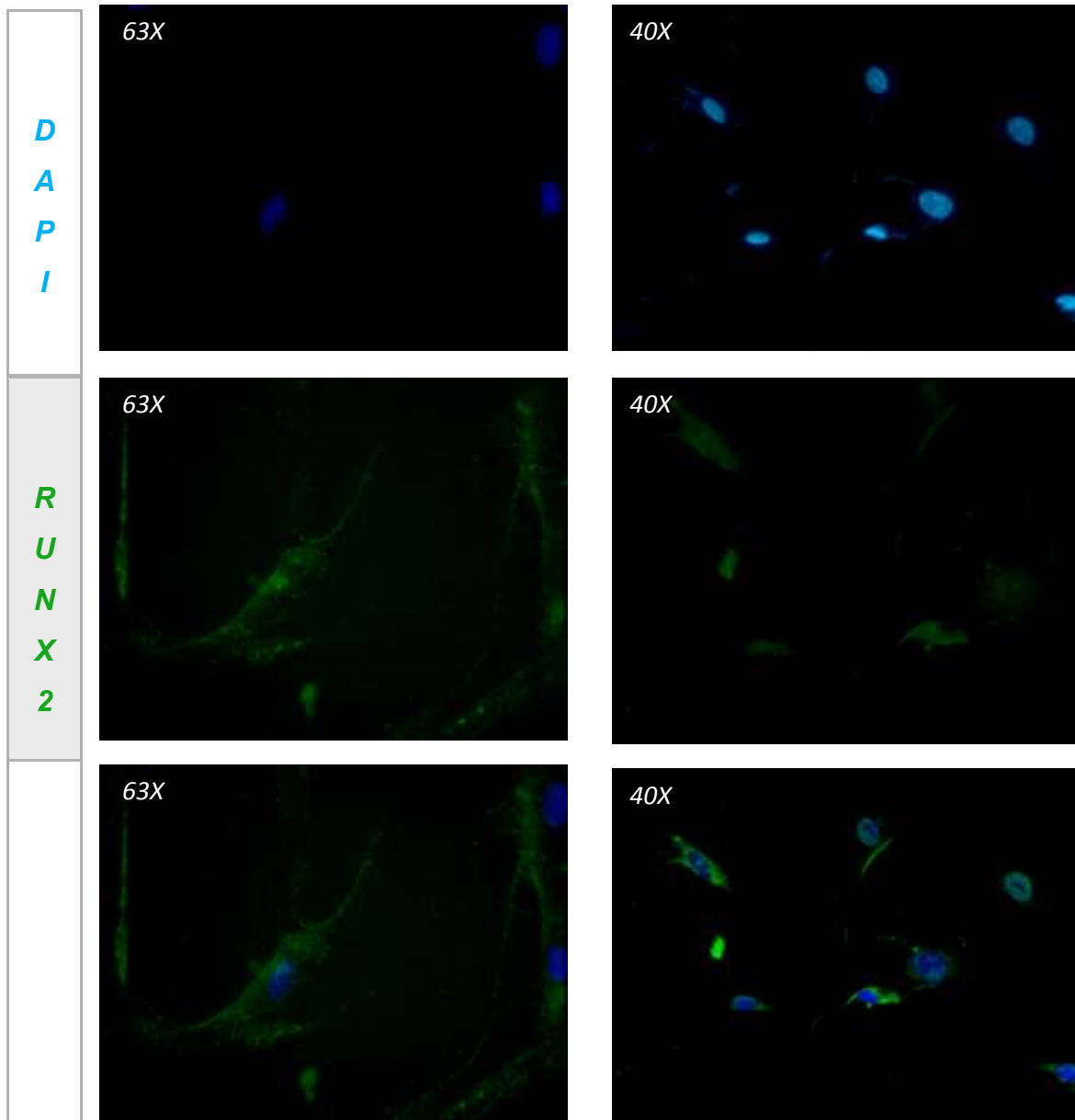
Expresión de Runx2

Ilustración 17. Fotografías de fluorescencia en las cuales observamos la expresión positiva de Runx2 en color verde, contrastadas con la tinción de ADN nuclear con DAPI en color azul.

Runx2 es un factor de transcripción indispensable para la maduración ósea por lo que es expresado en células que se encuentran en etapas tempranas de diferenciación osteogénica. Y como podemos ver en la Ilustración 17 se encuentra la expresado a los 14 días, en nuestra población en al menos el 15% de las

células. Podemos observar en el marcaje en color verde que se expresaba en partes de las células cercanas al núcleo y en el núcleo mismo.

Expresión de osteocalcina.

