



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Mucosa retromolar como fuente de obtención
de células madre mesenquimales, una
alternativa para diferenciación condrogénica.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A (N)

Michell Madai Quezada Pedraza

Director

Esp.

Arely Martínez Gutiérrez

Dictaminadores

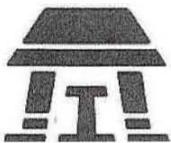
Esp.

María del Carmen Rocha Mosqueda

Dr.

Raúl Rosales Ibáñez

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2016





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.

A MI MADRE: Tú con tu ternura y fuerza me has ayudado a salir adelante a cada paso que doy. Gracias por ser la gran mujer que eres porque no solo fuiste la mejor mamá si no también un gran papá.

Te amo mamá.

A MIS TÍOS: Porque desde pequeña me enseñaron a luchar por lo que me proponía y porque encontré en ustedes ayuda, apoyo y un gran ejemplo a seguir.

A BLANCA ESTHER RODRÍGUEZ BUENROSTRO: Por tus ánimos de descubrir nuevas opciones y seguir mis sueños a pesar de todo, por ser parte de mi vida y por tus consejos.

Gracias tía.

A ROBERTO VÁZQUEZ HERNÁNDEZ: Por ser una de las personas más especiales de mi vida, por tu apoyo incondicional, tu paciencia, compañía y amor. Gracias porque tú has sabido llegarme al corazón.

Te amo.

A MI PADRE: Marco Antonio Muñoz Reyna. Por enseñarme las bases que hicieron a la persona que soy hoy.

Te amo papá.

A ANA KAREN HÉRNANDEZ GONZÁLEZ: Por ser ese rayo de luz que animó este año, por tu ayuda, compañía y amistad. Porque tú fuiste una más de mis asesores. Gracias amiga por estar a mi lado y por volverte una hermana para mí.

Te quiero.

A MIS AMIGOS DE FORENSE: Jessica, Kike y Arturo. Por ser una de las mejores cosas que me han sucedido. Gracias por darme esos viernes llenos de risas, platicas y en especial ese bullying característico de ustedes. Estoy segura de que este tiempo fue el inicio de una larga amistad.

Los adoro amigos.

A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO: Gracias por hacer más amena esta etapa, por sus consejos, platicas y convivencia.

A MIS HERMANOS: Bernardo, César, Cynthia, Dulce, Monse, Sarai, Veronica y Yanei. Ustedes saben que son mis hermanos desde hace más de 10 años, que lo nuestro sobrepasa más de una amistad, porque nuestras vivencias nos han forjado como personas y por ello admiro a cada uno de ustedes porque a pesar de nuestras diferencias y vidas tan distintas, cada uno se toma el tiempo para escuchar y comprender al otro. Gracias por apoyarme en cada locura, en cada victoria y fracaso; por darme la paz en momentos de caos, las risas en momentos de tristeza y la fuerza cuando he visto todo perdido.

Los amo.

A MIS DOCTORAS: Arely Martínez Gutiérrez y María del Carmen Rocha Mosqueda. Gracias por su asesoría y paciencia, por guiarme en cada momento de este proyecto, por escucharme y comprenderme. Y sobre todo gracias por mostrarme las hermosas personas que son, ese lado humano, profesionalismo y entrega hacia conmigo y en cada cosa que hacen.

A MIS DOCTORES: José Trinidad Cano Brown y Raúl Rosales Ibáñez. Por su esmero, profesionalismo y dedicación hacia este proyecto, gracias por compartir todos sus conocimientos, mostrarme la forma correcta de trabajar y por sus consejos.

A Yadira Ledesma Soto y Luis Arturo Baiza Guthman: Gracias por compartir sus conocimientos y lugar de trabajo, por siempre tomarse un tiempo en sus múltiples ocupaciones para ayudarme y asesorarme.

Gracias a todos por ser mis maestros de vida.

INDICE

1. LISTA DE ABREVIATURAS

2. RESUMEN

3. ANTECEDENTES

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

4.2 Objetivos específicos

5. HIPÓTESIS

6. JUSTIFICACIÓN

7. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

7.1 Obtención de la muestra

7.2 Preparación de cultivo

7.3 Método de cosecha celular

7.4 Conteo celular

7.5 “Clasificación” de células por actividad magnética (MACS)

7.6 Determinación de la viabilidad celular

7.6.1 Pruebas de viabilidad por fluorescencia

7.6.1.1 Live and Dead (Vida y Muerte)

7.6.1.2 DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindoldihidrocloruro)

7.6.2 Pruebas de viabilidad por absorbancia

7.6.2.1 MTT 3(-4,5-dimetiltiazol-2yl)2.5-difeniltetrazolium

7.6.2.2 Azul Alamar (AB)

7.6.3 Prueba de proliferación celular por fluorescencia

7.6.3.1 EdU

7.6.3.1 Etiquetado celular con EdU

7.6.3.2 Fijación y permeabilización celular

7.6.3.3 Mezcla de reacción

7.6.3.4 Tinción de ADN

7.7 Inmunomarcaje

7.8 Diferenciación celular

7.8.1 Medio de diferenciación QN

7.9 Safranina O

7.10 Tinción azul alcian

7.11 Inmunofluorescencia

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de la muestra

8.2 Cultivo celular

8.3 Macs (“Clasificación” de células por actividad magnética)

8.4 Pruebas de viabilidad y proliferación

8.5 Inmunocaracterización

8.6 Tinciones e inmunofluorescencia

9. DISCUSIÓN

10. CONCLUSIONES

11. BIBLIOGRAFÍA

1. LISTA DE ABREVIATURAS

AB.	Azul alamar (Alamar Blue).
ACAN.	Agrecán.
ATC.	Transplante Autólogo de Condrocitos.
bFGF.	Factor de crecimiento fibroblastoide básico.
BMP4.	Proteína morfogenética ósea.
BSA.	Albúmina de suero bovino.
COL2A1.	Colágeno tipo 2 alfa 1.
COLII.	Colágeno tipo 2.
DAPI.	(4'6-diamidino-2-fenilindoldihidrocloruro).
DMEM.	Medio de Eagles Modificado por Dulbecco.
DMSO.	Dimetilsulfóxido.
EDTA.	Ácido etilendiaminotetraacético.
EdU.	(5-etinil-2'desoxiuridina).
FGF-2.	Factor de crecimiento fibroblastoide-2.
GAG.	Glucosaminoglucanos.
GMSC.	Células Madre Mesenquimales de Encía

KGF.	Factor de crecimiento de los queratinocitos.
MACS.	Clasificación de células por actividad magnética
MTT.	3(-4,5-dimetiltiazol-2yl)2.5-difeniltetrazolium.
PBS.	Tampón fosfato salino.
PBT.	Tampón fosfato salino tween.
PGE.	Prostaglandinas.
RER.	Retículo Endoplasmático Rugoso.
RT-PCR.	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
SBF.	Suero fetal bovino.
SHED.	Células madre de dientes humanos primarios exfoliados.
TGF.	Factor de crecimiento transformante.

2. RESUMEN

La regeneración del tejido cartilaginoso representa un reto clínico debido a la pobre actividad proliferativa y regenerativa de los condrocitos *in vivo*. Desde la primera descripción de las células madre en 1966, diversos estudios han demostrado que células madre mesenquimales pueden ser obtenidas de diferentes tejidos humanos, como médula ósea, cordón umbilical, placenta, etc., e incluso a partir de tejidos bucales como pulpa dental, papila apical, ligamento periodontal, mucosa oral, entre otros. En 2009 se aisló por primera vez a una población de células madre mesenquimales de encía con capacidad de formar colonias clonogénicas y de diferenciarse en múltiples linajes mesodérmicos *in vitro*.

La presente tesis tiene como objetivo principal obtener células madre mesenquimales de mucosa retromolar para su posterior inducción a linaje condrogénico, para tal efecto, se aislaron y cultivaron células de mucosa retromolar obtenidas de pacientes entre 15 y 30 años de edad por medio de la técnica de disgregación mecánica. Se realizó purificación celular con el anticuerpo CD44 mediante MACS con el objetivo de obtener una población homogénea de células madre mesenquimales. Para determinar la viabilidad y proliferación celular se realizaron ensayos con Live and Dead, DAPI, EDU, MTT y azul alamar en 3 tiempos (días 7, 14 y 21). Las muestras se mantuvieron durante 14 días con medio QN, posteriormente se realizaron tinciones con safranina O, azul alcian e inmunofluorescencia con marcador de superficie ACAN, quedando demostrada su capacidad de diferenciación hacia linaje condrogénico desde el día 7.

Abstract

The regeneration of cartilage tissue provides a clinical challenge due to poor proliferative and regenerative activity in vivo chondrocytes. Since the first description of stem cells in 1966, several studies have shown that mesenchymal stem cells can be obtained from several human tissues, such as bone marrow, umbilical cord, placenta, etc. and even from oral tissues as dental pulp, apical papilla, periodontal ligament, oral mucosa, among others. In 1966 it first time isolated a population of mesenchymal stem cells gum with clonogenic ability to form colonies and differentiate into multiple mesodermal lineages in vitro.

This thesis has as main objective to obtain mesenchymal stem cells from retromolar mucosa for subsequent induction into chondrogenic lineage, to this end, it was isolated and cultured cells from retromolar mucosa obtained from patients between 15 and 30 years old through the technique of mechanical disruption. Cell purification was performed with CD44 antibody using MACS in order to obtain an homogenous population of mesenchymal stem cells. To determine cell viability and proliferation assays, Live and Dead, DAPI, EDU, MTT and Alamar blue 3 times (days 7,14 and 21) were performed. Samples were kept during 14 days with medium QN, subsequently Safranin O staining, alcian blue and immunofluorescence with surface marker aggrecan were performed, being demonstrated their capacity for differentiation into chondrogenic lineage from day 7.

3. ANTECEDENTES.

La pérdida de tejido cartilaginoso debido a un traumatismo o relacionada con la edad y degeneración representa un reto clínico. Debido a la limitada vascularidad del cartílago, los condrocitos *in vivo* tienen una pobre actividad proliferativa y regenerativa Zapata *et al.*(2007); Snyder *et al.*(2014). Esta limitación a menudo conduce al desarrollo acelerado de la osteoartritis o defectos del fibrocartilago Baghaban *et al.*(2014); Stromps *et al.*(2014).

En las últimas dos décadas se han hecho algunos progresos en cuanto a la regeneración del cartílago degenerado, mismas que se han logrado utilizando técnicas quirúrgicas como desbridamiento, microfracturas, injerto pericondral e injerto de periostio. Más recientemente, la investigación se ha centrado en el uso de implantes sintéticos para la regeneración del cartílago. Sin embargo, aproximadamente el 20% de los implantes sintéticos tienden a fallar una década después de la implantación Snyder *et al.*(2014).

El trasplante autólogo de condrocitos (ACT) fue la primera técnica de ingeniería de tejidos para su aplicación en la práctica clínica diaria, realizada por Brittbergetal en 1994. Ésta técnica consta de tres pasos principales incluyendo el aislamiento de condrocitos del tejido cartilaginoso sano, el cultivo de condrocitos o la expansión *in vitro* durante 2 a 3 semanas, y la reinyección de los condrocitos en el cartílago lesionado cubierto con un colgajo perióstico Boeuf *et al.*(2010); Stromps *et al.*(2014).

Desde la primera descripción de las células madre en 1966 por Friedenstein et al, la ingeniería tisular representa una nueva línea de investigación, que asiste y acelera el proceso de regeneración y reparación de los tejidos dañados con base en la potencia innata que posee cada individuo en su reparación Stromps *et al.*(2014). Diversos estudios han demostrado que células madres mesenquimales pueden ser obtenidas a partir de diferentes tejidos humanos, tales como: médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, placenta y piel, e incluso a partir de tejidos de la cavidad bucal como pulpa dental, dientes primarios exfoliados (*SHED*, del inglés stem cells from human exfoliated deciduous teeth), dientes de primera dentición con raíz completa, papila apical, ligamento periodontal, dientes supernumerarios, germen dental, folículo dental y mucosa oral Krishnan *et al.*(2010); Wu *et al.*(2014). Zhang *et al* aislaron por primera vez a una población de células madre mesenquimales de encía (GMSC, del inglés Gingiva Mesenchymal Stem Cells) que forman colonias clonogénicas, y poseen la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes mesodérmicos in vitro. Estas células presentarían un gran potencial de proliferación, lo que permitiría una reparación de alta calidad, regenerando las estructuras perdidas en cuanto a función y arquitectura, devolviendo la integridad a todos los tejidos dañados Boeuf *et al.*(2010); Yang *et al.*(2013); y en el caso de linaje condrogénico específicamente resultaría de gran ayuda en el tratamiento de diversas patologías como trastornos temporomandibulares, efectos secundarios por artritis y defectos cartilagosos en articulaciones Baghaban *et al.*(2014); Ude *et al.*(2014).

Este nuevo campo ha crecido continuamente, pero a pesar de algunos logros, el uso clínico de células madre parece estar limitada para el futuro próximo Ude *et al.*(2014).

El objetivo principal de la ingeniería de tejidos es buscar la aplicación de los principios de la ingeniería y de las ciencias biológicas en el desarrollo de sustitutos que restauren, mantengan o mejoren las funciones de un tejido específico. En los últimos años, los estudios se han centrado en la posible aplicación de las células madre en conjunto con la ingeniería de tejidos para reparar y regenerar estructuras del cuerpo. Esta nueva idea de la terapia, conocida como la medicina regenerativa, puede estar lista para las aplicaciones clínicas en el futuro Ude *et al.*(2014).

Cohnheim fue el primer científico que sugirió la presencia de células madre mesenquimales en el tejido de la médula ósea en estudios experimentales en conejos Baghaban *et al.*(2014).

La medicina regenerativa inicia en 1961 en Toronto con el descubrimiento de las células troncales por Till y Mc Culloch. Años después, científicos descubrieron que las células de la médula ósea son capaces de producir cartílago y tejido óseo *in vivo*, pero no determinaron las células responsables de esta propiedad. A principios de los años 70 Edwards y Steptoe en Inglaterra fecundaron óvulos humanos *in vitro* por espermatozoides. En 1966 las células madre mesenquimales de médula ósea fueron identificadas por Friedenstein *et al*, quienes fueron los

primeros en aislar y describir una población de fibroblastos con características de diferenciación condrogénica y osteogénica Baghaban *et al.*(2014).

Las células madre son células indiferenciadas capaces de multiplicarse y diferenciarse en cualquier tipo de células. Hay dos tipos de células madres, las embrionarias y las posnatales, las primeras son obtenidas a partir del embrión al momento de su fase de mórula y pueden diferenciarse en cualquier tipo de células y las segundas solo pueden diferenciarse en cualquier tejido proveniente de la capa embrionaria de la que se obtengan Jaime *et al.* (2007). Las células madre se pueden clasificar por su potencial de diferenciación en:

- a) Totipotentes: son células procedentes de las primeras divisiones después de la fertilización del óvulo (estadio de mórula) pueden dar origen tanto a tipos embrionarios como extraembrionarios.
- b) Pluripotentes: células derivadas de blastocisto embrionario, que pueden dar lugar, tras su diferenciación, a células de las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo).
- c) Multipotentes: sólo pueden producir un determinado tipo de linaje, próximo a ellas (por ejemplo, las células troncales neurales pueden diferenciarse solo hacia neuronas y glía).
- d) Oligopotentes: son aquellas que dan lugar a dos o más tipos celulares de un tejido.

e) Unipotentes: células que solo pueden producir un tipo celular, aunque sí tienen la capacidad de auto renovación Ramos *et al.*(2008).

Las células madre mesenquimales poseen dos propiedades importantes: la capacidad de autorenovarse a largo plazo y la capacidad de diferenciarse en linajes celulares como células de hueso, cartílago y tejido adiposo Jesús *et al.*(2011).

Zhang *et al.* en 2009 aislaron por primera vez a una población de GMSC, las cuales formaron colonias clonogénicas, fueron sensibles a marcadores superficiales de células madre mesenquimales y poseen la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes mesodérmicos Egusa *et al.*(2012); Yang *et al.*(2013).

Además de su capacidad de autorenovación y formación de estructuras como tejido conectivo, las GMSC tienen propiedades regenerativas y poseen funciones inmunorreguladoras. También, tomando en cuenta el fácil acceso y la disponibilidad de la mucosa oral durante procedimientos dentales, el uso clínico de GMSC humanos para la regeneración y reparación de tejidos representa una opción terapéutica convincente Geetanjali *et al.*(2010).

Un estudio sugiere que las GMSC pueden ser superiores a las células madre mesenquimales de médula ósea para ciertas aplicaciones en ingeniería de tejidos. Las GMSC son fáciles de aislar, presentan uniformidad en capas, incluso proliferan más rápido que las células madre de médula ósea Yang *et al.*(2013).

Debido a su gran capacidad para la formación de colonias, capacidad proliferativa, presencia de epítomos en la superficie celular, potencial para diferenciación multilínea, las GMSC humanas poseen un gran potencial dentro de la medicina regenerativa y representan una alternativa factible en la diferenciación condrogénica y regeneración del cartílago Geetanjali *et al.*(2010).

Para sustentar esta investigación a continuación se integraron datos de estudios anteriores relacionados a este tema de distintos autores.

Hernández *et al.* en 2011 demostraron la capacidad de proliferación de las células madre mesenquimales, obtenidas a partir de tejido gingival humano en una matriz de quitosano, las células se obtuvieron de cultivo por explante del tejido conjuntivo gingival. Hernández observó células de morfología fibroblastoide a los 9 días y a los 15 días un 80% de confluencia celular. Realizó su caracterización inmunofenotípica; las células fueron 99% positivas a los marcadores CD73, CD90 y CD105, y menos del 3% fueron negativas a estos marcadores. También demostró la plasticidad de estas células al diferenciarlas a linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico. Esto lo comprobó por medio de pruebas, en el caso de adipogénico usó la tinción de histoquímica rojo oleoso, en el osteogénico fue rojo de alizarina para condrogénico utilizó safranina O.

Según Davies *et al.* en el 2010 las heridas en la mucosa oral exhiben una rápida curación con reducida cicatrización, gracias a las células madre de la lámina propia. Se observaron colonias aisladas y una rápida proliferación. La expresión de marcadores de células madre se analizó por medio de FACS y CD44, CD90,

CD105 y CD166 a los que fueron positivas; y negativas a CD34 y CD45, con lo que descartaron células hematopoyéticas o fibroblastos. Su multipotencialidad la demostraron por medio de su diferenciación condrogénica, osteogénica, adipogénica y neuronal. Así como Davies, Fournier *et al.* en 2010 obtuvieron células madre del tejido conectivo gingival, evaluaron unidades formadoras de colonias fibroblastoides y su expresión de marcadores de membrana para células madre mesenquimales, así como su capacidad de diferenciarse en varios linajes, al inducir depósitos de calcio y secretar colágeno sobre andamios de hidroxiapatita. Marynka-Kalmani *et al.* en el 2010 obtuvieron una población de células madre de la lámina propia de mucosa oral, sin importar la edad del donante del 40% al 60% de las células fueron positivas en la transcripción de Oct4 y SOX2 de células madre embrionarias. El 95% de las células obtenidas expresaron marcadores de superficie de células madre mesenquimales y del 60% al 80% expresaron marcadores de cresta neural. Las células fueron diferenciadas a linajes mesodérmicos (osteogénico, condrogénico y adipogénico).

Mitrano *et al.* en el 2010 aislaron una población de células madre mesenquimales a partir de tejido gingival humano, llegando al 80% de confluencia entre 14 y 21 días, lo que demostró su alta proliferación. Su caracterización inmunofenotípica fue positiva a los anticuerpos CD90, CD105, CD73, CD44 y CD13, lo que confirma que son células madre mesenquimales. Mitrano *et al.* diferenciaron las células obtenidas a linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico, comprobando su diferenciación con pruebas como rojo de alizarina para ver la presencia de

depósitos de calcio, safranina O para teñir condrocitos y rojo oleoso para detectar lípidos intracelulares.

Yang *et al.* en el 2013 realizaron una comparación de células madre mesenquimales a partir de tejido gingival y ligamento periodontal, en la cual observaron células a los 3 o 4 días, así como confluencia del 70% al 90% en células de tejido gingival a los 15 días y las células de ligamento periodontal al día 22, con lo que al igual que Mitrano comprobaron la alta proliferación de las células derivadas de tejido gingival. La formación de colonias de las células de tejido gingival es mayor en comparación de las colonias formadas por las células de ligamento periodontal, esto nos muestra su capacidad de autorenovación, al realizar su inmunocaracterización ambas células fueron positivas a marcadores como STRO-1, CD146, CD29, CD90, CD 105 y negativas a los anticuerpos CD45 que marca células hematopoyéticas y CD31 que marca células endoteliales. Tanto las células de tejido gingival como las de ligamento periodontal fueron capaces de diferenciarse a distintos linajes, pero las células de ligamento periodontal mostraron mayor capacidad de diferenciación.

La capacidad de autorenovación se basa en el total de colonias formadas, Zhang *et al.* en el 2012 mencionan que las GMSC forman un alto número de colonias, y tienen multipotencia de diferenciación al igual que las células madre mesenquimales de medula ósea y de tejido adiposo, que se diferencian en osteogénico, adipogénico y condrogénico. Las GMSC además de los tres linajes pueden diferenciarse a células endodérmicas, ectodérmicas y células neuronales.

Estas células son positivas a los marcadores CD73, CD90, CD105 y CD44 los cuales son marcadores de células madre mesenquimales y son negativas a marcadores endoteliales y hematopoyéticos como CD31, CD34 y CD45. Las células de tejido gingival expresan CD29, CD44, CD73 y CD90.

Krishnan *et al.* en el 2010 cultivaron y caracterizaron células epiteliales provenientes del limbo esclerocorneal y células de mucosa oral para su comparación con el tejido córneo y observaron en este estudio su similitud sin cambios significativos, realizaron pruebas de viabilidad celular por medio de azul tripan y comprobaron su caracterización por medio de marcadores epiteliales.

Padrón *et al.* en el 2012 concluyen que los fibroblastos son subpoblaciones celulares en forma de uso, de origen mesenquimal, y son el componente principal del tejido conectivo. Los fibroblastos gingivales median la reparación de los tejidos de manera más rápida y con bajo nivel de cicatrización, estas características están asociadas a su alta capacidad de replicación y actividad de la telomerasa. Estos fibroblastos son fuente principal de colágeno tipo I y III, fibronectina, glucosaminoglucanos, proelastina, factores de crecimiento y de la matriz extracelular, elementos que juegan en la regulación de los procesos homeostáticos y en la interacción celular. También responden a citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento, de esta manera controlan el balance entre la producción de matriz extracelular y degradación tisular. Nos dicen que algunos estudios en animales indican que el proceso de cicatrización en la mucosa bucal tiene mejores resultados que en la piel. Los fibroblastos gingivales

pueden ser purificados de diferentes tejidos y regiones de la cavidad bucal, como paladar, rebordes edéntulos, en erupción pasiva de terceros molares. En estas áreas podemos encontrar células progenitoras gingivales con morfología fibroblastoide con capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos.

Wang *et al.* en el 2012 aislaron y caracterizaron GMSC con capacidad de diferenciación multipotencial. Las células del tejido gingival humano, poseen inmunofenotipo homogéneo (CD34 -, CD45 -, CD29 +, CD105 +, CD90 + y STRO-1 +), las células se diferenciaron a los tres linajes (osteogénico, condrogénico y adipogénico) con lo que comprobaron su potencial de diferenciación. Examinaron la eficacia de estas células madre en la regeneración de tejido óseo; los GMSC se sembraron sobre gel de colágeno de tipo I, se implantaron en los defectos mandibulares, en ratas. Esto demostró que las GMSC podrían reparar las heridas mandibulares y defectos óseos, el análisis inmunohistoquímico del colágeno I y osteopontina lo confirma. Las células que obtuvieron Koji *et al.* 2010 de encía, pulpa dental y ligamento periodontal expresaron marcadores de células madre mesenquimales como CD44, CD90 y CD166. De las células gingivales y de pulpa dental obtuvieron fenotipos de condrocitos y adipocitos. Al diferenciarlas a osteogénico el 60% de las colonias de células gingivales y el 40% de las células de pulpa dental fueron positivas a tinción de rojo de alizarina.

Hsu *et al.* 2012, al igual que Wang y Otabe caracterizaron células gingivales para marcadores de superficie por citometría de flujo, así como las expresiones de los

genes de la cresta neural a través de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). También demostraron la capacidad de estas células de diferenciarse, tras la inducción a los linajes osteogénico, adipogénico, condrogénico, y la diferenciación neurogénica, a las cuales fueron positivas. En otro estudio Hsu *et al.* 2012 cultivó células madre mesenquimales de encía en una membrana de quitosano en la cual fueron diferenciadas con medio condrogénico y lo verificaron por medio de RT-PCR, expresando estas los genes correspondientes a condrogénesis.

Snyder *et al.* 2014 utilizaron células madre mesenquimales de médula ósea, las cuales contienen factores de crecimiento como factor de crecimiento transformante beta (TGF β , del inglés Transforming Growth Factor β) que promueve la condrogénesis, en un hidrogel de fibrina/ácido hialurónico para ver su potencial de reparar cartílago articular. Se verificó su capacidad condrogénica por medio de la expresión de genes colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), colágeno tipo 2 alfa 1 (COL2A1), SOX9 y ACAN por medio de PCR. Los cuatro genes fueron expresados, pero COL1A1 y SOX9 con más fuerza. Un indicador de condrogénesis es una disminución en COL1A1 y aumento en SOX9, ya que este estimula la producción de COL2A1 y ACAN. El fenotipo de las células lo verificaron con marcadores de superficie a los que fueron positivas como CD105, CD73 y CD90 y negativas a los CD45, CD34, CD14.

Stromps *et al.* 2014 mencionan que la diferenciación condrogénica se puede lograr dentro de los 21 y los 28 días, por la acción de diversos suplementos como suero fetal bovino, dexametasona, ascorbato-2-fosfato e Insulina y factores de crecimiento para el medio base, algunos son el TGF- β 1 y TGF- β 3, proteína morfogenética ósea tipo 4 (BMP4, del inglés Bone Morphogenetic Protein-4), SOX 9, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, del inglés basic Fibroblast Growth Factor), estos solos o combinados tienen un alto potencial condrogénico. Estudios informan que una baja tensión de oxígeno mejora la diferenciación condrogénica en presencia del medio de inducción, el 5% de oxígeno promueve la condrogénesis *in vitro*. Para detección de la diferenciación condrogénica se aplican métodos como inmunología, pruebas histológicas para la detección específica de matriz extracelular de condrocitos, expresión de proteínas como diferentes tipos de colágeno (COL I, II, IV, IX, X y XI), queratán sulfato y condroitin sulfato, PCR tiempo real, Western Blot. Pruebas basadas en la tinción de proteoglicanos ricos en sulfato, utilizando azul alcian, azul de toluidina o safranina O, estos son una alternativa a la inmunotinción para presencia de COL I, II y X.

Ude *et al.* 2014 aislaron, cultivaron y diferenciaron células de tejido adiposo y de medula ósea en condrocitos. Compararon su capacidad de diferenciación en el tratamiento de osteoartritis inducida quirúrgicamente en modelos de ovejas. En el pase 4 de sus cultivos realizaron prueba de viabilidad por azul tripan y realizaron su diferenciación a los tres linajes de origen mesodérmico para evaluar su multipotencialidad. Utilizaron RT-PC para la verificación de la condroinducción por medio de la expresión de 4 genes: colágeno tipo II, ACAN, SOX9 y colágeno tipo I.

En ambas células la expresión de los genes fue alta en el caso de COL II, ACAN y SOX 9, pero no en COL I. También utilizaron azul de toluidina para teñir los proteoglucanos de las células diferenciadas a condrocitos y safranina O para teñir el cartílago regenerado.

Según Baghaban *et al.* 2014 el fibrocartílago es un tejido mal organizado que contiene colágeno tipo I, tiene características mecánicas y bioquímicas inferiores en comparación a la del cartílago hialino. El Factor de Crecimiento Transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) es el inductor más importante, este actúa mediante la inducción de la expresión de ACAN y colágeno tipo II, IX y XI durante la diferenciación condrogénica. La adición de proteínas morfogenéticas óseas realza la condrogénesis en las condiciones específicas empleadas por Steinert *et al.*: Insulina-factor de crecimiento-1 ha demostrado que tiene un efecto sinérgico en TGF- $\beta 1$ en promover la condrogénesis, el Factor de crecimiento fibroblastoide-2 (FGF-2) posee una función condrogénica. Se ha demostrado que FGF-2, en combinación con dexametasona mejora la producción de COLII, glucosaminoglucanos (GAG) y ACAN. El plasma rico en plaquetas posee efectos condrogénicos debido a la presencia de FGF-2 y TGF- $\beta 2$.

Wu *et al.* 2014 aislaron GMSC de tejido conectivo de encía, las cuales llegaron a confluencia a las dos semanas y se les realizó el primer pase celular. Midieron su capacidad de autorenovación por sus unidades formadoras de colonias. La expresión de marcadores de células madre mesenquimales fue examinada por citometría de flujo con anticuerpos STRO-1, CD73, CD90 y CD105, a los que

fueron positivas y mostrando una baja expresión de STRO-1. La inducción osteogénica, adipogénica y neurogénica se determinó por PCR.

Células de encía fueron aisladas por medio de cultivo por explante del tejido, al proliferar estas células realizaron un conteo con azul tripan, las células mostraron mineralizaron al ser expuestas a β -glicerolfosfato, expresaron fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina Kamata *et al.*(2004).

Dado que se pretende obtener células madre mesenquimales a partir de la mucosa oral, es necesario conocer sus características microscópicas con el fin de identificar sus componentes histológicos.

HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA BUCAL.

La mucosa bucal está integrada por dos capas de tejidos estructural y embriológicamente diferentes:

- Epitelio: constituido por tejido epitelial, de origen ectodérmico.
- Corion: constituido de tejido conectivo, de origen ectomesenquimal (derivado de las células de la cresta neural) y denominada también lámina propia.

Ambas capas están conectadas por la membrana basal. Esta suele ser ondulada, ya que el tejido conectivo emite prolongaciones, hacia el epitelio, denominadas papilas coriales o conectivas; y a su vez, el epitelio se proyecta hacia la lámina

propia en forma de evaginaciones que se interdigitan con las papilas coriales y se denominan crestas epiteliales. Estas ayudan a la nutrición del epitelio.

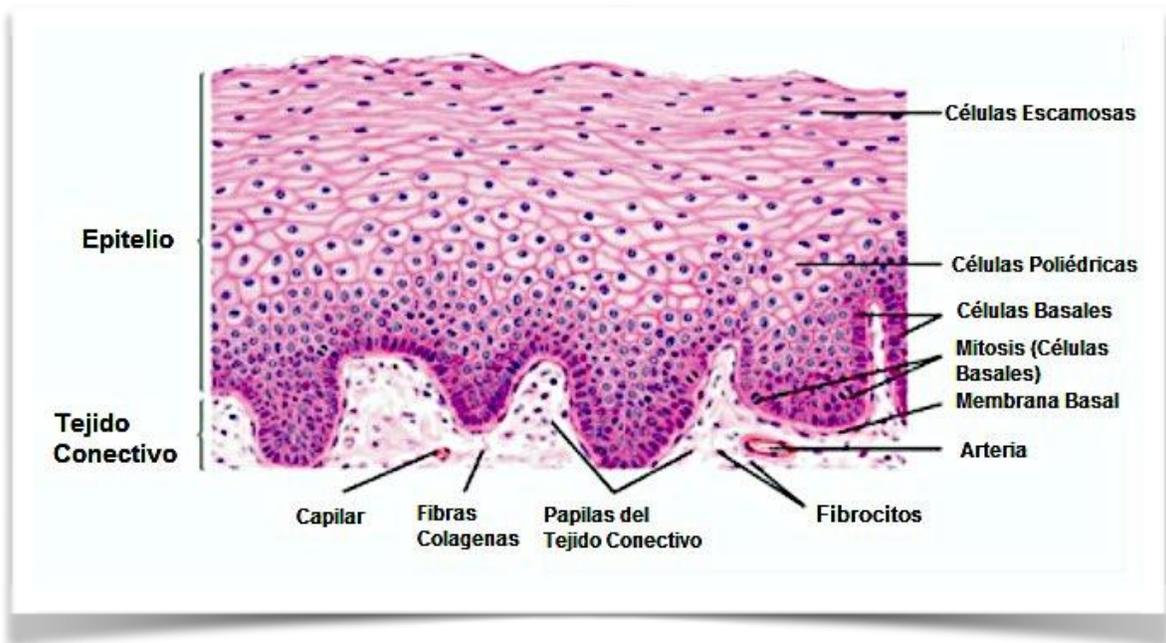


Figura 1. Mucosa Bucal. Tomado de Gómez de Ferraris *et al.* 2010

EPITELIO.

Los queratinocitos son las células predominantes en el epitelio de la mucosa gingival. En los epitelios queratinizados, estas células están organizadas en cuatro distintas capas. Inmediatamente por arriba de la lámina propia está la capa de células basales. Éstas células tienen un aspecto cuboidal con un núcleo oval. La segunda capa o estrato espinoso está compuesto por cuatro o cinco capas de células, las cuales poseen una forma poligonal y están unidas unas con otras por puentes intercelulares llamados desmosomas. Las capas superficiales del estrato

espinoso contienen células que comienzan a aplanarse, mientras que las células del estrato granuloso contienen gránulos irregulares de queratohialina. La cuarta capa es la más superficial de todas, se denomina estrato córneo. Las células queratinizadas representan la etapa final del proceso de diferenciación.

Además de los queratinocitos existen otras células como los melanocitos, que son células dendríticas altamente especializadas originadas de la cresta neural y cuya función es la síntesis del pigmento llamado melanina; las células de Langerhans las cuales tienen la función de procesar antígenos y actuar de manera local como parte del sistema inmunológico; y las células de Merkel, localizadas en la capa basal del epitelio gingival, están asociadas con axones desmielinizados y funcionan como un receptor táctil intraepitelial.

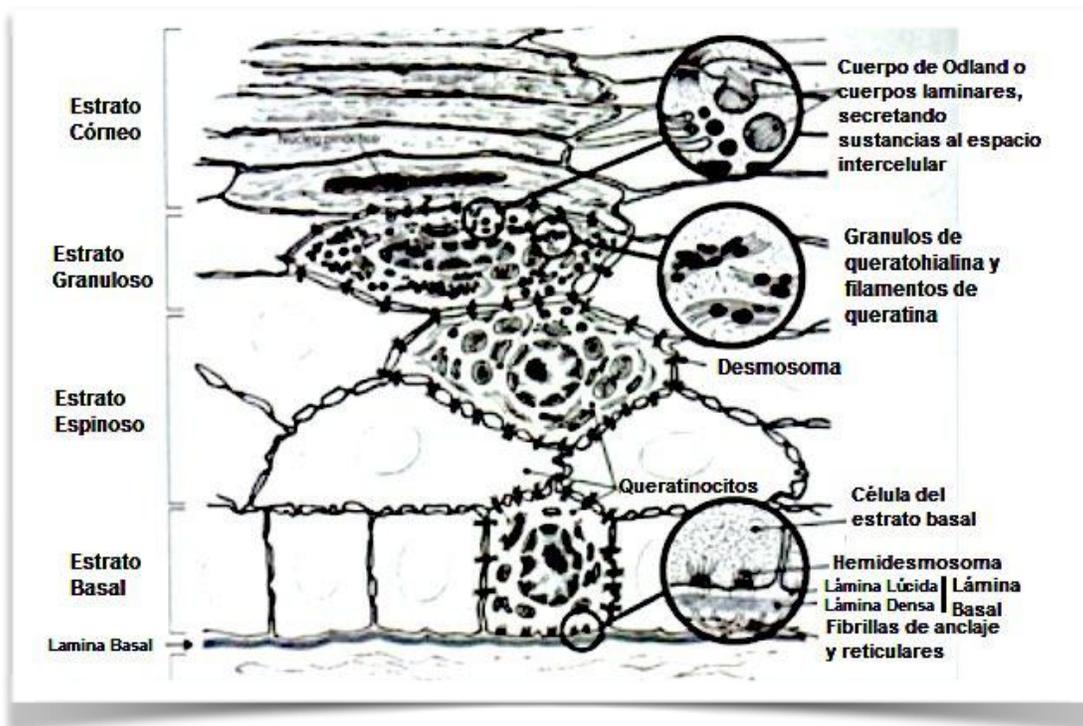


Figura 2. Diferenciación celular en un epitelio estratificado plano queratinizado. Tomado de Gómez de Ferraris *et al.* 2010

También se encuentra una población transitoria compuesta por leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y monocitos, asociada principalmente a procesos inflamatorios Avery (2002).

MEMBRANA BASAL.

La unión entre epitelio y tejido conjuntivo, se realiza a través de la membrana basal, la cual presta adhesión mecánica y cumple funciones como guía o armazón de las células epiteliales en proliferación durante el mecanismo de reparación o regeneración tisular. Dicha región consiste en una banda acelular homogénea y estrecha que se tiñe bien con tinciones específicas para detectar glucoproteínas.

La membrana basal está constituida por dos regiones: la lámina basal, la cual consta de dos estratos: la lámina densa y la lámina lúcida, ambas de un grosor de 50 μm ; y la lámina reticular: constituida por fibras inmersas en una matriz de glucosaminoglucanos que se tiñe con azul alcian. El espesor de esta lámina varía según el grado de fricción del epitelio suprayacente siendo más gruesa en los epitelios queratinizados.