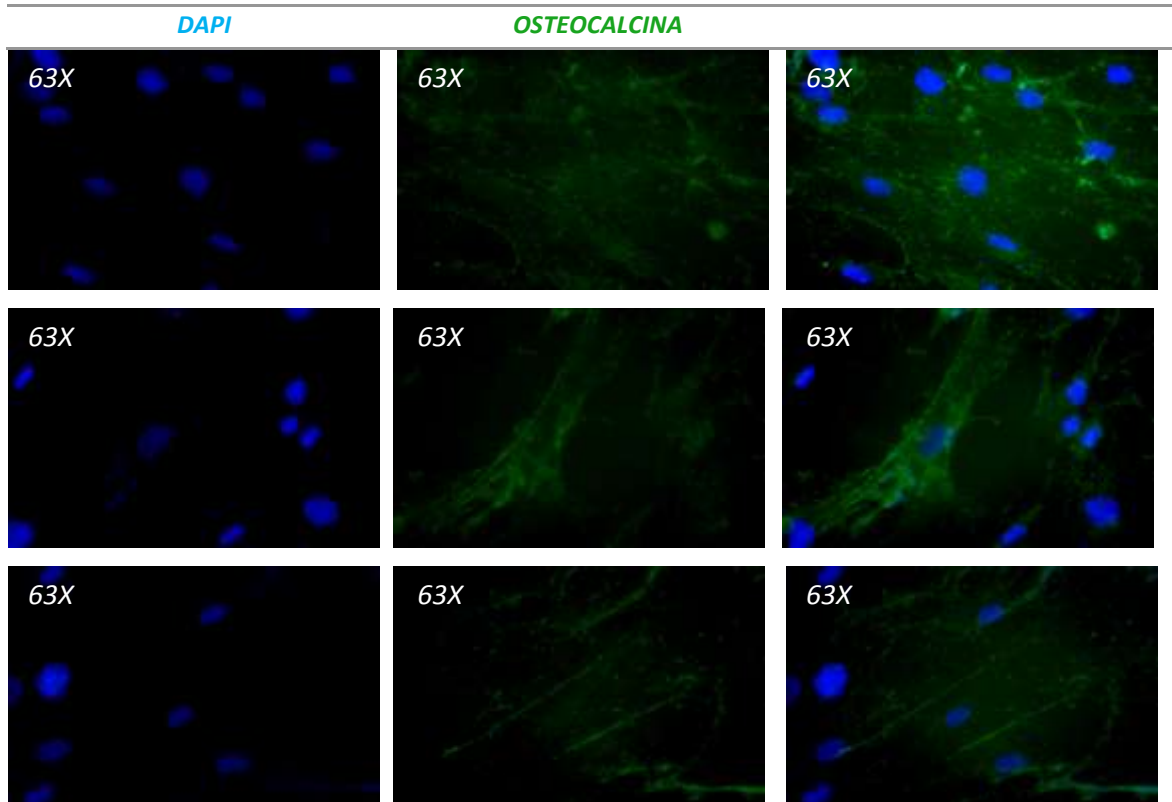


Ilustración 18. Fotografías de fluorescencia en las cuales observamos la expresión positiva de osteocalcina en color verde, contrastadas con la tinción de ADN nuclear con DAPI en color azul.

La osteocalcina es una proteína secretada en la etapa tardía de la diferenciación ósea; es capaz de unirse al calcio para su estabilización; la presencia de esta molécula nos indica la regulación de la mineralización del tejido óseo en formación. La cual encontramos expresada en nuestra población en diferenciación a los 14 días un 90% en color verde Ilustración 18.

Discusión.

Como se ha mencionado anteriormente, el ligamento periodontal es un tejido sui generis debido a su origen embrionario ya que, se considera que proviene del ecto/mesénquima; por que es un tejido que cuenta inervaciones sensitivas y propioceptivas necesarias para realizar funciones básicas biológicas como la masticación; le brinda protección al resto del periodonto amortiguando las fuerzas tanto verticales como horizontales; manteniendo al diente anclado al hueso alveolar y brinda protección de agentes patógenos que pudieran invadir el área subgingival. El ligamento periodontal es el único ligamento del organismo que presenta irrigación sanguínea y drenaje linfático, por lo que cuenta con células de defensa. Es un reservorio de células precursoras de osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos; indispensables para mantener la homeostasis de los tejidos periodontales.

Por estas características, ya conocidas del ligamento periodontal, ha sido un tejido de interés para el estudio de la presencia y comportamiento de células troncales mesenquimales.

Múltiples estudios han demostrado el aislamiento de una población de células con características mesenquimales, por lo que el objetivo de esta tesis fue obtener una población celular con las diferentes metodologías publicadas.

Se realizó la técnica de digestión enzimática con colagenasa tipo I citada por Anop y cols. En el 2003 (Anoop Babu V, 2013.), la cual nos indicaba que el tejido periodontal era digerido durante 12 horas con colagenasa tipo I a una temperatura de 37°C; una vez pasado este tiempo se mantuvo el cultivo bajo condiciones estándares durante 24 horas, para posteriormente, realizar el cambio de medio; nosotros encontramos que, al realizar esta metodología existían inconvenientes; ya que el uso excesivo de colagenasa causó la lisis de la mayoría de las células viables; y en el lavado a las 24 horas después haber realizado el cultivo, causaba el desprendimiento de los fragmentos del tejido que hubieran podido contener células con la capacidad de proliferar; los cultivos los mantuvimos con cambio de medio cada 72 horas hasta el cumplimiento de 15 días, durante los cuales no obtuvimos crecimiento celular, es por ello, que después de realizar estos

experimentos sin resultados nos vimos en la necesidad de descartar esta técnica como viable en nuestro laboratorio. .

En la técnica modificada de Seo y cols. en el 2004 (Seo, 2004) publicaron que utilizando digestión enzimática con Colagenasa tipo I utilizada durante una hora a 37 °C podríamos aislar la población celular, sin embargo, encontramos el mismo inconveniente que con el protocolo anterior, ya que, la indicación del uso de colagenasa creemos que puede ser útil para tejidos con mayor volumen y por otro lado, en este protocolo se adiciona la filtración del tejido utilizando una malla de 70 µm de diámetro, lo que nos causó la retención del tejido periodontal, y al cultivar la suspensión obtenida carecía de todo elemento vital para la proliferación celular, por lo que tampoco obtuvimos la población deseada con esta técnica.

Utilizamos también, la técnica de Gholamrezanezhad y cols quienes reportaron el empleo, nuevamente, de digestión enzimática con colagenasa tipo I, esta técnica tenía como variación que desde el transporte de la muestra, está se realizaba con solución de Hanks. (Gholamrezanezhad, 2011.). Una vez que eran transportados los dientes al laboratorio, se les realizaron lavados con solución de Hanks para eliminar sangre y agentes patógenos; una vez cultivado el tejido digerido por la colagenasa I durante una hora y en óptimas condiciones se mantuvo así durante 72 horas para realizar el primer cambio de medio; el inconveniente con esta técnica es que al pasar este lapso de tiempo, los cultivos se encontraban ya contaminados, por lo que tuvimos que deséchalos para evitar la proliferación de los microorganismos dentro de la incubadora; especulamos que la concentración de antibiótico en la solución de Hanks no era suficiente para eliminar la diversidad de microorganismos en la corona del órgano dental, por lo que esta pudo haber causado la contaminación del cultivo.