Otras funciones incluyen: guía para la migración celular en la epitelización de heridas, funge como un filtro molecular físico (malla de colágeno tipo IV) y químico, además de que constituye una barrera de defensa del organismo. Capitán(2006); Gómez de Ferraris(2010).

LÁMINA PROPRIA O CORION.

Se trata de una capa de tejido conectivo inmediatamente por debajo del epitelio. La lámina propia de la mucosa masticatoria comprende la zona papilar y la zona reticular, así como densos fascículos de fibras de colágeno que soportan a la encía libre y la adherida. La encía carece de submucosa. Debido a que posee una función masticatoria, su tejido conectivo fibroso está organizado para soportar las fuerzas de la masticación.

Este tejido se origina a partir del mesénquima, que es un tejido conectivo embrionario proveniente del mesodermo y del ectodermo de la cresta neutral.

El epitelio es avascular, por lo tanto, sus necesidades metabólicas son cubiertas por los vasos sanguíneos de la lámina propia. La difusión de aminoácidos, péptidos, carbohidratos, lípidos, compuestos inorgánicos y sales que el epitelio requiere, se realiza desde los lechos capilares a través del tejido conectivo y membrana basal hasta él.

Además de los fibroblastos se pueden encontrar células endoteliales, pericitos, células de músculo liso y células de Schwann; también macrófagos, adipocitos, células cebadas, células plasmáticas, eosinófilos, células indiferenciadas, entre otras. Avery (2002).

En la lámina propia los vasos de origen arterial forman redes capilares subepiteliales en las papilas. Se ha descrito una red capilar subpapilar y asas capilares primarias, secundarias y terciarias en el eje conectivo de las papilas. A

nivel de la lámina propia existe inervación con terminaciones nerviosas sensoriales que recogen información sobre la percepción del dolor (nociceptores), la temperatura (termoreceptores), tacto y presión (mecanoreceptores).

Células del tejido conectivo.

Hay una variedad de células en el tejido conectivo que se diferencian según su origen y función; algunas células se diferencian a partir de células mesenquimales, tales como fibroblastos y adipocitos, estas se forman y desarrollan en el tejido conectivo, por lo que se les denomina células fijas. Otras células surgen de las células madre hematopoyéticas, se diferencian en la médula ósea y migran desde la circulación sanguínea al tejido conectivo; estos mastocitos, macrófagos, células plasmáticas y leucocitos se denominan células móviles y se encargan de la defensa y funciones inmunes.

Los **fibroblastos** son los encargados de producir las fibras y la sustancia fundamental, además de que poseen prolongaciones citoplasmáticas, un núcleo ovoide, aplanado y pequeño. Estos tienen una estrecha relación con los queratinocitos de la población epitelial suprayacente. La secreción de IL-1 del queratinocito activado estimula la proliferación y la actividad sintética del fibroblasto, y la secreción por parte de éste, entre otros productos, de KGF (factor

de crecimiento de los queratinocitos) y prostaglandinas (PGE) estimulan la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos.

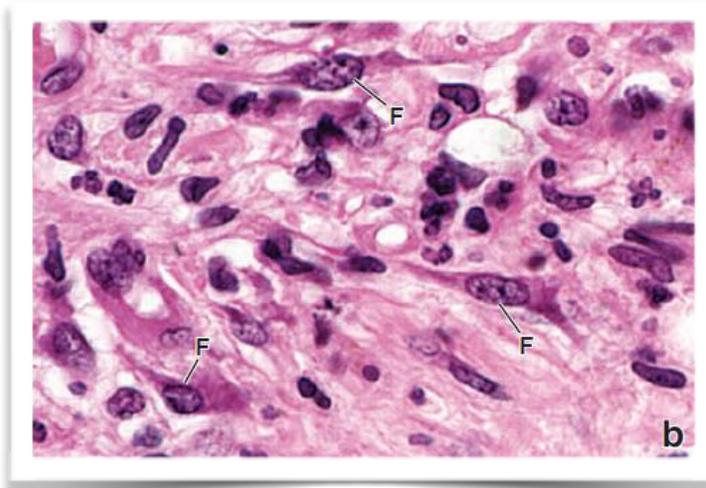
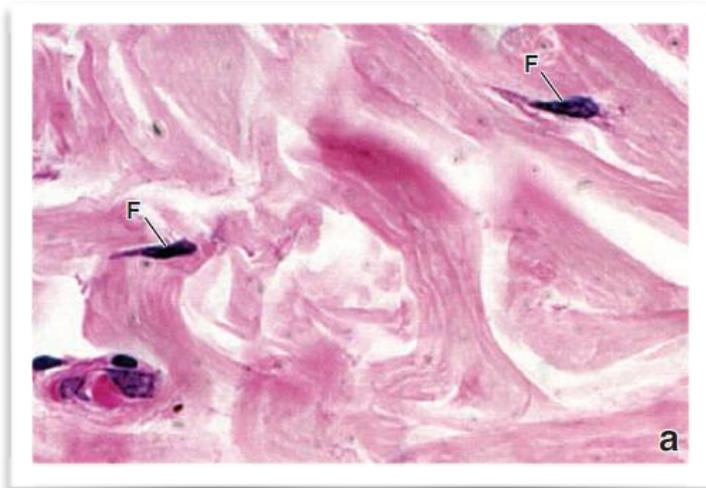


Figura 3. a. (F) Fibroblastos en tejido conectivo **b.** Tejido en reparación, (F)fibroblastos con citoplasma más basófilo. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

Fibras del tejido conectivo.

Las fibras que encontramos en el tejido conectivo son de tres tipos: de colágeno, las elásticas y las reticulares.

Fibras de Colágeno.

Las fibras de colágeno son las más abundantes en el tejido conectivo, son flexibles y poseen grandes fuerzas de tensión. Estas fibras se presentan en forma de bandas transversales separadas cada una. Las bandas es el reflejo de la disposición de las moléculas de colágeno que forman la fibrilla.

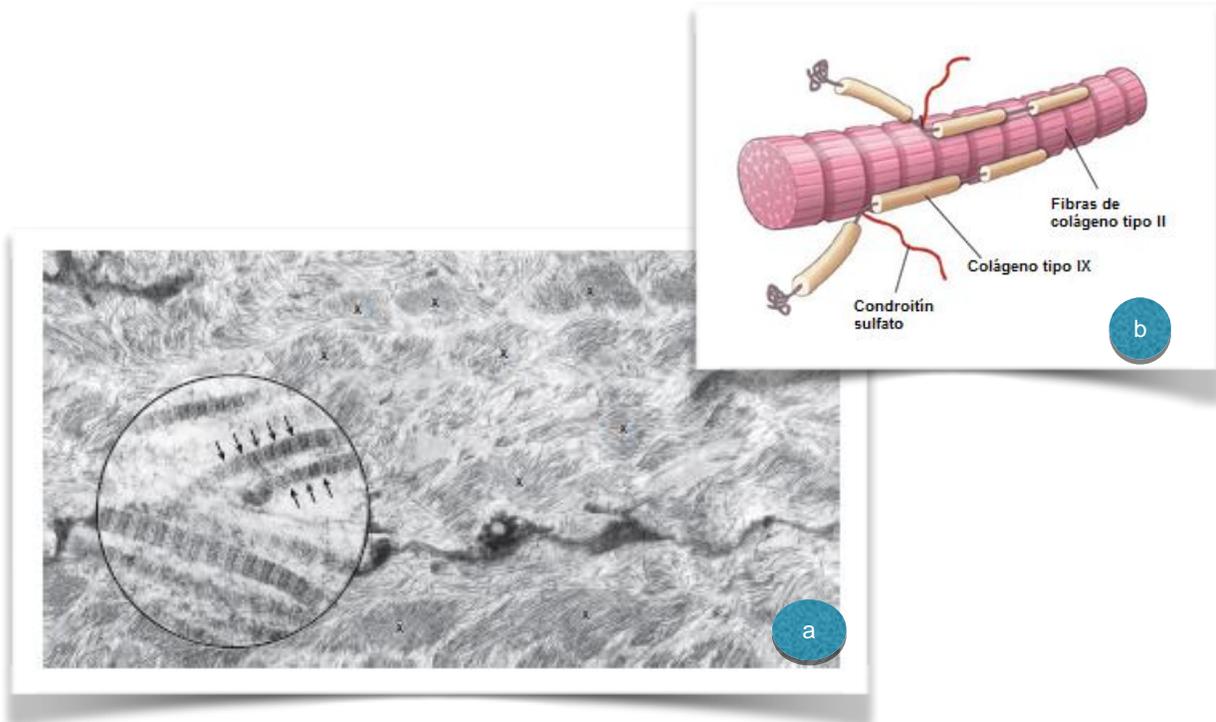


Figura 4. (a) Fibras de colágeno en tejido conectivo irregular. Las flechas marcan la separación de 68nm. (b) Fibra de colágeno tipo II. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

La molécula del colágeno se forma por tres cadenas polipeptídicas (cadenas alfa), que se organizan formando una triple hélice. No todas las cadenas alfa son iguales, por ello hay 15 tipos de moléculas de colágeno diferentes.

Las fibras de colágeno resisten las fuerzas de tracción y tensión y evitan deformaciones de la mucosa.

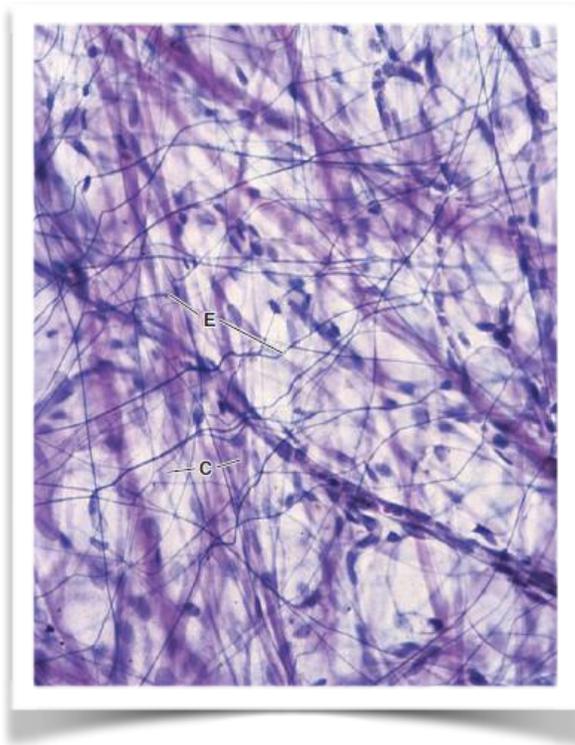


Figura 5. (C) Colágeno y (E) fibras elásticas. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

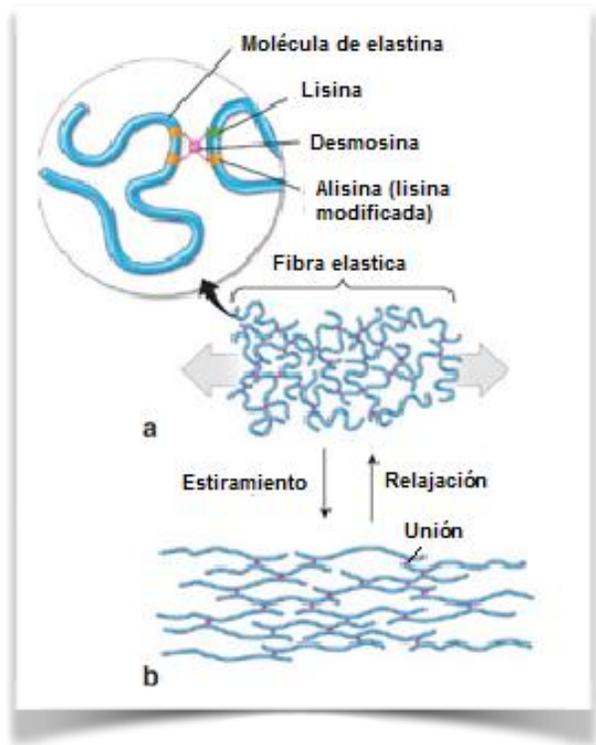


Figura 6. Diagrama de moléculas de elastina y su interacción. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

Fibras Elásticas.

Las fibras elásticas como su nombre lo dice, poseen propiedades elásticas, son más delgadas que las fibras de colágeno y se distribuyen en forma de redes. Están compuestas por elastina y microfibrillas.

Los aminoácidos hidrofóbicos no polares, la desmosina y la isodesmosina son los componentes principales de la elastina, en cambio las microfibrillas son ricas en aminoácidos hidrofóbicos y carecen de desmosina e isodesmosina.

Las fibras elásticas son las encargadas de devolver el tejido a la normalidad después que la tensión haya actuado sobre él.

La **elastina** es sintetizada por el fibroblasto y este sigue las mismas vías celulares de síntesis que el colágeno.

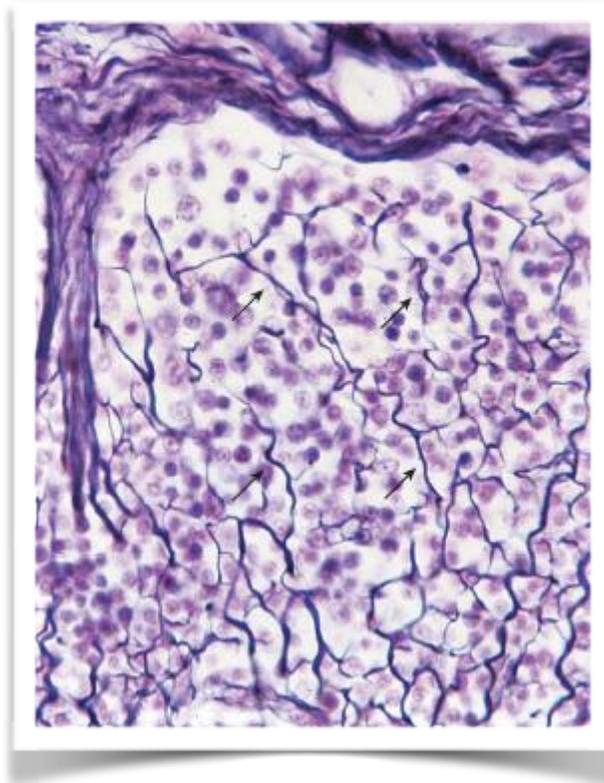


Figura 7. Fibras Reticulares señaladas por flechas. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

Fibras Reticulares.

Las fibras reticulares están formadas por fibrillas de colágeno con diámetro reducido y se encuentran dispersas en la matriz extracelular y contiene una mayor cantidad de glúcidos.

En el tejido conectivo laxo estas fibras reticulares se encuentran entre el tejido epitelial y conectivo, alrededor de los adipocitos, vasos sanguíneos de pequeño calibre y de nervios.

Sustancia fundamental.

La sustancia fundamental de este tejido rodea a las células y a las fibras. Es amorfa y está compuesta de proteoglicanos, glucosaminoglicanos y glucoproteínas. Los glucosaminoglicanos son los más abundantes de la sustancia fundamental o amorfa, están constituidos por largas cadenas de polisacáridos compuestas por disacáridos (n-acetilgalactosamina o n-acetilglucosamina) y un ácido urónico. Los proteoglicanos son moléculas compuestas por glucosaminoglicanos unidos de forma covalente a un núcleo proteico. Las glucoproteínas son moléculas multifuncionales que desempeñan un papel muy importante en la estabilización de la matriz extracelular y su unión con la superficie de las células del tejido conectivo puesto que poseen sitios de unión para una gran variedad de proteínas de la matriz extracelular.

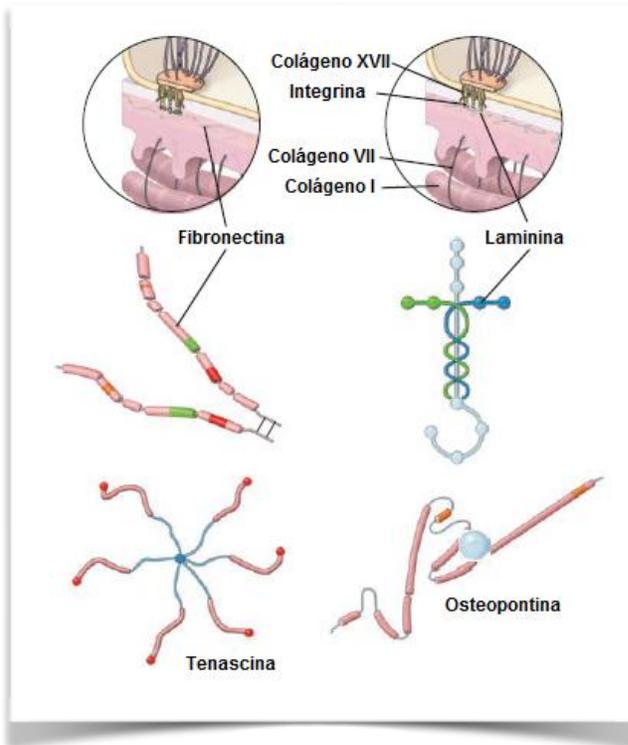


Figura 8. Glucoproteínas. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

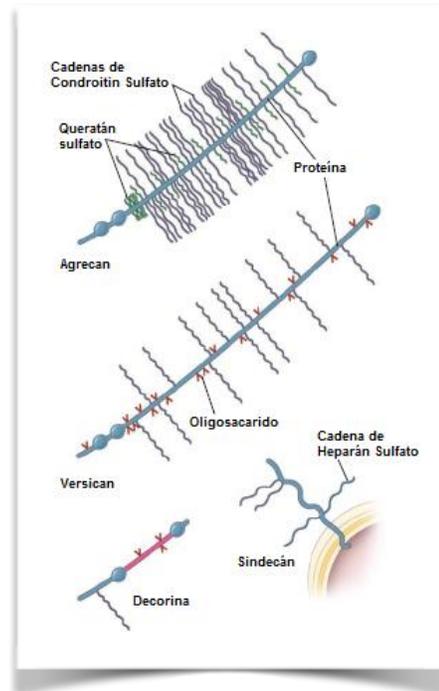


Figura 9. Monómeros de proteoglucano. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

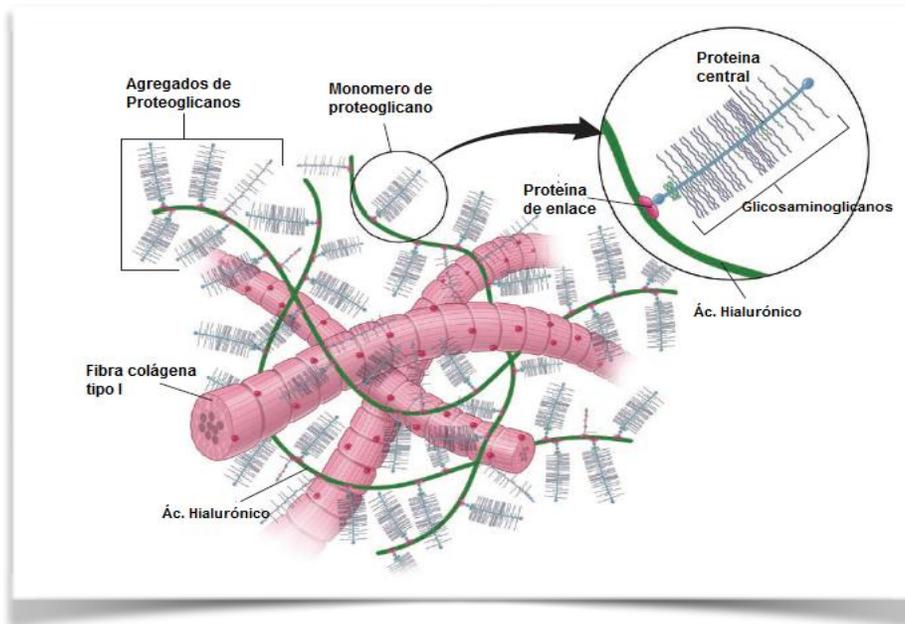


Figura 10. Estructura de proteoglucanos. Monómero de proteoglucano y su relación con la molécula de ácido hialurónico. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

MUCOSA RETROMOLAR.