Una vez que probamos las tres técnicas anteriormente mencionadas, todas basadas en el uso de colagenasa tipo I y al no tener resultados positivos; decidimos probar en el desarrollo de la técnica de digestión enzimática con tripsina/EDTA 0.25%/0.1% citada por Keiko y cols. En el 2011 (Keiko Tanaka,

2011.) en la cual indicaban que había que realizar un lavado de 2 minutos con D-MEM completo para eliminar el exceso de sangre y agentes contaminantes, se mantenía el tejido en digestión durante 60 minutos a 37 °C, utilizando tripsina/EDTA al 0.25%/0.1%, durante este periodo de tiempo se realizaba una agitación cada 10 minutos a 800 rpm durante 30 segundos para favorecer la disociación del tejido; una vez tripsinizado el tejido se filtraba en una malla de 70 µm de diámetro, la suspensión obtenida se cultivó y el primer cambio de medio se llevó a cabo en las 72 horas posteriores, al revisar los cultivos nos encontrábamos con la contaminación del medio, debido a que el periodo de lavado del tejido era mínimo y no eliminaba la diversidad de microorganismos presentes en la muestra. En este mismo artículo cita un protocolo de cultivo basado simplemente en la digestión mecánica del tejido periodontal, el cual realizamos a la par con la técnica anterior; la metodología indicaba realizar 5 lavados de 30 segundos de duración, utilizando D-MEM completo; el tejido era disecado y cultivado con una cantidad de medio, para conservarlo así durante un periodo de 6-8 horas en incubación esperando que los explantos obtenidos se adhirieran al plato de cultivo; el inconveniente de esta técnica fue mantener el cultivo hidratado, por lo que periódicamente se le adicionaron algunas gotas de medio hasta observar que el tejido no se desprendiera; para poder agregar el medio suficiente para mantener el cultivo durante 24 horas el cambio de medio se realizó cada 72 horas y con cada cambio de medio el tejido se desprendía, por lo que no se logró obtener la población celular.

Una vez que realizamos estas 5 técnicas, por sextuplicado cada una, y fracasando en la obtención del cultivo, decidimos la estandarización de una nueva técnica que cumpliera con los lavados necesarios para evitar la contaminación del cultivo, que el uso de tripsina como agente de digestión enzimática no fuera excesiva para mantener la viabilidad de las células del ligamento periodontal; el cultivo se realizó sin filtrar, logrando así el cultivo tanto de los explantos como de la suspensión obtenida con la digestión enzimática.

El transporte de la muestra se realizó con D-MEM completo y una vez en el laboratorio se le realizaron 3 lavados cinco minutos con D-MEM suplementado con

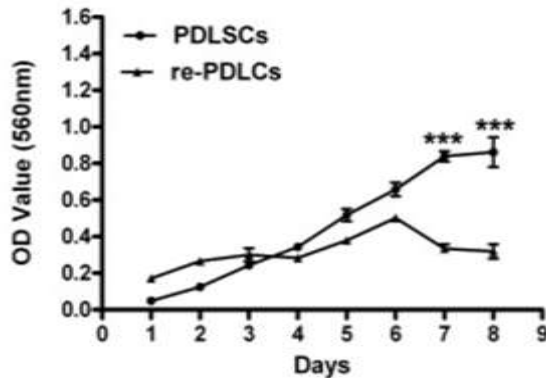
5% de antibiótico; la disgregación enzimática se realizaba con tripsina/EDTA 0.25%/0.1% a 37°C durante 20 minutos, con agitación del tejido en intervalos de 5 minutos a 1000 rpm durante 30 segundos; la suspensión obtenida fue sembrada en placas de 6 pozos con una cantidad de 150-200 µl de medio durante un periodo de 24 horas para que los explantos se adhirieran. Una vez adheridos los explantos, se adiciono más medio para mantener el cultivo durante cuatro días sin cambio de medio. A las 72 horas de realizar el cultivo comenzamos a notar crecimiento de las células alrededor de los explantos adheridos al plástico cuyas células tenían una morfología fibroblastoide. Nuestra técnica estandarizada es viable ya que fundamentalmente cumplimos con el trato específico del tejido con el que trabajamos, sabiendo que la muestra proviene de la cavidad oral, la cual se encuentra colonizada con flora normal; que a pesar de que se tenía la prevención de que el paciente realizara un colutorio con clorhexidina al 0.12% antes de realizar la extracción; sabemos bien, que no es suficiente para arrastrar con el biofilm adherido a la corona anatómica del diente; lo cual fue controlado al aumentar la concentración de antibiótico durante los lavados de la muestra antes de cultivarla.

Por otro lado, cualquier tipo de disgregación, ya sea mecánica o enzimática se asocia a la baja recuperación de células vitales (Novelly M, 2000.); por ello, se decidió el uso de tripsina/EDTA 0.25%/0.1% debido a que la colagenasa actúa directamente sobre los enlaces peptídicos del colágeno, proteína abundante en el ligamento periodontal, por lo que creemos que puede resultar muy agresiva para la disgregación de este tipo de tejido; la tripsinización se realizó durante un periodo corto de tiempo (20 minutos) evitando así cualquier tipo de daño en las células del tejido obtenido. Se realizó el cambio de medio a los 4 días para evitar el arrastre de las células que se encontraban en crecimiento.

Al evaluar la capacidad de autorrenovación de nuestra población celular mediante el ensayo colorimétrico de MTT; midiendo la viabilidad celular a 1, 3, 5, 7 y 14 días, realizando el estudio por triplicado y manteniendo el cultivo en condiciones estándares, la población obtenida demostró aumento en la viabilidad celular al plazo de los 14 días en cultivo; demostrando que cumple con la condición de

autorrenovación que postula la "ISCT" este método ha sido empleado por múltiples autores para demostrar que las PDLSCs son células con alta capacidad de proliferación y que mantienen su capacidad de autorrenovación al mantenerlas en condiciones estándares de cultivo, comparando nuestro estudio con artículos publicados previamente observamos que tenemos resultados similares; (Ming Lei, 2014.) (Ozer A, 2013.) (FJ Rodríguez-Lozano, 2014.) (Yu B, 2013.)

Ming Lei en el 2014; cultivo 2000 células derivadas del ligamento periodontal en condiciones estándares y evaluó la proliferación de su población en un periodo de ocho días empleando el mismo método que nosotros realizamos; reportó una gráfica ascendente, la cual demostró un incremento de la población sembrada inicialmente.



(Ming Lei, 2014.)

Se sabe que la proliferación de las PDLSCs esta mediada por diversos factores de crecimiento y por componentes de su matriz extracelular; que le brindan el microambiente específico para aumentar la proliferación celular en estadios patológicos o simplemente para mantener la homeostasis del periodonto, pero estos no han sido totalmente dilucidados; tal es el caso del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2) que parece ser que tiene la capacidad de aumentar la proliferación in vitro de estas células (Lee JH, 2012.), otro es el factor de crecimiento transformante β (TFG- β) que es un péptido multifuncional que regula la expresión de proteínas de la matriz extracelular; la expresión de (TFG- β) juega un rol importante en la regulación de manera autócrina y parácrina de la proliferación de las PDLSCs (Fujii S, 2010.) (Oscar Peralta-Zaragoza, 2001.). Otro factor es LMP1 (proteína latente de membrana 1) cuyo aumento en su expresión

incrementa también la proliferación de las células derivadas del ligamento periodontal debido a que es un gen diana *downstream* de TFG- β 1 la cual es una vía de señalización crítica para la proliferación y diferenciación de las células (Lin Z, 2010.). Estos fundamentos nos impulsan a estudiar la expresión de estos factores de crecimiento en nuestra población celular obtenida con el objetivo de ahondar en la evaluación de la proliferación celular de las PDLSCs.

La población celular obtenida; mantuvo la capacidad de migrar hacia zonas de lesión evaluadas mediante imágenes tomadas a diferentes tiempos, nuestra población tardó en reparar la lesión 72 horas; la recolonización de nuestra población fue más lenta en comparación con el estudio realizado por TszKinNg en 2015, quien evaluó la capacidad de migración celular de pacientes fumadores y no fumadores; teniendo como resultado en su grupo de pacientes no fumadores, el completo cierre de la herida a las 24 horas posteriores a realizar la lesión; la metodología que ellos emplearon es similar a la citada en este estudio, a diferencia de que ellos cultivaron las células en caja de 12 pozos; por lo que su lesión era del mismo tamaño en cuanto a grosor pero no a longitud y este factor fue determinante para las diferencias encontradas. (Tsz Kin Ng, 2015.)

A nuestra población celular se le realizaron tinciones inmunocitofluorescentes las cuales son positivas para los anticuerpos postulados por la ISCT, lo que determinó que la población celular obtenida presentara en su heterogeneidad células de tipo mesenquimal; la población fue positiva para CD90 en un 90%, para CD73 en un 17% y para CD105 en un 60%; estos resultados concuerdan con publicaciones previas (Seo, 2004) (Trubiani O, 2005.) (Nagatomo K, 2006.) (Dominici M, 2006), sin embargo, sería necesario verificar estos conteos mediante citometría de flujo

Se decidió realizar la identificación de vimentina mediante la inmunocitofluorescencia, ya que está es considerada como la proteína principal del fenotipo mesenquimal y se utiliza como un marcador de desarrollo de células y tejidos; estudios recientes demuestran que está implicada en adhesión, migración y señalización celular (Johanna Ivaska, 2007) reiterando que la población obtenida tiene células progenitoras mesenquimales capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares.

Las PDLSC han sido estudiadas en cuanto a la capacidad que poseen para diferenciarse a múltiples linajes celulares en condiciones específicas de cultivo y los autores reportan que se han diferenciado en células similares a cementoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miofibroblastos y células formadoras de colágeno (Nagatomo K, 2006.)(Wanida Techawattanawisal, 2007.)(IC Gay, 2007.)(Coura GS, 2008.) (Kadar K, 2009.), es por ello que, utilizando medio de diferenciación osteogénico llevamos a nuestra población celular a diferenciación ósea, en un periodo de 14 días, para evaluar el grado de mineralización del cultivo y que después de las diferentes pruebas realizadas dio positivo a ser una población en su mayoría de células osteogénicas.. También analizamos esta diferenciación por medio del marcador osteoide temprano Runx2 y del marcador tardío de etapas finales de osificación: Osteocalcina. De estas pruebas obtuvimos que: la identificación de nódulos de calcificación en los cultivos obtenidos fue abundante, lo que nos confirmó que había la presencia de depósitos de calcio en el cultivo; se observó también el incremento de la matriz extracelular y la pérdida de la morfología inicial de las células, ya que su morfología cambio; las células iniciaron a perder la definición de su citoplasma, la matriz extracelular aumento, las células se aglomeraron formando nódulos que posteriormente confirmamos su calcificación. En contraste, con otros estudiosnuestrascélulas obtenidas del ligamento periodontal tienen alta capacidad para formar nódulos de calcio, lo que no les sucedió en su estudio Seo y cols, en el año 2004, ya que ellos observaron que sus PDLSCsdemostraron menor capacidad de formación de nódulos de calcio cuando las compararon con células mesenquimales derivadas de la medula ósea (Seo, 2004).