La mucosa retromolar se clasifica dentro de mucosa masticatoria al igual que la mucosa gingival, por lo que está compuesta por un epitelio plano estratificado paraqueratinizado, nutrido por un corion de tejido conectivo, del cual se obtienen células madre mesenquimales. En la mucosa retromolar constituye una fuente de obtención de células madre mesenquimales debido a que se encuentra en constante reparación, en respuesta a las fuerzas de fricción ejercidas sobre ella y a la presión realizada por la función masticatoria, además de su fácil acceso y regeneración Davies *et al.*(2010); Gómez de Ferraris(2010) y Padrón *et al.*(2012).

CARTÍLAGO.

El desarrollo de esta tesis se fundamenta en la comprensión del **tejido cartilaginoso**, ya que se realizará la inducción de las células madre mesenquimales obtenidas de mucosa retromolar al linaje condrogénico, por lo que es necesario tener conocimientos de su histología.

El cartílago es una forma especializada de tejido conectivo constituido por condrocitos distribuidos en una matriz extracelular. Es un tejido avascular, resistente y en cierta medida flexible Zapata(2007).

En la formación del cartílago las células mesenquimales pierden sus prolongaciones agrupándose y formando acumulaciones celulares densas (centros de condricación), las células están tan cerca, que sus contornos no se distinguen.

Casi todos los cartílagos están rodeados por una membrana de tejido conjuntivo, el pericondrio, que posee una capa fibrosa compuesta por fibroblastos y fibras de colágeno. La capa condrógena está formada por condroblastos y células condrógenas. Estas últimas dan origen a los **condroblastos**, que al crecer y diferenciarse las células secretan una matriz metacromática amorfa y colágeno, cuando el material intersticial aumenta, la célula queda aislada en lagunas, adoptando las características de un condrocito maduro. El crecimiento de los centros de condricación es por dos mecanismos. El mesénquima que rodea al cartílago en desarrollo se condensa y forma el pericondrio. Las células de su parte interna que se denomina capa condrogénica, proliferan y se diferencian a **condrocitos**, los cuales secretan la matriz a su alrededor, y quedan incorporados en el cartílago, las células adoptan la forma de la laguna en la que se encuentran. Este mecanismo de adición celular y matriz en la superficie se llama crecimiento aposicional. El crecimiento intersticial es la expansión del cartílago por formación de células y matriz, esto es por lo que en el cartílago adulto se observan parejas y acumulaciones de cuatro o más lagunas. Cada una de estos grupos es isógeno y la matriz adyacente a estos grupos se tiñen fuertemente, este halo es basófilo y se denomina matriz territorial, mientras que las zonas entre los grupos celulares y que son menos basófilas se conocen como matriz interterritorial.

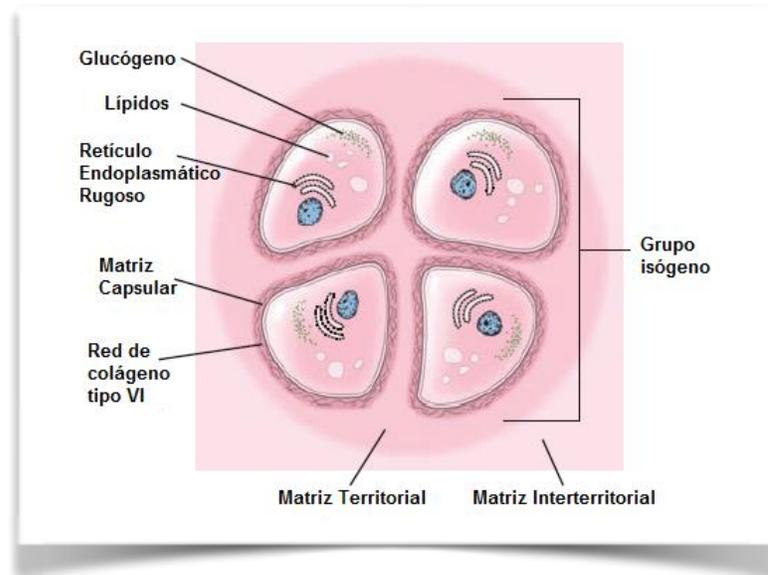


Figura 12. Diagrama de matriz de cartílago. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

CONDROBLASTOS.

Los condroblastos son condrocitos jóvenes, que se derivan de las células condrogénicas, y son capaces de fabricar de forma activa la matriz del cartílago. Ellos sintetizan y depositan matriz cartilaginosa alrededor de sí mismos. A medida que la matriz se acumula y separa los condroblastos el uno del otro, las células se ven atrapadas en pequeños compartimentos individuales llamados lagunas.

CONDROCITOS.

Los condrocitos son condroblastos maduros atrapados en lagunas. Por debajo del pericondrio las lagunas tienen una forma elíptica, con el eje longitudinal paralelo a la superficie, mientras que en las zonas más profundas del cartílago las lagunas son hemisféricas o anguladas. Las células adoptan la forma de la laguna en la que

se encuentran. El citoplasma de los condrocitos es de baja densidad y contiene lípidos y glucógeno. El complejo de Golgi yuxtannuclear está vacuolado, y las cisternas del retículo endoplásmico suelen estar distendidas. Las mitocondrias pueden estar distorsionadas.

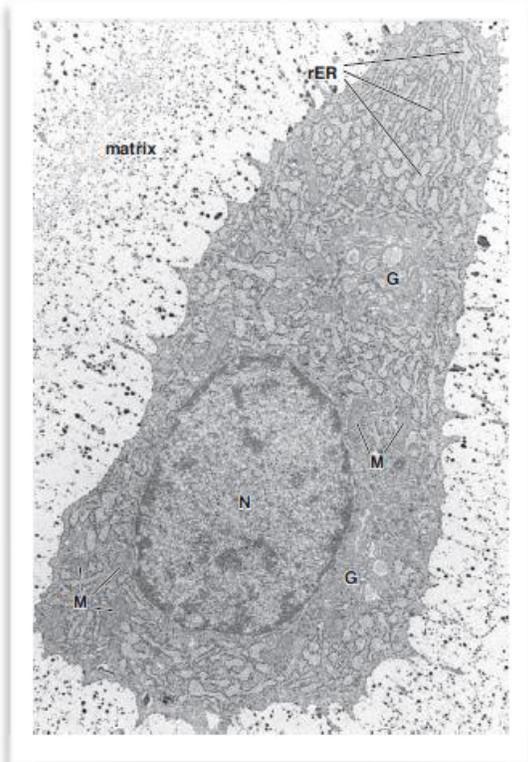


Figura 13. Condrocito. (N) Núcleo. (rER) Retículo endoplasmático rugoso. (G) Aparato de Golgi. (M) Mitocondria. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

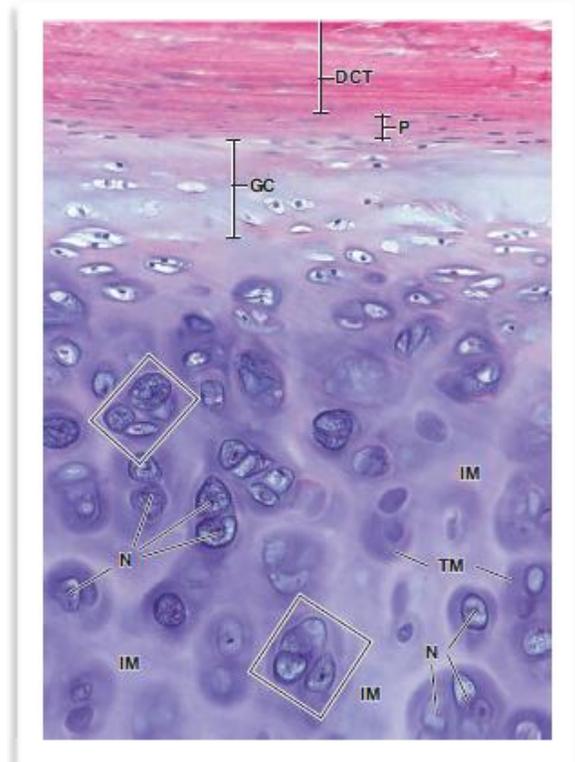


Figura 14. Cartílago hialino. (DCT) Tejido conectivo denso. (P) Pericondrio. (GC) Condroblastos y condrocitos inmaduros. (N) Condrocitos maduros. (TM) Matriz territorial. (IM) Matriz interterritorial. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

MATRIZ CARTILAGINOSA

El colágeno que predomina en la matriz cartilaginosa es el *colágeno tipo II*, las fibras de menor tamaño forman una trama tridimensional laxa en toda la matriz. En la matriz interterritorial hay un incremento en el diámetro de las fibras desde las

lagunas hasta la parte interna de las mismas. El cartílago también presenta *colágeno tipo IX, X y XI*. Los *colágenos tipo IX y XI* están asociados a las *fibras de tipo II* y el *tipo IX* está en las intersecciones de las *fibras tipo II*, se cree que contribuye a la estabilidad de la malla formada por las fibras de *colágeno tipo II*.

La matriz territorial ocupa una superficie variable en los distintos cartílagos.

La capa que rodea a las lagunas se conoce como capsula pericelular, esta protege a los condrocitos de los cartílagos sometidos a compresión y tensión mecánica, y está formada por una malla de fibras muy finas y de material amorfo parecido a la lámina basal.

La matriz cartilaginosa es similar a la sustancia fundamental de otros tejidos conjuntivos, aunque posee mayores concentraciones de *proteoglucanos* y aparece como un gel de consistencia firme. Las células producen *proteoglucanos*, los que son las moléculas de mayor tamaño. Están compuestos por una proteína central que irradia cadenas de *disacáridos* (glucosaminoglucanos). Los principales glucosaminoglucanos son el condroitin sulfato y el queratan sulfato. Una molécula de *proteoglucanos* tiene hasta 100 cadenas de condroitin sulfato y 50 de queratan sulfato. Esta molécula está unida por su cabeza globular a una molécula de *ácido hialurónico* por una proteína de enlace y las moléculas están separadas, formando agregados de *proteoglucanos*. Una molécula de *ácido hialurónico* puede tener adheridos hasta 100 *proteoglucanos*, por lo que los agregados pueden ser tan grandes que se quedan atrapados en las fibras de colágeno de la matriz.

El entramado fibrilar del colágeno mantiene la configuración del tejido y resiste las fuerzas de tensión, al tiempo que los agregados de *proteoglicanos* que ocupan sus intersticios proporcionan un gel hidratado y firme que absorbe las fuerzas de compresión. Se ha señalado que la capacidad que tiene el cartílago para resistir y recuperarse de las fuerzas de compresión se debe en gran parte a la disposición del agua alrededor de los *proteoglicanos*. Las cargas negativas de los grupos carboxilo y sulfato se aproximan y la fuerza de repulsión. Al desaparecer la presión, el agua retorna a las regiones con carga eléctrica de los *proteoglicanos* y se restablece el estado de hidratación normal de la matriz.

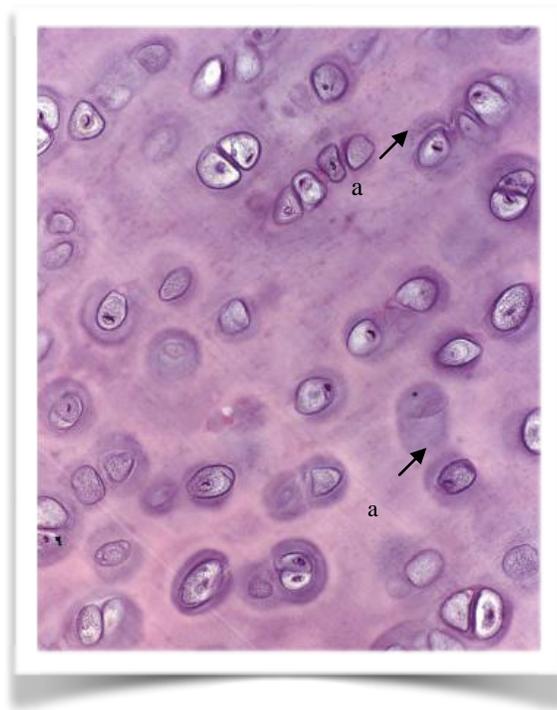


Figura 11. Estructura general de cartílago hialino. (a) condrocitos y abundante matriz extracelular. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

SECRECION DE LOS COMPONENTES DE LA MATRIZ

Los condrocitos secretan el colágeno y los proteoglicanos de la matriz condroide. La síntesis de proteína central y la adición de los oligosacáridos tienen lugar en los ribosomas del retículo endoplásmico. Después del transporte de los productos iniciales al aparato de Golgi, se añade condroitin sulfato y cadenas de glucosaminoglicanos, para el ensamblaje de los proteoglicanos, los cuales son introducidos en vesículas secretoras, que se desplazan a la superficie celular permitiendo la liberación de productos por exocitosis. El colágeno y los proteoglicanos son sintetizados al mismo tiempo e introducido en las vesículas para su exocitosis. La síntesis del ácido hialurónico y las proteínas de enlace se lleva a cabo por un mecanismo similar. Los proteoglicanos son secretados en forma de monómeros y se adhieren al ácido hialurónico en el medio extracelular, formando agregados de proteoglicanos. Los condrocitos sintetizan e incorporan a su superficie condronectina, una glucoproteína de tipo fibronectina que se une al *colágeno tipo II* y a los glucosaminoglicanos, su función es ayudar a la unión de estos componentes de la matriz a la superficie celular.

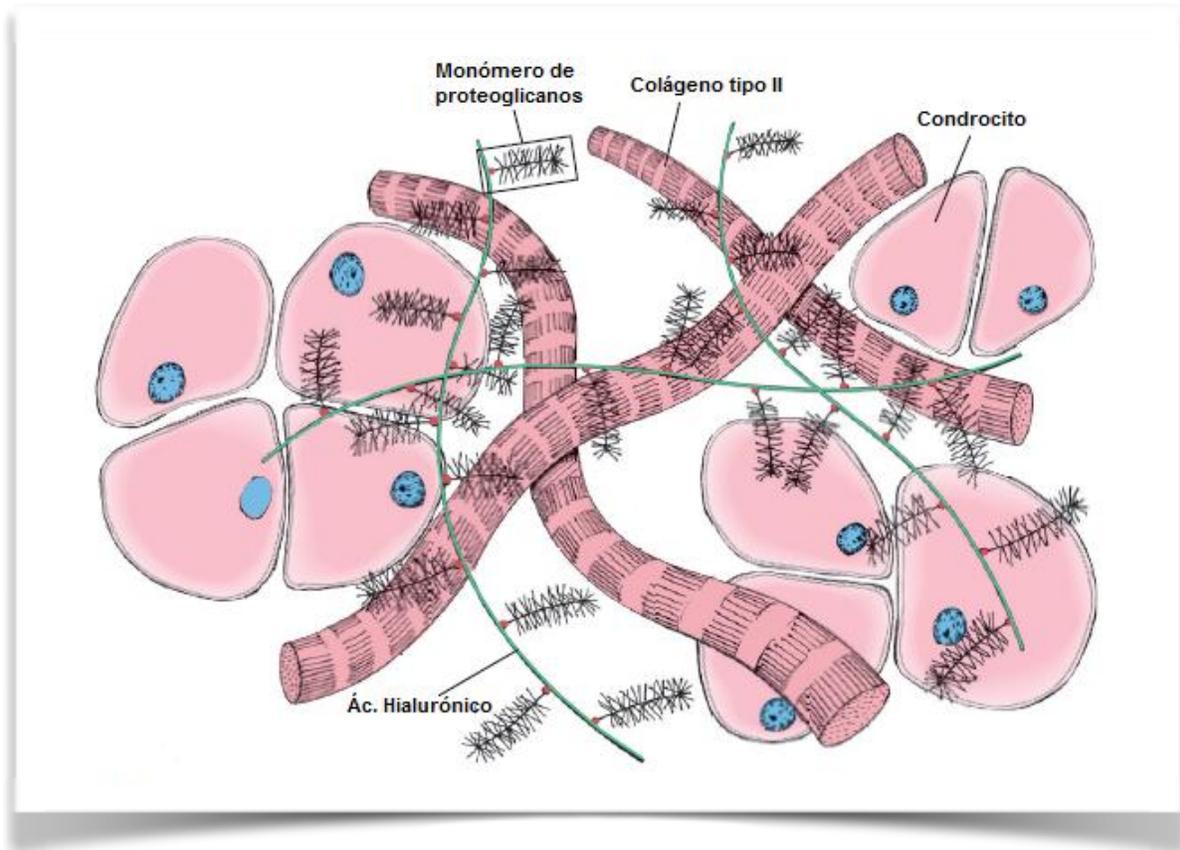


Figura 15. Estructura molecular de la matriz de cartílago hialino. Tomado de Ross MH *et al.* 2015.

El **tejido cartilaginoso hialino** está rodeado por un pericondrio. Las fibras colágenas de tipo II son mayoritariamente muy finas y, están bien enmascaradas por glucosaminoglucanos circundantes, lo que le da a la matriz un aspecto vítreo homogéneo.

El **tejido Cartilaginoso elástico** también tiene pericordio. La matriz, además de las fibras colágenas de tipo II, contiene fibras elásticas gruesas.

El **tejido cartilaginoso fibroso** carece de pericondrio. Los condrocitos son más pequeños y están orientados en hileras longitudinales paralelas. La matriz contiene una gran cantidad de haces gruesos de fibras colágenas tipo I entre las hileras de condrocitos Fawcett (2005), Gartner (2007), Ross (2005), Junqueira (2005).