Runx2 es un factor de transcripción principal y temprano en la modulación de la diferenciación ósea de las PDLSCs(Lee JS, 2014); este factor es expresado en etapas tempranas de diferenciación ósea; regula la expresión de proteínas asociadas a la calcificación del hueso como son; fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea, colágeno tipo I y colagenasa-3(Schroeder TM, 2005). Los resultados obtenidos no son concluyentes; ya que la expresión debería reflejarse más en el núcleo de la célula y nuestro marcaje muestra la presencia de

runx2 también en el citoplasma circundante al núcleo, Sin embargo la sola presencia de *Runx 2* comparado con nuestro control en el que no existe marcaje nos da la pauta para pensar que efectivamente nuestra población celular comenzó el camino a la diferenciación ósea, sin embargo nos gustaría realizar más pruebas con otras técnicas para mostrar unos resultados más contundentes.

Osteocalcina es un marcador de la diferenciación osteogénica presente durante las últimas etapas de diferenciación; como se ha reportado en estudios anteriores existe una correlación positiva con la expresión de *runx2*, son consistentes los estudios anteriores que informan que la Osteocalcina es el gen diana de *Runx2*. (Kobayashi T, 2005.) la marcada expresión positiva que mostraron nuestros cultivos en diferenciación a 14 días demuestra que logramos obtener la diferenciación osteogénica en nuestra población de células con características mesenquimales derivadas del ligamento periodontal, incluso tal vez está marcada expresión de Osteocalcina es el motivo por el cual, el marcaje de *RUNX2* resulto menos relevante..

Estudios publicados anteriormente demuestran que las PDLSCs expresaron una serie de marcadores cementoblásticos/osteoblásticos, incluidos la fosfatasa alcalina, fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE), sialoproteína ósea, osteocalcina y el receptor tipo I del TGF, (Seo, 2004) resultados de gran interés ya que ha sido un gran reto para los investigadores poder lograr una verdadera regeneración periodontal, se cree que las PDLSCs tienen la capacidad para lograr una verdadera regeneración periodontal, es decir, se han sometido tanto en estudios "in vivo" como "in vitro" a diferenciarse en osteocitos, cementocitos y han demostrado la formación de fibras colágenas. (Wang L, 2011.)

como se ha demostrado en este trabajo del total de células obtenidas, podemos decir que alrededor de un 17-27% son células con características mesenquimales, ya que mantuvieron la capacidad de autorrenovación, pluripotencialidad y adherencia al frasco de cultivo; así como la presencia de los marcadores ya mencionados, todo esto coincide con diversos autores (Huang, 2009)(Nagatomo K, 2006.)(S. Ivanovski, 2006)(Lin Z, 2010.)(Seo, 2004)

Conclusiones.

Logramos obtener una población derivada del ligamento periodontal de dientes sanos extraídos por motivos ortodónticos. Para obtener esta población, evaluamos diversas metodologías citadas en estudios publicados previamente; con las cuales no logramos obtener crecimiento celular; así que estandarizamos una metodología propia que nos permitió mantener la viabilidad celular en nuestras muestras..

Nuestra población celular cumplió con el primer criterio establecido por la ISCT el cual indica que la población celular debe ser adherente al plato de cultivo.

Nuestras células presentan una morfología fibroblastoide con alta capacidad de proliferación y autorrenovación con capacidad de diferenciación ósea; así como la expresión celular positiva de los antígenos de superficie mesenquimales específicos postulados por la ISCT de CD73 en un 70%, CD90 en 90% y CD105 en 60% de nuestra población celular total; evaluamos también la expresión de Vimentina la cual se expresó en el 90% de nuestras células..

expresión

Se evaluó la capacidad de proliferación de nuestra población, y mostró un crecimiento exponencial durante un periodo de 14 días, cumpliendo así con un criterio más para ser considerada como mesenquimal.

Se realizó la diferenciación ósea durante un periodo de 14 días; para demostrar que la morfología de las células comenzó a cambiar después de las primeras 72 horas con un evidente aumento de la matriz extracelular, y la presencia de los marcadores osteogénicos no permite afirmar la capacidad de diferenciación osteogénica de estas células.

Con estos resultados obtenidos podemos concluir que la población aislada tiene un alto porcentaje de células con fenotipos mesenquimales, es una población heterogénea la cual presenta diversos tipos celulares entre los cuales podemos inferir que posee fibroblastos, osteoblastos, y cementoblastos en el cultivo primario, por lo que para lograr obtener una población pura mesenquimal sería necesario realizar un sorting por citometría de flujo para lograr obtener una población mesenquimal purificada.

El objetivo principal de esta tesis fue lograr obtener la población celular, objetivo que se cumplió logrando estandarizar la técnica de cultivo que permite obtener células mesenquimales que son una potencial herramienta para la Medicina y Odontología Regenerativas.

Esta población celular obtenida puede resultar en una innovadora terapia para pacientes comprometidos periodontalmente, ya que estas células podrían permitir la neo formación de cemento radicular, fibras colágenas y hueso alveolar; y que estos tejidos se encuentren integrados en una unidad morfofuncional, y lograr

nuevamente la migración de la gingiva hacia la unión epitelial lo más próxima a la fisiológica hasta la lograr la plena regeneración periodontal, esto pultimo solo como un ejemplo de las posibilidades terapéuticas que esta población nos puede dar.

Con los resultados obtenidos, nuestra hipótesis de que "El ligamento periodontal es una fuente esequible de células mesenquimales" puede ser elevada a la categoría de tesis, con la nueva metodología establecida en la misma

Bibliografía.

Bibliografía.