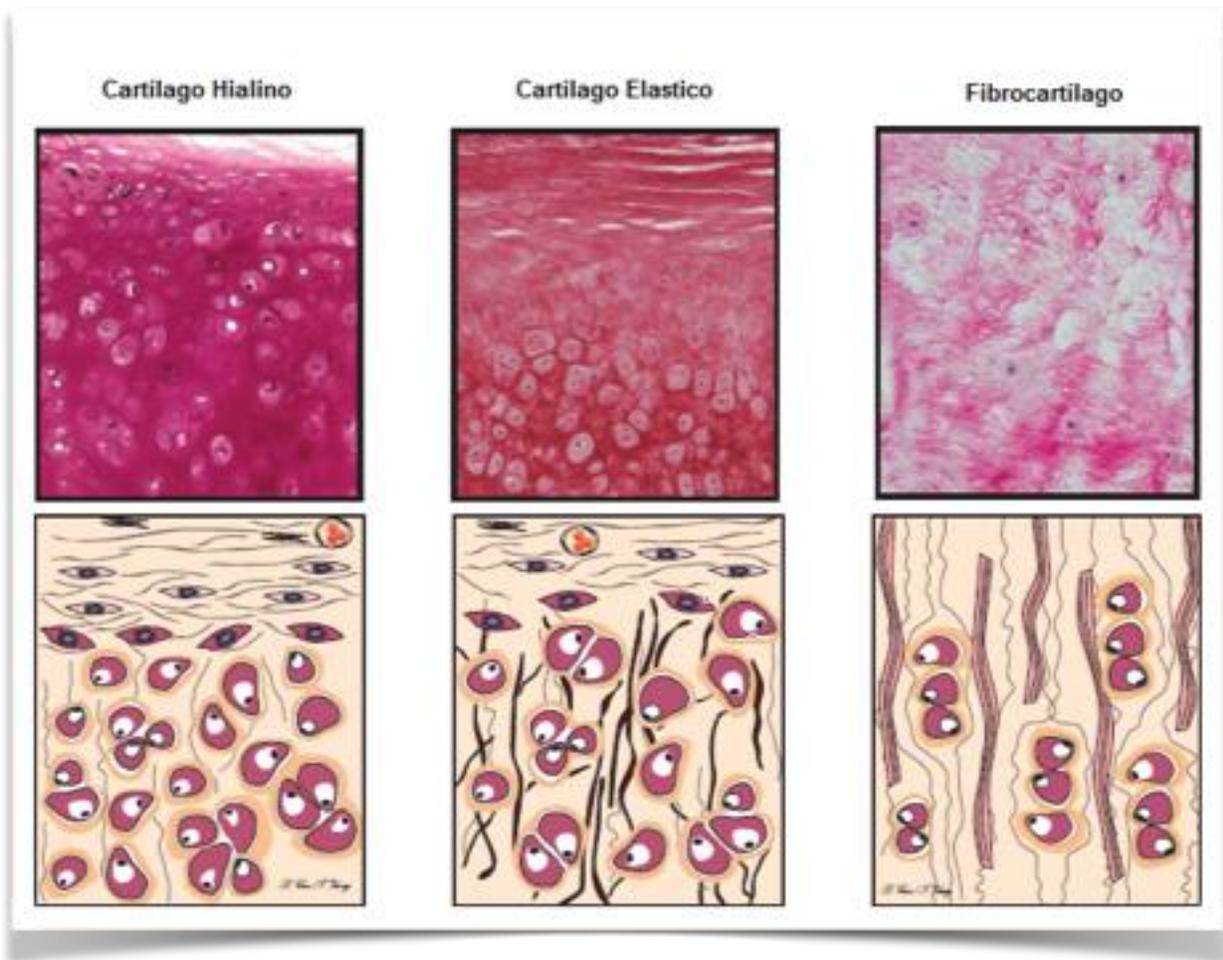


Figura 16. Fotos y esquemas de los diferentes tipos de cartílago.

4.1 **Objetivo general:**

- Obtener células madre mesenquimales a partir de tejido gingival de mucosa retromolar para su diferenciación hacia linaje condrogénico.

4.2 **Objetivos específicos:**

- Caracterizar células madre mesenquimales a partir de tejido obtenido de mucosa retromolar con marcadores específicos.
- Verificar la viabilidad de las células madre mesenquimales a partir de tejido obtenido de mucosa retromolar.
- Inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales obtenidas hacia linaje condrogénico.
- Determinar la diferenciación hacia linaje condrogénico de las células madre mesenquimales a través de tinciones especiales y marcadores de membrana.

5. HIPÓTESIS

A partir del tejido proveniente de mucosa oral y encía ha sido posible aislar e individualizar células madre mesenquimales para diferenciarlas en linajes celulares, demostrando así su capacidad multipotente para dar origen a linajes celulares como el adipogénico, el osteogénico y el condrogénico, por lo que se espera que a partir de la mucosa retromolar sea posible aislar e individualizar células madre mesenquimales con capacidad de diferenciación multipotente y así lograr su inducción hacia linaje condrogénico *in vitro*.

6. JUSTIFICACIÓN.

Diversos estudios han demostrado que las células madre mesenquimales pueden ser obtenidas a partir de diferentes tejidos humanos, tales como: médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, placenta y piel e incluso a partir de tejidos bucales como son: pulpa dental, SHED, dientes de primera dentición con raíz completa, papila apical, ligamento periodontal, dientes supernumerarios, germen dental, folículo dental y mucosa retromolar Wu *et al.*(2014), este último tiene como ventaja su fácil acceso, mínimas molestias y escasa respuesta inflamatoria en el posoperatorio; así como la posibilidad de obtener células madre mesenquimales Geetanjali *et al.* (2010); Hernández *et al.*(2011); Yang *et al.*(2013). La mucosa retromolar rutinariamente se obtiene durante procedimientos dentales generales, en la extracción del tercer molar y generalmente son tratadas como desechos biomédicos. Más importante aún, las investigaciones recientes revelaron que en tejidos hiperplásicos gingivales inflamados, hay una población de células madre similares que son funcionales como GMSC al igual que las obtenidas a partir de tejido gingival sano, que tienen gran potencial de proliferación y diferenciación hacia diversos tejidos Geetanjali *et al.*(2010), entre ellos el condrogénico, el cual es de gran utilidad, ya que el cartílago posee sólo una limitada capacidad para regenerarse. La aplicación de células madre mesenquimales en defectos de cartílago sería de beneficio en el tratamiento de trastornos temporomandibulares, alteraciones secundarias a un proceso de artritis y defectos cartilaginosos Zapata *et al.*(2007); Baghaban *et al.* (2014); Kalpakci *et al.*(2014).

8. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.

8.1 Obtención de la muestra

Las muestras de mucosa retromolar fueron tomadas de pacientes con un rango de 15-30 años de edad en las Clínicas Odontológicas Acatlán y Cuauhtepac de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Se realizó asepsia del instrumental que se utilizó, así como el material (gasas). La antisepsia se hizo por medio de un cepillado dental, enjuague con colutorio de clorhexidina al 0,02% por un minuto previo al procedimiento Krishnan *et al.*(2010); Hernández *et al.*(2011) y se colocaron barreras de protección haciendo antisepsia extraoral con jabón quirúrgico (Gamophen), el lavado de la zona cubrió un perímetro alrededor de los labios, mayor a 5 cm, posteriormente fue cubierta la zona con un campo hendido y se colocó una gasa estéril impregnada de clorhexidina en la zona donde se obtuvo la muestra Hernández *et al.*(2011).



Figura 16. Zona retromolar inferior (cojinete retromolar) de la cual se obtuvo la muestra.

Una vez con la zona estéril se realizó el bloqueo troncular, utilizando 1.8 ml de lidocaína con epinefrina al 2%, una jeringa carpulle y aguja larga. Se obtuvo la muestra de tejido de mucosa oral del cojinete retromolar y tuberosidad del maxilar al extraer terceros molares de pacientes de las Clínicas Odontológicas Acatlán y

Cuautepec de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala con una porción aproximada de 3 x 3 mm de espesor total Krishnan *et al.*(2010).

La muestra se depositó en un tubo de punta cónica de 15 ml con 3 ml de medio de transporte que contiene solución salina y antibiótico al 10% Penicilina 1000 U/ml /estreptomicina 1 mg/ml /anfotericina 2.5 mg/ml) (SIGMA ALDRICH) y fueron trasladadas al Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

8.2 Preparación de cultivo

La muestra se lavó 3 veces en tubos de 15 ml con 3 ml de medio de transporte y se dejó a una temperatura de 4°C durante 24 hrs en un nuevo medio de transporte el cual contiene solución salina y antibiótico al 10% (Penicilina 1000 U/ml /estreptomicina 1 mg/ml /anfotericina 2.5 mg/ml) (SIGMA ALDRICH).

Se preparó el área blanca y la campana de flujo laminar (Telstar BIO II ADVANCE).

A la muestra se le retiró el epitelio y el tejido conectivo restante se fragmentó con un tamaño menor a un milímetro cubico, usando un bisturí de hoja #15 sobre una caja petri.

Los explantes se cultivaron en cajas tipo falcon de 25 cm² (Nunc) con separación entre cada uno, se dejaron por un lapso de 5 a 8 minutos para comprobar su adhesión a la caja. Se adicionó 5 ml de medio de cultivo completo DMEM (BIO WEST), penicilina /estreptomicina /anfotericina (SIGMA ALDRICH) al 1% y suero

fetal bovino (BIO WEST) al 10%, para posteriormente incubarlos (BINDER) a 37°C y 5% de CO₂.

Se observó el crecimiento celular y se renovó el medio de cultivo cada 3 días hasta que se llegó a un 80% de confluencia celular Kamata *et al.*(2004); Mitrano *et al.*(2010); Hernández *et al.*(2011).

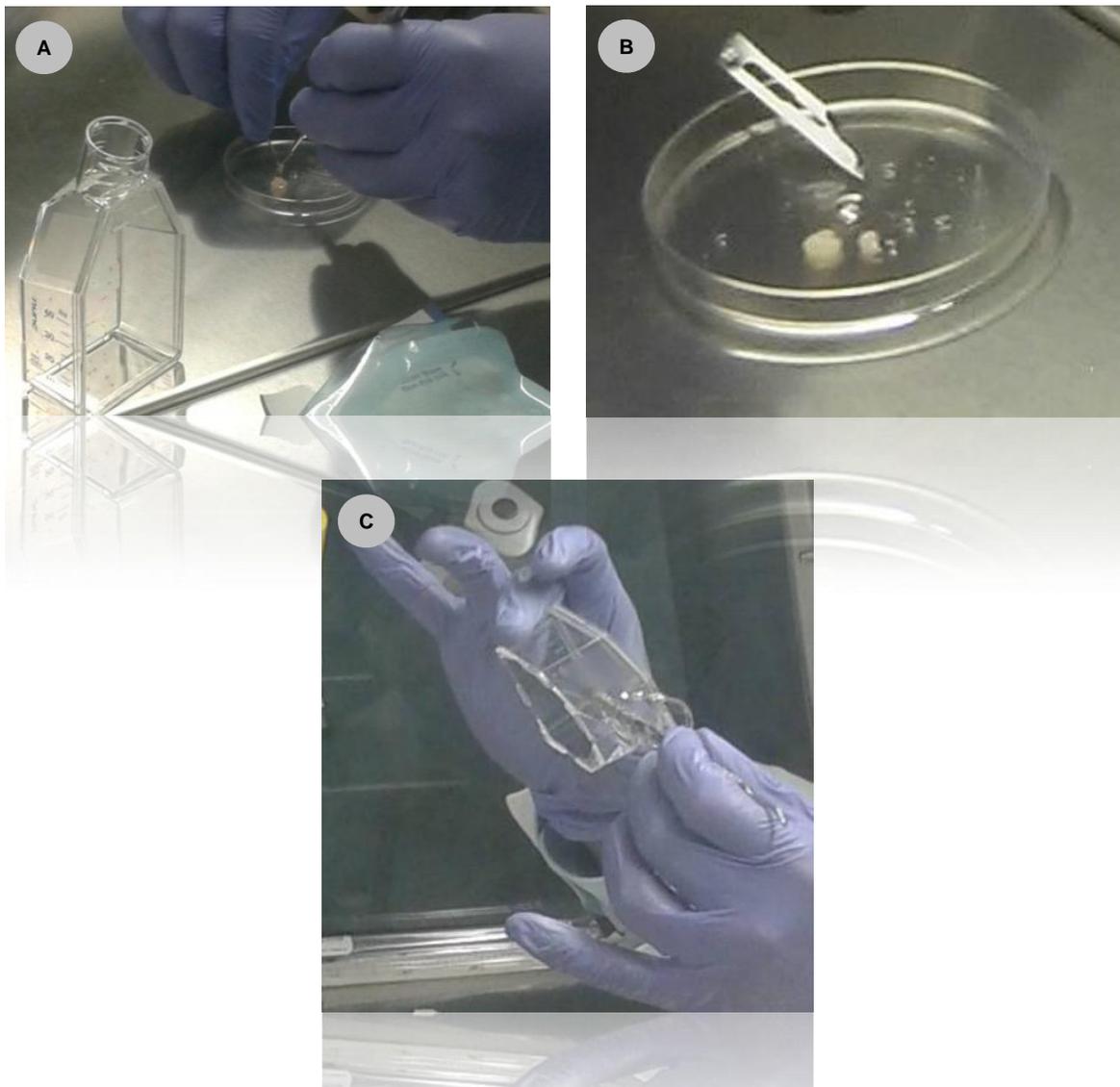


Figura 17. Cultivo por disgregación mecánica. (A) disgregación mecánica. (B) tejido disgregado. (C) colocación de explanes en caja falcon.

8.3 Método de cosecha celular.

Se retiró el medio de cultivo de la caja falcon, para lavar las células con 5 ml de PBS (Tampón fosfato salino). Y despegarlas de la caja con 3 ml de tryple express (GIBCO) para incubar por 4 minutos, una vez desprendidas se revisaron con el microscopio para comprobar la separación de estas. Se agregaron 3 ml de medio de cultivo completo DMEM (BIO-WEST), penicilina (1000 U/ml) /estreptomicina (1 mg/ml) /anfotericina B (2.5 mg/ml) y suero fetal bovino (BIO-WEST) al 10% para inactivar el tryple express, las células fueron colectadas en un tubo de 15 ml de punta cónica (KIMA) con ayuda de una pipeta de 5 ml, se centrifugó (SIGMA modelo 1-14) por 10 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente.

Se retiró el sobrenadante, se agregó 1 ml de medio de cultivo para resuspender el botón celular; se recolectó la sustancia celular y se colocó en cajas falcon de 75 cm², se observó en el microscopio para verificar su adhesión a la caja, posteriormente agregarle medio de cultivo completo DMEM (BIO-WEST), penicilina (1000 U/ml) /estreptomicina(1 mg/ml) /anfotericina B (2.5 mg/ml) (SIGMA) al 1% y suero fetal bovino al 10% (BIO-WEST), con el fin de que proliferen. Se incubó (BINDER) a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 3 días hasta que se obtuvo el 80% de confluencia celular, para así hacer el siguiente pase celular.

Se repitió el proceso del tryple express (GIBCO) y se cultivó, hasta llegar al pasaje 3.

A

B



C

D

Figura 18. Pase celular. (A) recolección de sustancia celular. (B) sustancia celular recolectada en tubo de 15 ml para centrifugar. (C) botón celular. (D) siembra celular.

8.4 Conteo celular.

Las células se cosecharon por el proceso de tryple express, al obtener el pellet se resuspendio en 2 ml de medio de cultivo, se tomaron 10 μ l de la sustancia celular y 10 μ l de azul tripan, se resuspendió y colocó 10 μ l en cámara neubauer para realizar el conteo celular y hacer la fórmula:

$$\frac{\# \text{ células x } 10\,000}{\# \text{ cuadros}} (2)$$

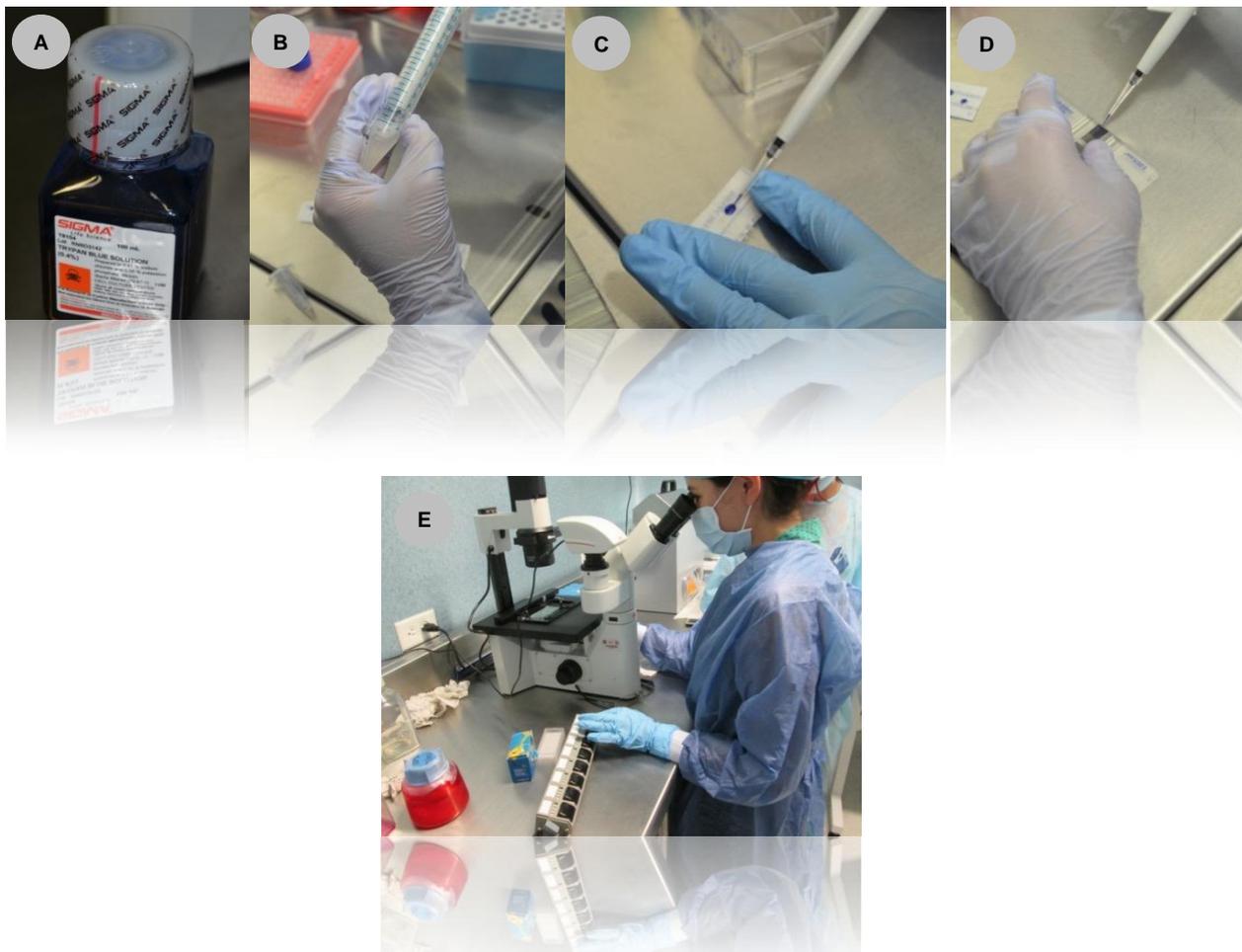


Figura 19. Procedimiento de conteo celular. (A) Azul tripan. (B) Sustancia celular. (C) Sustancia celular y Azul tripan se resuspenden. (D) Resuspendido colocado en cámara de Neubauer. (E) Conteo celular.