- Al-Hajj M, W. M. (2013). *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 3983-3988.
- Andrea Ode, J. S. (2013.). *CD73/5'-Ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stromal cells*. European Cells and Materials., 37-47.
- Anoop Babu V, S. R. (2013.). *Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental and periodontal ligament*. Journal Cell. Mol. Med., 1-11.
- Avery James, c. (2007). *Essentials of oral Histology and embryology*. En J. Avery, Essentials of oral Histology and embryology (págs. 145-150).
- Avery, J. K. (2001). *Oral Development and Histology*. New York: Thieme medical Publishers.
- Bernard., A. (2010.). *Biología de las Células Madre*. 9a Adición del curso de Biotecnología aplicada a la Salud Humana., (págs. 39-55).
- Bonnet D, D. J. (1997). *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nature medicine., 730-737.
- Cate., A. T. (1998.). *Oral Histology: Development, Structure and Function*. St Louis.: Mosby Inc.
- Coura GS, G. R.-S. (2008.). *Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells*. J Periodont Res., 531-536.
- Deans RJ, M. A. (2000). *Mesenchymal Stem Cell: Biology and potential clinical uses*. Exp Hematol, 875-884.
- Dominici M, L. B.-C. (2006). *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells*. Cytotherapy., 315-317.
- Eramo A, L. F. (2008.). *Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population*. Cell Death Differ., 504-514.
- Evans M, K. M. (1981.). *Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos*. Nature., 154-156.
- Fermin A. Carranza. Michael G. Newman, H. H. (2004.). *Periodontología Clínica de Newman*. (9na ed.). México.: Interamericana McGraw-Hill.
- Ferraris, M. E. (1999). *Histología y embriología bucodental*. University of Chicago: Panamericana.
- FJ Rodríguez-Lozano, D. G.-B.-C.-R.-G. (2014.). *Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine., 2731-2741.
- Flores Figueroa E, J. J. (2006.). *Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica*. Revista de Investigación Clínica., 498-511.

- Friedenstein AJ, D. U. (1974.). *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method.* Exp Hematol., 83-92.
- Friedenstein AJ, G. (1976). *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.* Experimental hematology, 267-274.
- Fujii S, M. H. (2010.). *Effects of TGF- β 1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line.* Cell Tissue Research., 233-242.
- Genco, J. (1992.). *Host Responses in Periodontal diseases: Current Concepts.* Journal Periodontol., 338-355.
- Gholamrezaezhad, A. (2011.). *Stem Cells in Clinic and Research.* Alemania.: INTECH.
- Gomes-Filho IS, P. J. (2007). *The association between postmenopausal Osteoporosis and Periodontal Disease.* Journal of Periodontology, 1731-1740.
- Gould Reginald, D. A. (1972.). *Mesenchymal condensation and cell contact in early morphogenesis of the chick limb.* Experimental Cell Research, 325-336.
- Gronthos S, B. J. (2002). *Stem cell propertics of human dental pulpstem cells.* Journal of dental research, 531-535.
- Gronthos S, M. M. (2000). *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro an in vivo .* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 13625-13630.
- Hagood., T. A. (2006.). *Thy-1 as a regukator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer and fibrosis.* The FASEB Journal., 1045-1054.
- Haynesworth SE, B. M. (1992). *Cell surface antigens on humanmarrow-derivedmesenchymalcells are detected by monoclonal antibodies.* Bone, 69-80.
- Hiroshi Egusa, W. S. (2012.). *Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources.* Journal of Prosthodontic Research, 151-165.
- Hopkins., J. (2011.). *Stem Cells in Clinic and Research.* U.S.A.: INTECH.
- Horwitz E, K. A. (2006). *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy., 315-7.
- Huang, T. G. (2009). *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. Those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine.* Journal of dental research, 792-806.
- IC Gay, S. C. (2007.). *Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells.* Orthod Craniofacial Res., 149–160.
- Inagaki K, K. Y. (2005). *Efficacy of Periodontal Disease and Tooth Loss to Screen of Low Bone Mineral Density in Japanese Women.* Calcified Tissue International., 9-14.

- Johanna Ivaska, H.-M. P. (2007). *Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling*. *Experimental Cell Research*, 2050-2062.
- Kadar K, K. M. (2009.). *Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering*. *J Physiol Pharmacol.*, 167-175.
- Keiko Tanaka, K. I. (2011.). *Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods*. *Archives of oral biology.*, 380-388.
- Kobayashi T, K. H. (2005.). *Minireview: transcriptional regulation in development of bone*. *Endocrinology.*, 1012-1017.
- Kornman KS, N. M. (1994.). *The influence of supragingival plaque control on clinical and microbial outcomes following the use of antibiotics for the treatment of periodontitis*. *Journal of periodontology*, 848-854.
- L. García Pozo, M. E.-C.-R. (2008). *Endoglina: estructura, funciones biológicas y papel en la fibrogenesis*. *Revista Española de Enfermedades Digestivas.*, 355.365.
- Landín, F. A. (2012). *Anatomía aplicada a la estomatología*. *La Habana Cuba: Ciencias Medicas*.
- Lee JH, U. S. (2012.). *Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells*. *Cell Tissue Research.*, 475-484.
- Lee JS, Y. J. (2014). *Increased osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells on polydopamine film occurs via activation of integrin and PI3K signaling pathways*. *Cell Physiol Biochem*, 1824-1834.
- Li C, H. D. (2007.). *Identification of pancreatic cancer stem cells*. *Cancer Research.*, 1030-1037.
- Lin Z, N. V. (2010.). *LMP1 regulates periodontal ligament progenitor cell proliferation and differentiation*. *Bone*, 55-64.
- Lymperi S, L. C. (2013). *Dental stem cells their applications in dental tissue engineering*. *The Open Dentistry Journal*, 76-81.
- Ma S, C. K. (2007.). *Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells*. *Gastroenterology.*, 2542-2556.
- Maitland NJ, C. A. (2008.). *Prostate cancer stem cells: a new target for therapy*. *Journal of clinical oncology.*, 2862-2870.
- Matsui W, H. C. (2004). *Characterization of clonogenic multiple myeloma cells*. *Blood*, 2332-2336.
- McCulloch CA, N. E. (1987.). *Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations*. *The Anatomical record.*, 233-242.
- ME Arias, R. F. (2009). *Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina*. *Archivos Medicos*, 185-195.

- Michael K. McGuire, E. T. (2008.). *A Pilot Study to Evaluate a Tissue-Engineered Bilayered Cell Therapy as an Alternative to Tissue From the Palate*. J. Periodontol, 1847-1856.
- Ming Lei, K. L.-N.-M. (2014.). *Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation*. Biomaterials., 6332-6343.
- Miura M, G. S. (2003). *SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 5807-5812.
- Mizoguchi T, M. A. (2009.). *Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo*. Journal Cell Biol., 541-554.
- Mizoguchi T, M. A. (2009.). *Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo*. Journal Cell Biol., 541-554.
- Mombelli A, C. F. (2002.). *Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review*. Journal of clinical periodontology., 10-21.
- Morsezeck C, G. W. (2005.). *Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth*. Matrix Biol., 155-165.
- Murray PE, G.-G. (2004). *Stem cell responses in tooth regeneration*. Células madre Dev., 255-262.
- Nagatomo K, K. M. (2006.). *Stem cell properties of human periodontal ligament cells*. J Periodontal Res., 303-310.
- Novelly M, S. P. (2000.). *Collagenase digestion a mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas*. Clin Exp Dermatol, 423-431.
- O'Brien CA, P. A. (2007). *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 106-110.
- Oscar Peralta-Zaragoza, A. L.-M.-M. (2001.). *Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación el cancer*. Salud Publica de México., 340-351.
- Otto, F. T. (1997.). *RUNX2, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell., 89, 765.
- Ozer A, Y. G. (3013.). *Domain of dentine sialoprotein mediates proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells*. PLoS One., 1655 (1-16).
- Rasmusson. (2006.). *Immune modulation by mesenchymal stem cells*. Exp Cell Res, 169-179.
- Ripamonti T, P. J. (2009.). *Cementogenesis and the induction of periodontal tissue regeneration by the osteogenic proteins of the transforming growth factor-beta superfamily*. J Periodontal Res. , 141-152.

- Rosana Pelayo, J. S.-O. (2011.). *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. México D.F.: Jano S. A. de C. V.
- Rovó A, G. A. (2008.). *Plasticity after allogenic hepatopoietic stem cells transplantation*. Biol Chem , 825-836.
- S. Ivanovski, S. G. (2006). *Stem Cells In The Periodontal Ligament*. Oral Dis., 358-363.
- Schatton T, M. G. (2008.). *Identification of cells initiating human melanomas*. Nature., 345-349.
- Schroeder TM, J. E. (2005). *Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts*. Birth Defects Res C Embryo, 213-225.
- Seo BM, M. M. (2005.). *Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament*. Journal of dental research., 907-912.
- Seo, B. (2004). *Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament*. Lancet., 149-155.
- Singh SK, C. I. (2013). *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, Cancer research*. Cancer Research, 5821-5828.
- Sloan AJ, S. A. (2007). *Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair*. Oral diseases., 151-157.
- Socransky SS, H. A. (1998.). *Microbial complexes in subgingival plaque*. Journal of clinical periodontology. , 134-144.
- Sonoyama W, L. Y. (2006.). *Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine*. PLoS ONE., 1(1): e79. .
- Sperber, G. (1989.). *Craniofacial Embryology*. Great Britain: Dental Handbook.
- Supajatura V, U. H. (2002.). *Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity*. J Clin Invest., 1351-1359.
- Takada H, M. J. (1991.). *Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with Bacteroides lipopolysaccharides*. Infect Immun., 1351-1359.
- Takaishi S, O. T. (2009.). *Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44*. Stem Cell., 1006-1020.
- Takeda, S. B. (2011.). *Continuous expression of Cbfa1 in non-hypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice*. Genes Dev., 15, 467.
- Thomson JA1, I.-E. J. (1998.). *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science., 1145-1147.
- Trubiani O, D. P. (2005.). *Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament*. J Immunopathol Pharmacol., 213-221.

- Tsz Kin Ng, L. H.-Y.-F. (2015.). *Cigarette smoking hinders human periodontal ligament-derived stem cell proliferation, migration and differentiation potentials*. Scientific Reports., 1-7.
- Wang L, S. H. (2011.). *Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament*. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society., 1015-1026.
- Wanida Techawattanasrisa, K. N. (2007.). *Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system*. Biochemical and Biophysical Research Communications., 917-923.
- Yang ZH, Z. X. (2009.). *Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues*. J Periodontal Res. , 199-210.
- Yao S, P. F. (2008). *Differentiation of stem cells in the dental follicle*. I Dent. Res., 767-771.
- Ying, & Nichols J, C. I. (2003.). *BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3*. Cell., 281–292.
- Yu B, W. Z. (2013.). *Effect of concentrated growth factors on beagle periodontal ligament stem cells in vitro*. Molecular medicine reports., 235-242.
- Zhang S, B. C. (2008.). *Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors*. Cancer Research, 4311-4320.

Abreviaturas.

Abreviaturas.

AMP: AdenosinMonofosfato.

BMSCs: Células Troncales Mesenquimales de la Medula Ósea.

CD: Cluster of Differentiation. (Grupos de Diferenciación).

CFU-F: Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastos.

CMN: Células Mesenquimales Neurales.

CSC: Células Troncales del Cáncer.

DFSCs: Células Troncales Mesenquimales de Folículo Dental.

D-MEM: Medio Esencial Mínimo modificación de Dulbecco.

DMSO: DimetilSulfóxido.

DPSCs: Células Troncales Mesenquimales de Pulpa Dental.

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico.

ESC: EmbryonicStemCells (Células Troncales Embrionarias).

FBS: Suero Fetal Bovino.

FDA: Food and Drug Administration.

FGF: Factor de Crecimiento Fibroblastoide.