8.5 Clasificación de células por actividad magnética (Magnetic activated cell sorting MACS)

El principio de separación por MACS, consiste en que las células madre mesenquimales están magnéticamente etiquetadas con microperlas, por el anticuerpo CD44 a las que son positivas. La suspensión celular se carga en una columna MACS, colocada en el campo magnético. Las células CD44+ marcadas magnéticamente se retienen dentro de la columna, las células no marcadas pasan a través de esta. Después de retirar la columna del campo magnético, las células expulsadas con ayuda del embolo se pueden tomar como positivas.

El buffer de separación se preparó con:

PBS: 50 ml

BSA: 0.5% 25 mg

EDTA: 2 mM 38 mg

Tanto las células como el buffer se mantuvieron a una baja temperatura (2-8°C) para evitar obstruir las columnas.

Se separaron las células de la caja de cultivo, para centrifugarlas y obtener el botón celular (punto 8.3), al cual se le agregó 5 ml de buffer de separación y se determinó el número de células, posteriormente se centrifugo la suspensión celular por 10 minutos a 1000 rpm, se retiró el sobrenadante, para resuspenderlo en 80

μL de solución buffer, se incubo con 20 μl de CD44 durante 15 minutos en el refrigerador (2-8°C). Se lavaron las células con 1 o 2 ml de buffer y centrifugar a 1000 rpm por 10 min, en seguida se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 500 μl de buffer.

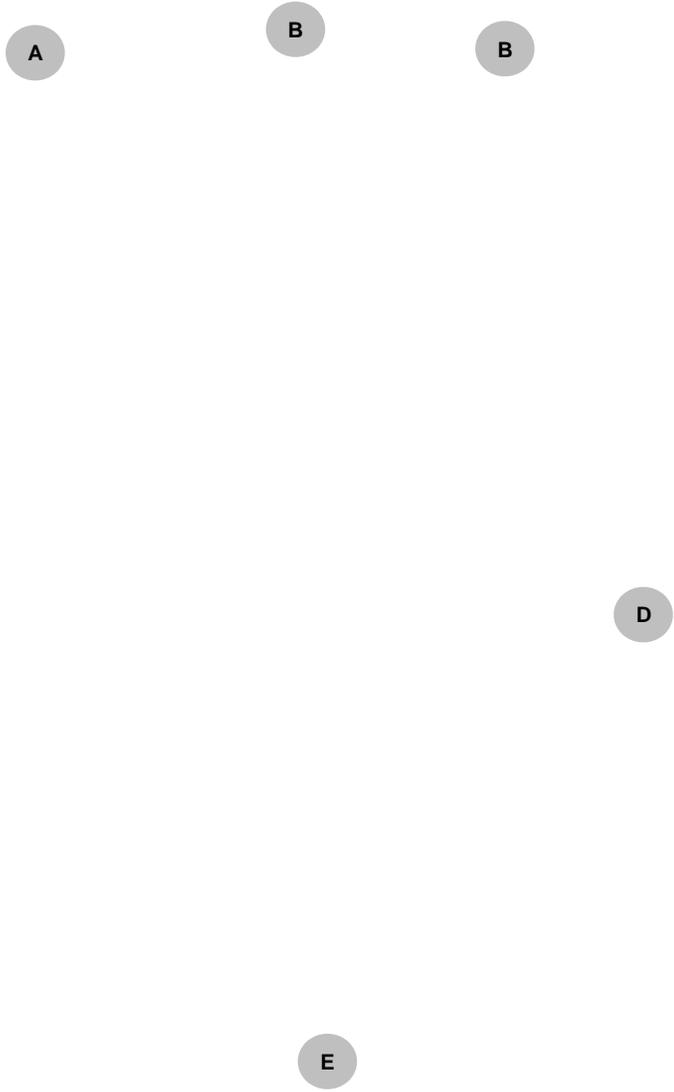


Figura 20. Tratamiento de células con CD44. (A) cosecha celular. (B) sustancia celular. (C) botón celular. (D) CD44. (E) aplicación de CD44 a sustancia celular.

Separación magnética:

Se utilizó una columna de tamaño mediano, se colocó la columna en el magneto y debajo de esta se colocó un tubo de 15 ml donde se depositaron las células negativas al CD44.

Se preparó la columna colocando 3 ml de buffer de 1 ml en mililitro sin dejar que se seque la columna, antes de que se acabe el último mililitro de buffer se comenzó a colocar la sustancia celular de poco en poco hasta terminar y por último se lavó con 3 ml de buffer para retirar las células que no sean positivas al anticuerpo CD44 de las paredes.

Al terminar de caer la última gota de la columna, esta se retiró y se le colocó de una sola intención el embolo para depositar las células CD44+ en un tubo de 15 ml.

Posteriormente se centrifugaron las células a 1000 rpm por 10 minutos, se retira el sobrenadante y se colocó 1 ml de medio de cultivo, para resuspender el pellet y posteriormente sembrar en una caja de 75 cm².

Dejamos pasar unos minutos para que haya adhesión a la caja y se colocó medio de cultivo e incubó a 37°C y CO₂ al 5 % hasta obtener el 80% de confluencia celular, para realizar los ensayos correspondientes.

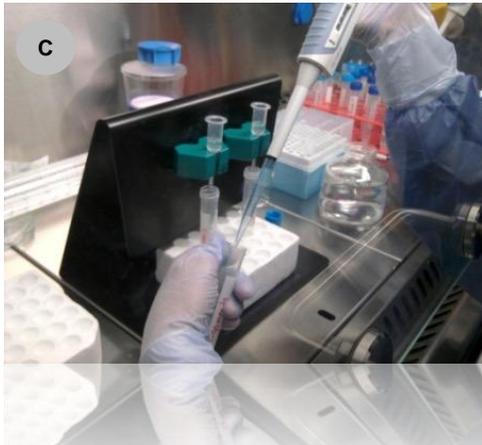
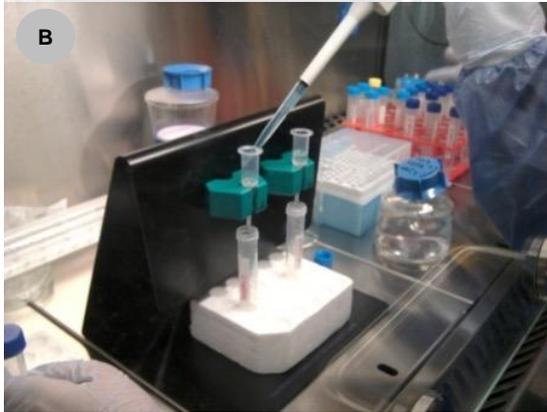


Figura 21. Separación magnética. (A) magnetos. (B) columnas tratadas con buffer de separación. (C) sustancia celular colocada en columna. (D) botón de células filtradas. (E) siembra de células filtradas.

8.6 Determinación de la viabilidad celular.

Se recolectaron las células CD44 con tryple express para realizar las pruebas de viabilidad, antes de estas pruebas se hizo un conteo celular por medio del azul tripan como se menciona en el punto 8.4.

Una vez sabiendo la cantidad de células se sembraron 10 000 células en cada pocillo. Se esperó a la adhesión celular y se colocó medio de cultivo DMEM. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos para las pruebas live and dead, dapi y edu, en el caso de MTT y AB se separaron en 2 y 3 muestras respectivamente en placas de 96 pocillos.

Las pruebas de viabilidad y proliferación se realizaron en 3 tiempos, día 7,14 y 21.

8.6.1 Pruebas de viabilidad por Fluorescencia.

8.6.1.1 LIVE AND DEAD (Vida y Muerte)

Para realizar esta prueba se retiró el medio de cultivo y se lavaron las muestras con PBS y se colocó una solución preparada con 997.5 µl de PBS (SIGMA), .5 µl de calceina (INVITROGEN) y 2 µl de homodimero de etidio-1 (INVITROGEN), para un total de 1000 µl. Se incubaron las muestras por 30 minutos a temperatura ambiente resguardadas de la luz, para después observar las células en un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 528 Nm a 617 Nm en el cual veremos las células vivas de color verde (calceina) que nos indica actividad esterase e integridad de la membrana plasmática y las muertas de color rojo (etidio) que indica pérdida de integridad de la membrana plasmática.

8.6.1.2 DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindoldihidrocloruro).

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

El DAPI también tiñe granos de polen maduros, es útil en la detección de micoplasmas (bacterias y hongos) y en la detección de células apoptóticas.

Para realizar esta prueba se retiró el medio de cultivo DMEM de los pocillos a observar, lavamos con PBS y colocamos una solución de 2 µl de DAPI preparada al 20% y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se observó en un microscopio de fluorescencia a una onda de longitud de 488 Nm a 500 Nm.

8.6.2 Pruebas de viabilidad por Absorbancia.

8.6.2.1 MTT

El 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) mide la actividad mitocondrial de las células viables mediante la cuantificación de la conversión de la sal de tetrazolio a formazán.

La conversión de la sal de tetrazolio amarilla, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a su producto de formazán púrpura es una indicación de la

actividad mitocondrial Mosmann(1983). Este ensayo nos ayuda a cuantificar la viabilidad celular por medio de espectrofotometría midiendo la capacidad de las células vivas para reducir el reactivo MTT.

Las células fueron lavadas con PBS después de haber retirado el medio de cultivo y se colocó el MTT preparado con 64 μ l de DMEM sin rojo fenol y 6 μ l de MTT, incubando por 3 horas. Después de la incubación de las células con el reactivo MTT, se añade 100 μ l de isopropanol (tampón de lisis) para disolver el producto de formazán púrpura insoluble y producir una solución de color. Al día siguiente la cantidad de MTT (170 μ l) se separó en dos muestras (pocillos) en una placa de 96 pocillos, 85 μ l en cada pocillo utilizando una punta diferente para no alterar el volumen. La absorbancia relativa se correlaciona directamente con el número de células, es decir, el color más púrpura indica más células viables. Estas muestras se leyeron en un lector de placas a una longitud de onda de 540 Nm Aras *et al.*(2008); Erich *et al.*(2000).

8.6.2.2 AZUL ALAMAR (AB)

El ensayo azul alamar está diseñado para medir cuantitativamente la viabilidad de diversas células humanas y animales, bacterias y hongos.

Las células vivas reducen la resazurina que es de color azul oscuro poco fluorescente, por medio de la actividad mitocondrial a resorufina, la cual es de color rosa fluorescente.

Los datos pueden ser recogidos ya sea como fluorescencia (excitación a 530 a 560 Nm; emisión a 590 Nm) o absorbancia a 570 o 600 Nm. Puesto que el colorante no es tóxico para las células, los mismos cultivos pueden ser monitorizados sobre una serie de puntos de tiempo. Este ensayo se puede usar para las determinaciones de proliferación celular, así como para ensayos de citotoxicidad.

En este trabajo se usó para cuantificar por medio de absorbancia, por lo que se realizó de la siguiente forma: Se retiró el medio de cultivo de los pocillos, posteriormente se lavó con PBS y por último se colocó el AB preparado con 299 μ l DMEM sin rojo fenol y 1 μ l de AB. Al día siguiente se separaron los 300 μ l en 3 pocillos (100 μ l en cada pocillo).

Las muestras se leyeron en un lector de placas a una longitud de onda de 570 Nm Aras *et al.*(2008); Erich *et al.*(2000).

8.6.3 Prueba de Proliferación celular por fluorescencia

8.6.3.1 **EdU** (INVITROGEN)

En este ensayo el análogo de timidina modificada EdU se incorpora de manera eficiente en el ADN recién sintetizado y marcado con fluorescencia con un colorante fotoestable Alexa Fluor® brillante en una reacción de clic rápido, altamente específico.

Solución madre de EdU:

El Componente A con Edu 10 mM se mezcló en 2 ml de DMSO (Componente C)

Solución de trabajo:

Al Componente B (Alexa Fluor) se le añadió 70 µL de DMSO (Componente C), y se mezcló.

Para preparar una solución de trabajo de 1X click-it® EdU tampón de reacción (componente D): colocamos 1 ml del componente D a 9 ml de agua desionizada para una concentración 10X.

Solución de Click-it® EdU buffer additive al 10X (componente F): se añadieron 2 ml de agua desionizada al vial, a continuación, se mezcló hasta disolverse. Si la solución se torna de color marrón, indica que se ha degradado y debe ser desechado.

8.6.3.1 Etiquetado celular con EdU

Las células fueron sembradas en cubreobjetos (COVER GLASSES) en cajas de 24 pocillos, se colocaron 100 µl de la suspensión celular, verificamos su adhesión a la caja viéndolas en el microscopio, se les agrego medio de cultivo DMEM (SIGMA) y se colocará en la incubadora con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C (Binder modelo CB150UL)

Se preparó una solución con 10 µM de EdU (Componente A) en medio completo a partir de la solución madre. Posteriormente se incubaron las células durante, 24 hrs. Esto se realizó en tres tiempos; día 7, 14 y 21.

8.6.3.2 Fijación y permeabilización celular.

Se retiró el medio de cultivo y posteriormente se le añadió 1 ml de formalina al 4% a cada pocillo, para dejar incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la formalina y se lavaron las muestras dos veces con 1 ml de BSA al 3%, se retiró la solución de lavado, para añadir 1 ml de tritón X100 al .5% por pocillo y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos.

8.6.3.3 Mezcla de reacción.

Componentes de la Reacción.	NÚMERO DE MUESTRAS						
	1	2	4	5	10	25	50
1X Click-iT buffer de reacción	430µl	860µl	1.8ml	2.2ml	4.3ml	10.7ml	21.4ml
CuSO4 (Componente E)	20µl	40µl	80µl	100µl	200µl	500µl	1ml
Alexa Fluor	1.2µl	2.5µl	5µl	6µl	12.5µl	31µl	62µl
Buffer de Reacción	50µl	100µl	200µl	250µl	500µl	1.25ml	2.5ml
Volumen Total	500µl	1ml	2ml	2.5ml	5ml	12.5ml	25ml

*Colocar los componentes en el orden que muestra la tabla.

Se añadieron los reactivos en el orden indicado en la tabla de acuerdo al número de muestras que se realizaron para que su reacción sea de manera óptima y se utilizó inmediatamente después de su preparación.

Se lavaron las células en cada pocillo con 1 ml de BSA al 3% dos veces, para eliminar el agente permeabilizador, se añadieron 500 µl de la mezcla de reacción a cada pocillo, distribuyéndolo sobre el cubreobjetos y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Retiramos la mezcla de reacción y se lavó con 1 ml de BSA al 3%.

8.6.3.4 Tinción de DNA

Las muestras se lavaron con 1 ml de PBS y después agregamos la solución de Hoechst 33342 (componente G) que se diluyó a una concentración de 1:2000 en PBS para una solución de 1X Hoechst 33342, para colocar 1 ml de esta solución por pocillo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se retiró la solución y se lavó con PBS para observar al microscopio de fluorescencia.

8.7 Inmunomarcaje.

Se obtuvo el botón celular por medio de tryple express como se menciona en el punto 8.3. Se resuspendió y posteriormente se sembraron 60 µl (10 000 células) de la suspensión celular en cubreobjetos redondos (COVER GLASSES) colocados

en una placa de 24 pocillos. Después de 24 hrs. se realizó la inmunocaracterización.

La inmunocaracterización se determinó por fluorescencia.

Se lavaron las muestras con PBT 3 veces por 2 minutos, se fijaron las muestras con 100 μ l de formalina neutra al 10% (SIGMA) por 20 minutos, para volver a lavar con PBT 3 veces durante 2 minutos, se permeabilizó con 100 μ l de tritón 110X (SIGMA) a 0.05% por 20 minutos, después se lavó con PBST 3 veces durante 2 minutos y se colocó 100 μ l de albúmina (santa cruz) al 1% en cada muestra por 45 minutos.

Posteriormente se lavaron las muestras con PBT 3 veces por 2 minutos, y se incubó con el primer anticuerpo 1 μ g/ml de antiCD44 (SIGMA) por 45 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras con PBT 3 veces por 2 minutos y se incubaron 2 μ g/ml del segundo anticuerpo (Alexa Fluor 488 ABCAM) por 45 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras con PBT para ser observadas en el microscopio de fluorescencia.

Para el control negativo se realizaron los mismos pasos pero sustituimos el antiCD44 por el antiCD34 y colocamos la tinción DAPI para verificar la existencia de células por medio de la fluorescencia de sus núcleos.

8.8 Diferenciación Celular.

Para la inducción de estas células a linaje condrogénico, se sembraron 60 μ l (10000 células) de solución celular en forma de microgota en cubreobjetos colocados en microplacas de 12 pocillos para sus respectivas pruebas a los 7 y 14 días. A estas células se les colocó medio de diferenciación QN, el cual se cambió dos veces por semana. El medio QN fue descrito por De Diego y Llamas en el cultivo de queratinocitos y demostró su utilidad en diversos cultivos celulares Rosales(2008).

8.8.1 Medio de diferenciación QN:

- Medio de Eagles Modificado por Dulbecco (D-MEM) 400 ml
- Medio HAM-F12 375 mg
- Hidrocortisona 160 μ l
- Insulina 238 μ l
- Triyodotironina 13 μ l
- Ácido Ascórbico (medio) 25 ml
- Suero fetal bovino (SBF) 5 ml
- Antibiótico y antibiótico 100 U/ml de penicilina C, 100 mg/ml de estreptococo a y 0.25 mg/ml de anfotericina B 4 ml

Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Se verificó sus características a linaje condrogénico por la tinción de los glucosaminoglucanos de color rojo gracias a la safranina O Hernández *et al.*(2011).

8.9 Safranina O

Se preparó una solución de safranina O al 0.1% en agua destilada, se filtró y conservó en un frasco ámbar, después de esto se esperó 24 hrs. para usarla.

Se lavaron las células una vez con PBS y se les colocó formalina neutra al 4% (SIGMA) por 20 minutos para fijar las células, se retiró la formalina y se lavó con PBS y agregar la safranina O preparada, cuidando que la safranina O cubra los cubreobjetos, se dejó por 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron las muestras con agua destilada, se retiró y por último se observaron las células al microscopio Mitrano *et al.*(2010).

8.10 Tinción Azul Alcian

Esta técnica se utiliza para determinar la presencia de mucopolisacáridos ácidos en los cortes de cartílago y cultivos celulares. Se basa en la tinción de los grupos sulfóxido de los glicanos de color azul Hernández *et al.*(2011).

Protocolo de tinción

Se lavaron los cultivos con PBS durante 5 minutos, se fijaron con formalina neutra al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se retira el fijador y se lava con agua destilada y teñimos por 20 minutos con azul alcian 8 GX

al 1% en agua destilada. Retiramos la tinción y lavamos con agua destilada por 3 minutos, se observó la muestra al microscopio óptico.

Figura 22. Células tratadas con Safranina O y Azul Alcian.

Figura 23. Células inducidas y control sembradas en cubre objetos y teñidas con Safranina O y Azul Alcian.

8.11 Inmunofluorescencia.

Los condrocitos expandidos en cultivo, muestran expresión de la molécula de ACAN la cual se evidencia mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la región de unión con ácido hialurónico. Por ello se utilizó como anticuerpo primario ACAN 4F4 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) y como anticuerpo secundario alexa fluor 488 (ABCAM).

Para su inmunocaracterización:

Se hicieron 2 lavados con PBS en cada muestra para retirar el medio de cultivo, se fijaron las células con formalina al 10% durante 20 minutos, se lavó 3 veces con PBS y posteriormente, se llevó a cabo la permeabilización con tritón X100 0.05%

durante 20 minutos a temperatura ambiente, se realizaron otros 3 lavados con PBT para colocar 100 μ l de albúmina (santa cruz) al 1% en cada muestra por 45 minutos, se lavó con PBT 3 veces, después se incubó con el anticuerpo primario en una dilución 1:100, se lavó con PBT 3 veces y se incubó con el anticuerpo secundario en una dilución 1:100 (Alexa Fluor 488 ABCAM) por 45 minutos, al terminar se lavó con PBT cada muestra, para finalmente añadir 300 μ l de DAPI e incubarlo por 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, antes de observar en el microscopio se lavó con PBS.

9. RESULTADOS.

9.1 Obtención de la muestra

Se obtuvieron 10 muestras de mucosa retromolar (tuberosidad del maxilar y cojinete retromolar) de pacientes de 15-30 años de edad de las Clínicas Odontológicas Acatlán y Cuauhtepac de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, con previo consentimiento informado, las muestras fueron trasladadas al Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.



Figura 24. Zona donde se tomo la muestra.
Zona retromolar (tuberosidad del maxilar).

9.2 Cultivo celular.

Una vez obtenido nuestro cultivo por disgregación mecánica, este fue observado diariamente en el microscopio para evaluar la morfología celular y su adherencia a la superficie plástica. A los siete días hubo presencia de células con morfología fibroblastoide, a los 17 días hubo confluencia celular y presencia de colonias, lo que demostró su capacidad proliferativa y regenerativa. Después de realizar el pase celular las células tardaron de dos a tres semanas para llegar a su 80% de confluencia. La población de células en cultivo primario fue heterogénea, proliferó con morfología fibroblastoide y bien extendidas en la caja. Las células expandidas en todos los pasajes se mantuvieron como monocapa homogénea sin evidencia de diferenciación espontánea de células subconfluentes.

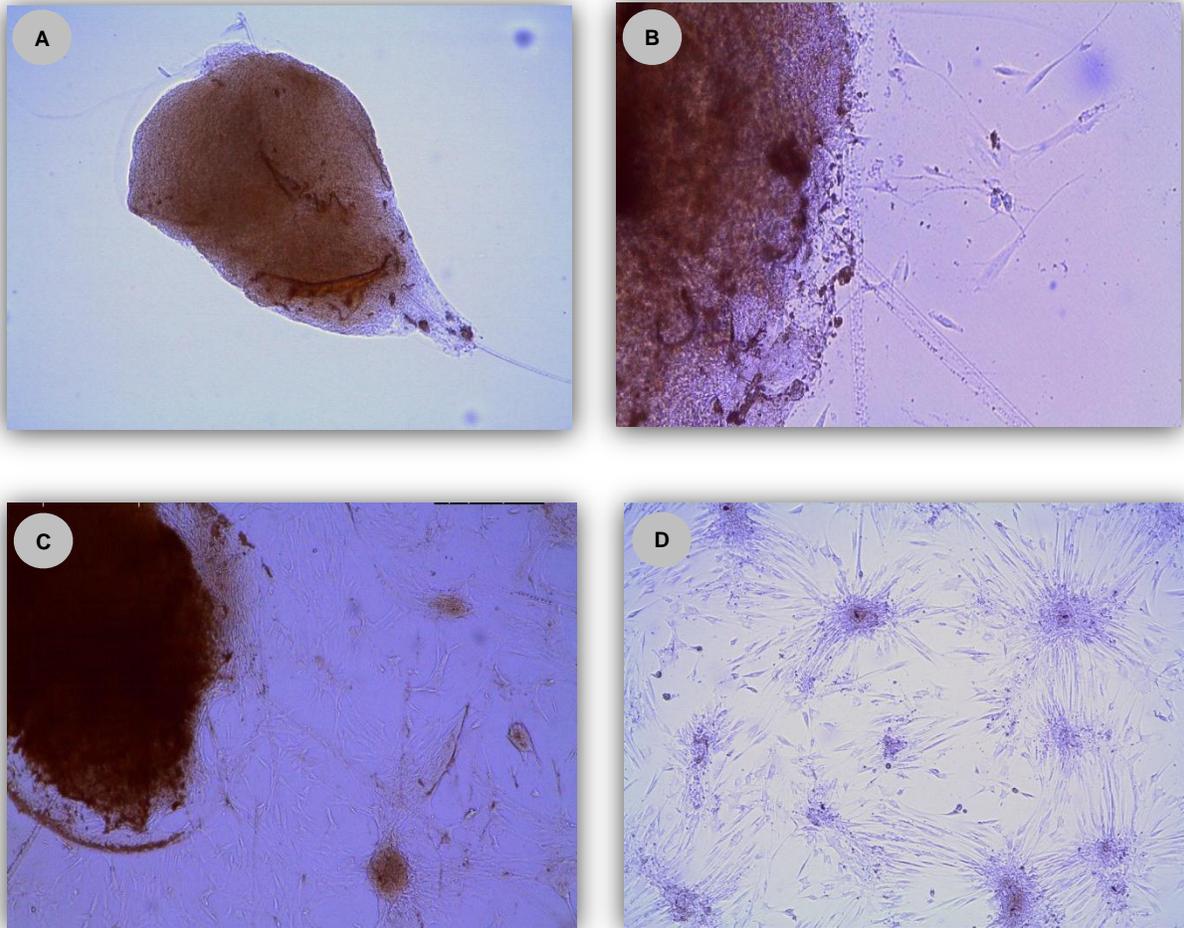
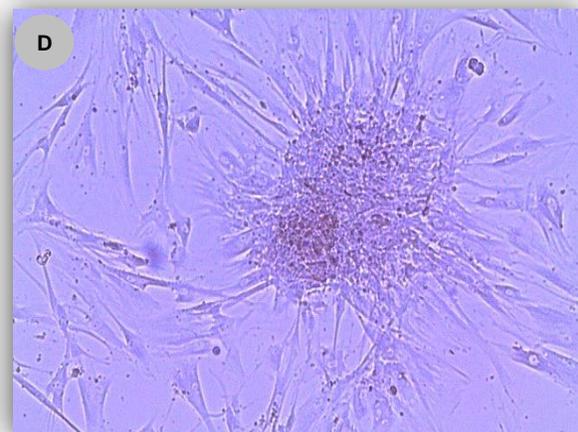
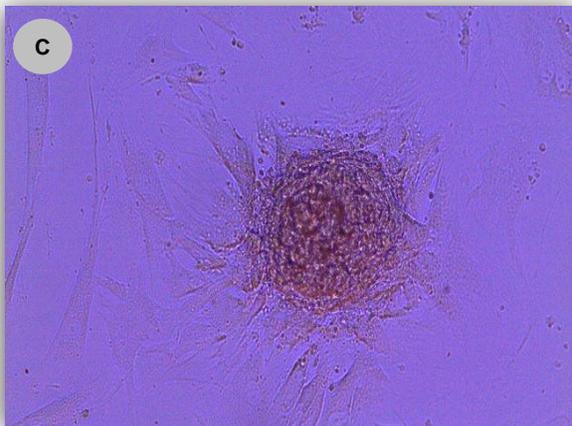
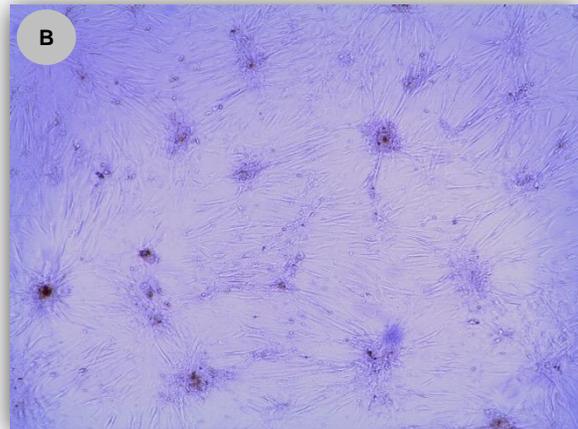
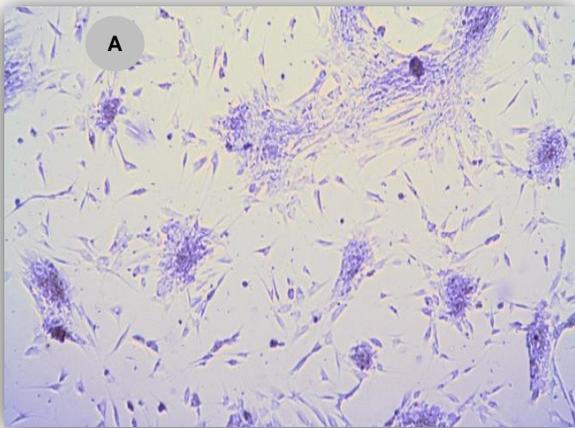


Figura 49. Formación de células a partir de explantes de mucosa retromolar. (A) Explante de mucosa retromolar a las 24 hrs. (B) Explante al día 7 con presencia de células de morfología fibroblastoide. (C) Explante al día 17 en confluencia y presencia de colonias. (D) Células al 80% de confluencia celular.

9.3 MACS (“Clasificación” de células por actividad magnética)

Después del tercer pase celular se cosecharon las células para filtrarlas por medio de MACS. El anticuerpo CD44 con microperlas marcaron las células troncales, las cuales se obtuvieron de la columna de MACS con ayuda de su embolo y se sembraron en una caja de 75 cm², la cual llego a su confluencia a las tres semanas. Al observarla el día uno las células presentaron una morfología fibroblastoide y adherencia a la caja. Al día 5 se comenzó a ver formación de colonias.



9.4 Pruebas de viabilidad y proliferación.

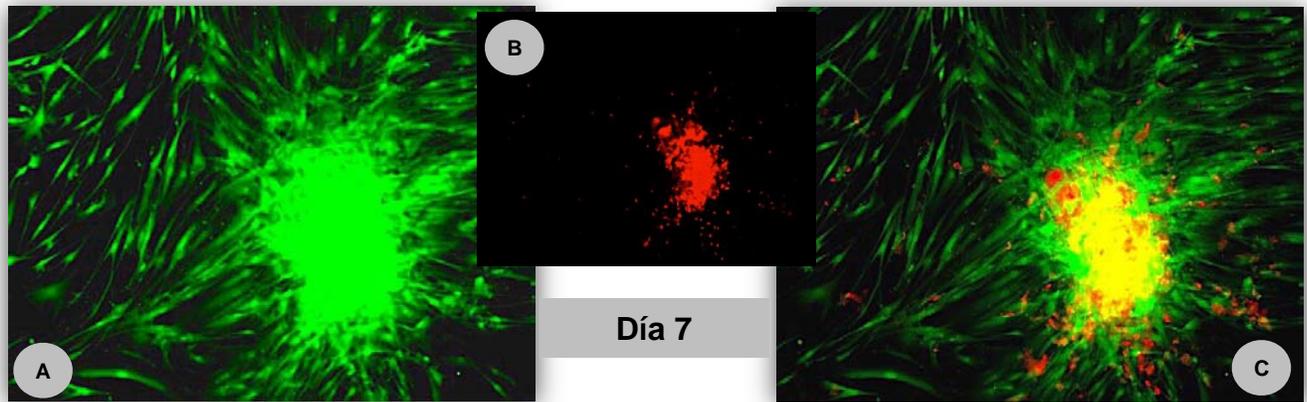
La viabilidad y proliferación celular se comprobó por medio de cinco pruebas, de las cuales tres fueron por fluorescencia (Live and Dead, DAPI y EdU) y dos por absorbancia (MTT y AB). Las pruebas se realizaron a los días 7, 14 y 21.

LIVE AND DEAD

En el día 7 se muestra una colonia con células viables, las cuales predominan en comparación a las rojas, al día 14 la cantidad de células es mucho mayor en comparación al día 7, donde las células viables se observan en mayor cantidad, mientras que las células teñidas de rojo se presenta en menor cantidad, en el día 21 hay un aumento de células viables y una disminución en las no viables.

EdU

EdU (5-etinil-2 'desoxiuridina) es un análogo de nucleósido de timidina y se incorpora en el ADN durante la síntesis de ADN activo. Por lo que observamos las células madre mesenquimales de la mucosa retromolar en proliferación en las siguientes imágenes y células control a las que se les administro DMSO.



Día 7



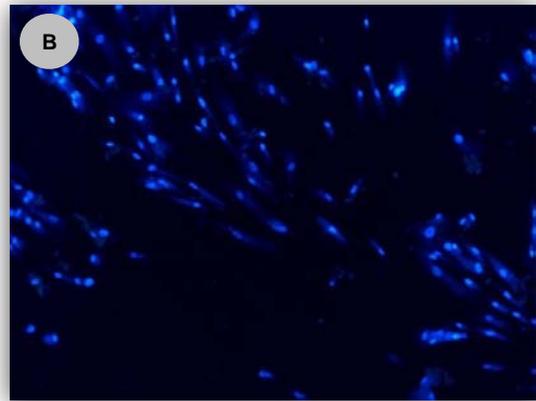
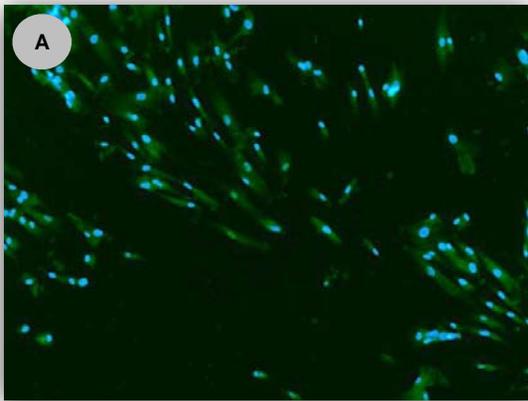
Día 14



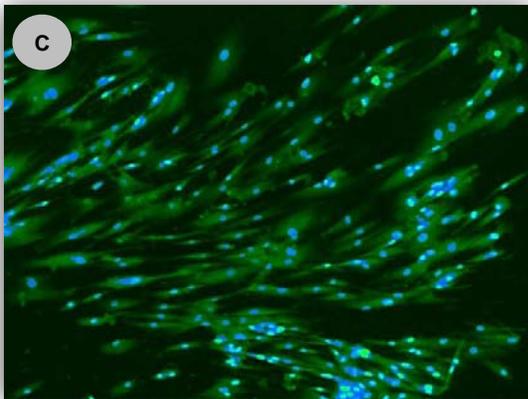
Día 21

Figura 51. Células madre mesenquimales viables. Live and Dead (Vida y Muerte).
 (A,D,C) Células teñidas de color verde por la calceína, lo que demuestra actividad esterasa e integridad de la membrana. (B,E,H) Debido al etidio las células se observan de color rojo por la pérdida de la integridad de la membrana. (C,F,I) Se observan células vivas y muertas.

Día 7



Día 14



Día 21

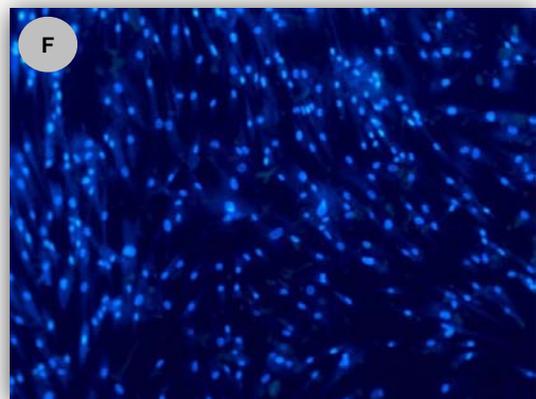
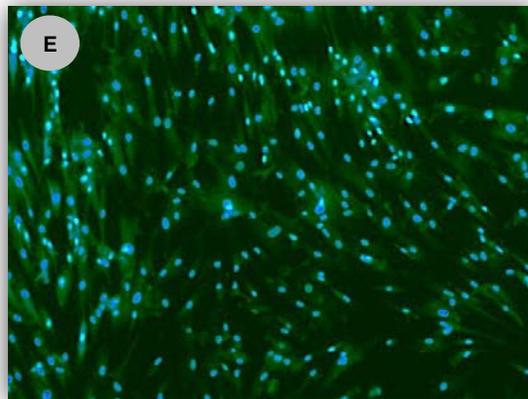


Figura 52. Proliferación celular. Edu. (A,C,E) Células en fase proliferativa.
(B,D,F) Células control.

MTT

El ensayo MTT mostró un aumento significativo en la proliferación celular durante el período de estudio del día 7 al 14, y un aumento menor al primero de día 14 al 21. Obteniendo al día 7 un porcentaje de 50, 350 el día 14 y 450 al día 21. Con estas pruebas se logró comprobar la alta proliferación celular dentro de los días de prueba.

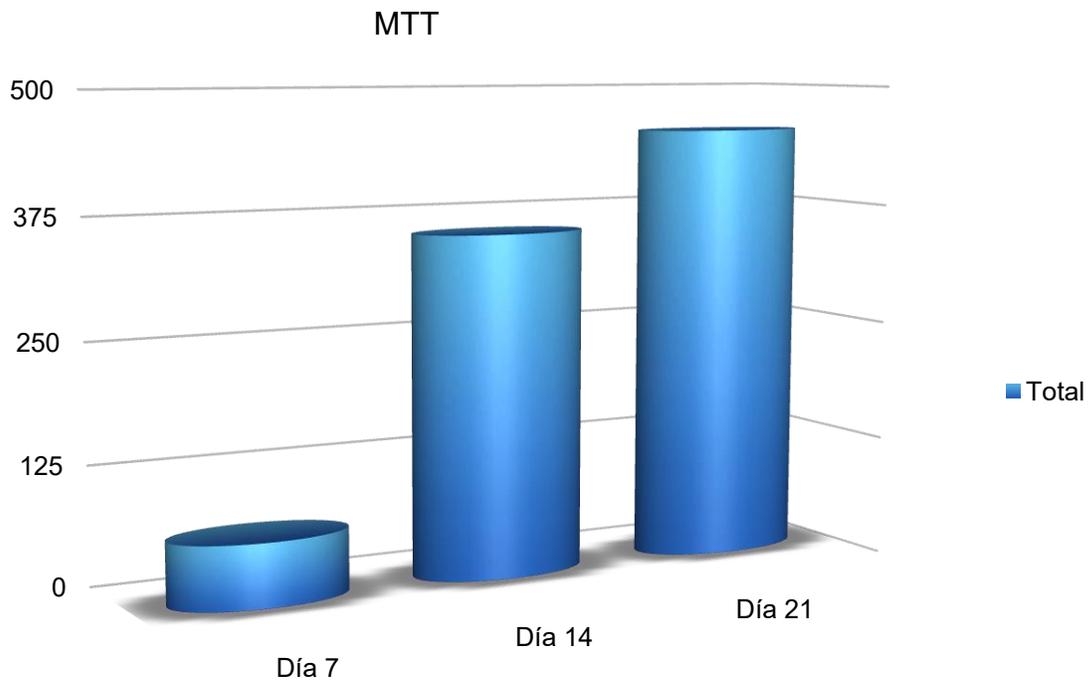


Figura 53. Proliferación de células madre mesenquimales. Ensayo de MTT de Células Madre Mesenquimales.