GAG: Glicosaminoglicano.

GPI: Glicosilfosfatidilinositol.

hESC: Células Troncales Embrionarias Humanas.

IL: Interleucina.

iPSC: Células Troncales Pluripotentes Inducidas.

ISCT: International Society for Cellular Therapy.

LPD: Ligamento Periodontal.

MSC: MesenchymalStemCells (Células Troncales Mesenquimales).

MTT: MetilTiazolTertazolio.

NFkB: Factor Nuclear de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células B.

PBS: Buffer fosfato salino.

PDLSCs: Células Troncales Mesenquimales del Ligamento Periodontal.

RANKL: Ligando del Receptor Nuclear K B.

RPM: Revoluciones Por Minuto.

SCAPs: Células Troncales Mesenquimales de la Papila Dental Apical.

SHEDs: Células Troncales Mesenquimales de Dientes Humanos Deciduos Exfoliados.

TFG-β: Factor de Crecimiento Transformante Beta.

THH1: Talangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I.

TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

Anexos.

Anexo1. Consentimiento informado y ficha de identificación.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

México D.F. a ____ de _____ de ____.

Yo _____ con número de CURP o IFE _____, mayor de edad y en pleno uso de mis facultades, declaro libremente que se me ha informado de manera clara y concisa, que se me han resuelto las dudas, y voluntariamente estoy de acuerdo en que la muestra de tejido adiposo que me serán extraídas durante mi procedimiento quirúrgico; sean usados en el proyecto: **Diferenciación osteoblástica de células mesenquimales provenientes de tejido adiposo y ligamento Periodontal humano** que fue financiado por el proyecto PAPCA núm. 30 en la sesión extraordinaria 556 del día 11 de marzo, para el Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para promover grupos de investigación (PAPCA 2013); cuyo objetivo es el obtener una población de células mesenquimales, a partir del tejido que estoy donando. Los tejidos (que generalmente son un producto de desecho) serán recuperados en la clínica y/o consultorio en base a las normas vigentes para el manejo de muestras biológico-infecciosas. Siguiendo protocolos básicos de cultivo celular y técnicas bioquímico-moleculares serán procesadas en un laboratorio de la unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y que solo serán utilizadas para los fines que se especifican en este estudio. Los beneficios que se obtengan de este estudio será el de generar conocimientos en los procesos biológicos y los vínculos entre las enfermedades en los seres humanos. Así mismo, se me informó que este tipo de investigación es con riesgo mínimo de acuerdo al Artículo 17 del Capítulo I del Título segundo de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que me surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha explicado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento, sin que la atención odontológica que se me proporciona, se vea afectada por este hecho.

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me brinda y que toda la información que he otorgado sobre mi identidad y participación será tratada de manera confidencial, bajo la ley actual de protección de datos personales.

Para los fines que se estime conveniente, firmo este consentimiento informado, conservando una copia del mismo donde autorizó el almacenamiento y uso de los tejidos en la unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, así como de las células que de él derivan.

Las preguntas que consideren necesarias para aclarar todas sus dudas, las puede externar con el Investigador Principal: Dra. Cynthia G. Trejo Iriarte al teléfono 5548518571 ó email: lictit.fesi@gmail.com e Investigador responsable: Omar Ramírez Ramírez al teléfono 5518147972 ó email: dentomar14@gmail.com

México D.F. a _____ de _____ de _____.

NOMBRE

FIRMA

DONADOR: _____

MÉDICO: _____

TESTIGO: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ La naturaleza y los propósitos de la donación que está realizando, así como la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con tejidos biológicos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha



Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
Obtención de PDLSCs a partir de dientes extraídos.

N° de ID: _____

N° de consentimiento informado: _____

Nombre del paciente: _____

Edad: _____ Genero: _____

Motivo de la extracción: _____

Fecha y hora de extracción: _____

Nombre del operador: _____

Órganos Dentales: _____

Técnica de extracción: _____

Quien recibe la muestra: _____

¿Desea que los dientes sean regresados?

Sí No

Observaciones: _____

Ficha de identificación de la muestra.

Anexo 2 composición del D-MEM

Components	Concentration (mg/L)
Amino Acids	
Glycine	37.5
L-Alanine	8.9
L-Argininehydrochloride	84.0
L-Asparagine	13.2
L-Asparticacid	13.3
L-Cystine 2HCl	63.0
L-GlutamicAcid	14.7
L-Histidine hydrochloride-H2O	42.0
L-Isoleucine	105.0
L-Leucine	105.0
L-Lysinehydrochloride	146.0
L-Methionine	30.0
L-Phenylalanine	66.0
L-Proline	11.5
L-Serine	52.5
L-Threonine	95.0
L-Tryptophan	16.0
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	104.0
L-Valine	94.0
Vitamins	
AscorbicAcidphosphate	2.5
Cholinechloride	4.0
D-Calciumpantothenate	4.0
FolicAcid	4.0
Niacinamide	4.0
Pyridoxinehydrochloride	4.0
Riboflavin	0.4
Thiaminehydrochloride	4.0
i-Inositol	7.2
InorganicSalts	
CalciumChloride (CaCl ₂) (anhyd.)	200.0
FerricNitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.1
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	97.67
PotassiumChloride (KCl)	400.0
SodiumBicarbonate (NaHCO ₃)	3700.0
SodiumChloride (NaCl)	6400.0
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O)	125.0
Proteins	
AlbuMAX® II	400.0
Human Transferrin (Holo)	7.5
InsulinRecombinant Full Chain	10.0
Trace Elements	
AmmoniumMetavanadate	3.0E-4
Cupric Sulfate	0.00125
ManganousChloride	5.0E-5
SodiumSelenite	0.0050
OtherComponents	
D-Glucose (Dextrose)	4500.0
Ethanolamine	1.9
Glutathione (reduced)	1.0
Phenol Red	15.0
SodiumPyruvate	110.0