AB

En el ensayo de Alamar Blue se observó un crecimiento exponencial continuo del día 7 al día 21. Con lo anterior se comprueba la alta viabilidad celular que tienen estas células.

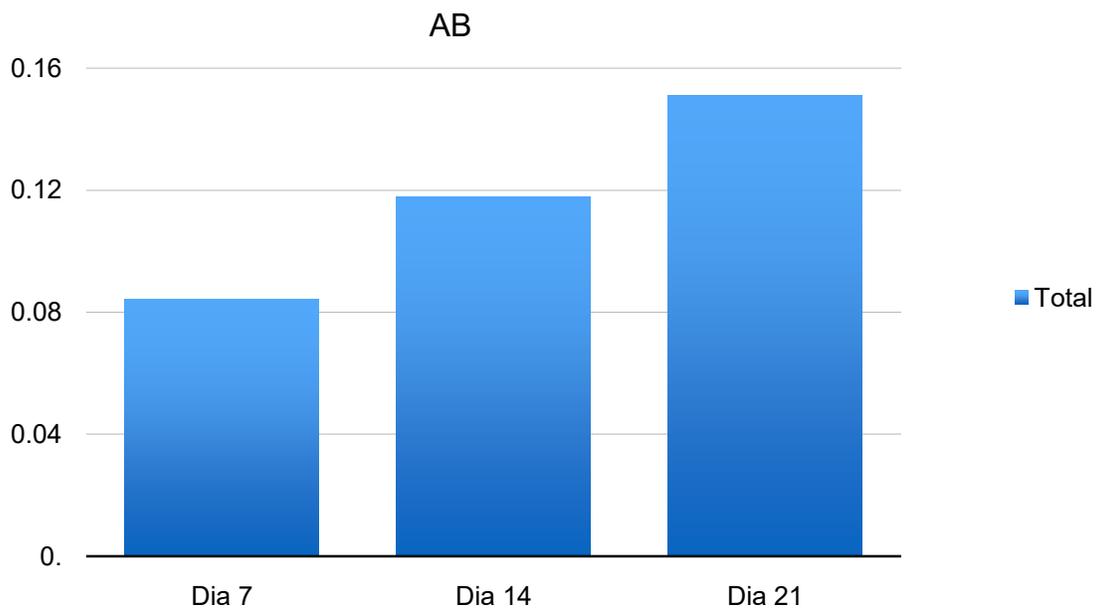


Figura 54. Viabilidad de células madre mesenquimales. Ensayo de Alamar Blue de Células Madre Mesenquimales.

9.5 Inmunocaracterización

Se evaluó la caracterización inmunofenotípica del cultivo por medio de inmunofluorescencia con los anticuerpos CD44+ y CD34-. La inmunotinción fue positiva a CD44 y negativa a CD34. Lo que nos indica que la purificación fue positiva y obtuvimos células madre mesenquimales de mucosa retromolar.

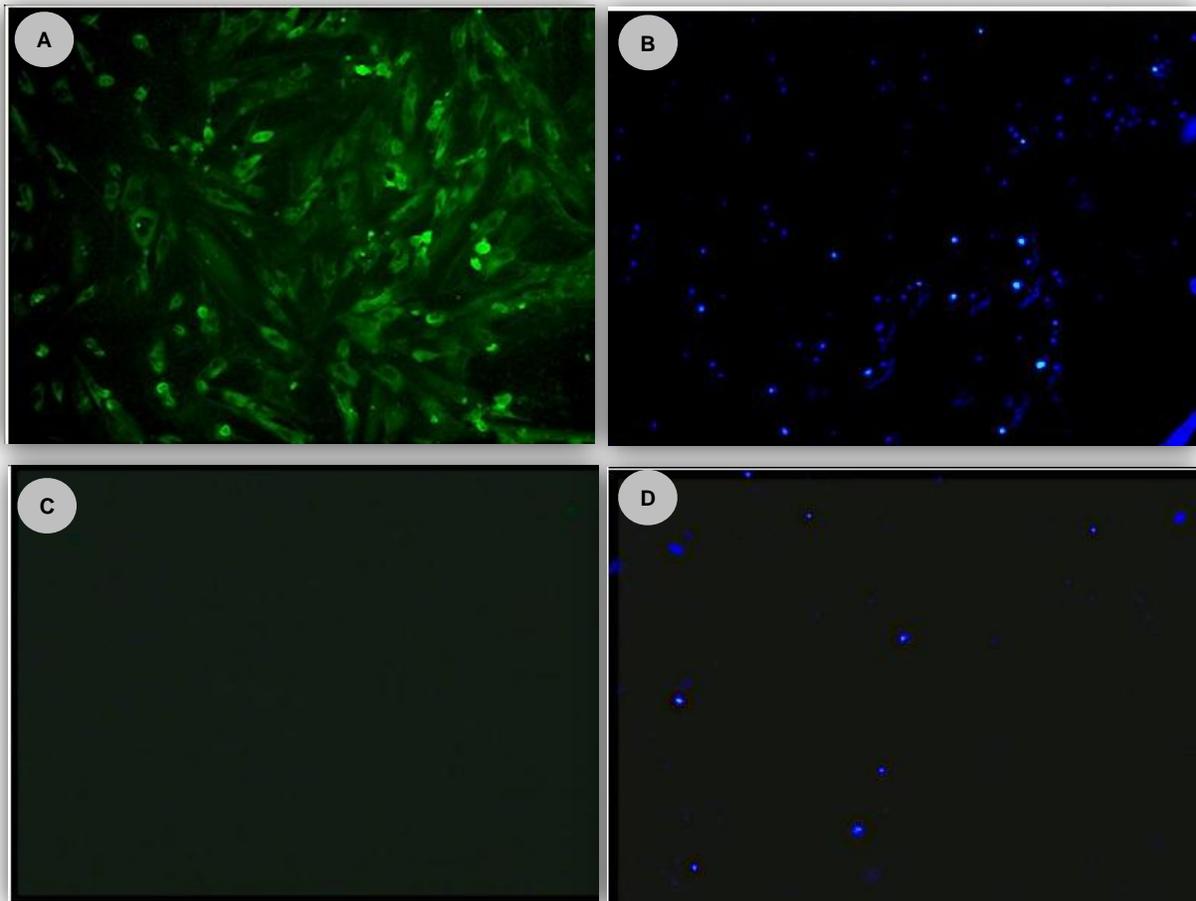


Figura 55. Inmunihistoquímica de células madre mesenquimales de mucosa retromolar. (A-B) Células purificadas, marcadas con anticuerpo CD44, las cuales fluorescen de un color verde, con lo que se demuestra su troncalidad y purificación. **(C-D)** Por otro lado las células marcadas con CD34 no florecen, se colocó DAPI para la tinción de los núcleos y verificar la existencia de células en el caso de este marcador.

9.6 Tinciones e inmunofluorescencia

Safranina O

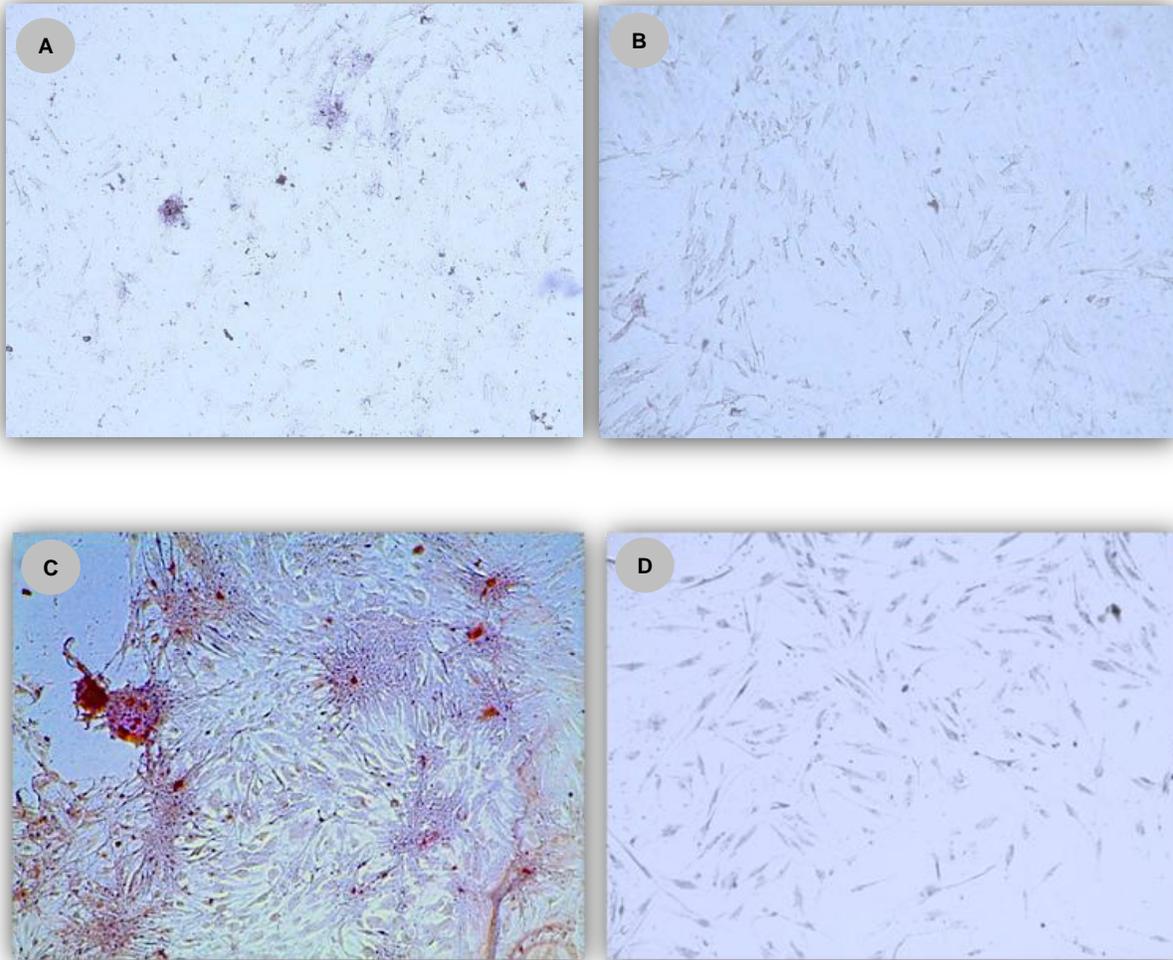


Figura 56. Tinción de células con safranina O. (A) Células Madre Mesenquimales de Mucosa Retromolar con medio condrogénico al día 7, teñidas con Safranina O. **(B)** Células Madre Mesenquimales de Mucosa Retromolar con medio D-MEM al día 7, teñidas con safranina O. **(C)** Células Madre Mesenquimales de Mucosa Retromolar con medio condrogénico al día 14 teñidas con Safranina O. **(D)** Células Madre Mesenquimales de Mucosa Retromolar con medio D-MEM i al día 14, teñidas con Safranina O.

Azul Alcian

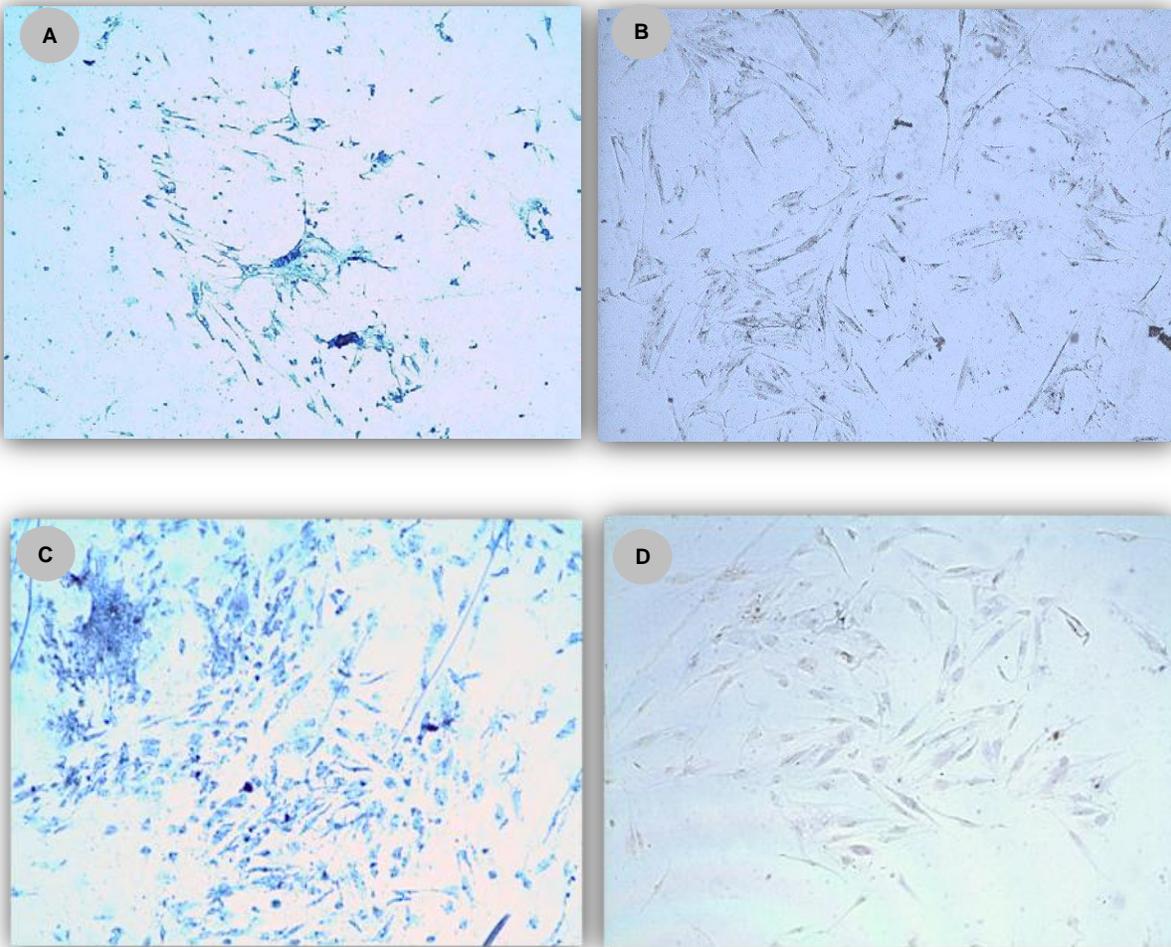


Figura 57. Tinción de células con azul alcian. (A) Células Madre Mesenquimales de Mucosa Retromolar, al día 7 de su inducción teñidas con Azul Alcian. **(B)** Células control al día 7 teñidas con Azul Alcian. **(C)** Células Madre Mesenquimales de Mucosa Retromolar al día 14 de su inducción teñidas con Azul Alcian. **(D)** Células control teñidas con Azul Alcian.

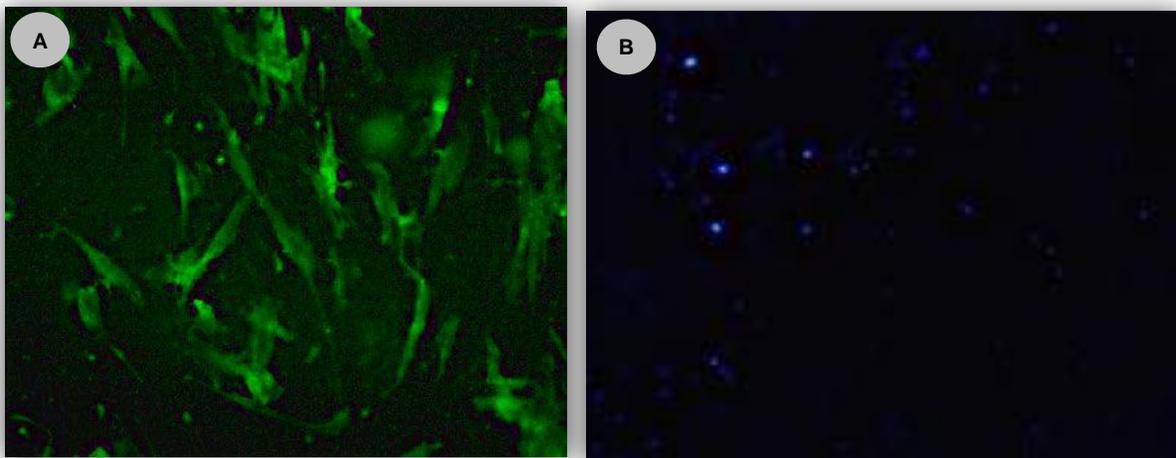


Figura 58. Inmunohistoquímica de células diferenciadas. (A) Células inducidas con medio QN positivas a ACAN. (B) Células en medio D-MEM negativas a ACAN y Teñidas con DAPI.

La verificación de la diferenciación condrogénica se hizo por medio de tinción con safranina O y azul alcian a los días 7 y 14, los resultados fueron positivos al día 14, observándose las células teñidas con safranina O de color rojo y las teñidas con azul alcian de color azul, esto indica la presencia de glucosaminoglucanos, lo que demuestra su diferenciación condrogénica. Posteriormente se complemento con inmunofluorescencia y marcador de membrana agregán, a lo que las células fueron positivas, y demostrando así su diferenciación condrogénica.

10. DISCUSIÓN.

En la búsqueda de información se observó que diversos autores hablan de la obtención de células madre mesenquimales por medio de tejido gingival Mitrano *et al.*(2010), Hernández *et al.*(2011), Mostafa *et al.*(2011), Zhang *et al.*(2012) y Yang *et al.*(2013); sin embargo, no mencionan la zona retromolar como fuente de obtención. En este estudio se consideró a la mucosa retromolar como fuente de obtención de células madre mesenquimales, por sus características celulares y fácil acceso al tejido dentro de la cavidad oral.

Una de las ventajas de tomar a la mucosa retromolar para obtener células madre mesenquimales es el hecho de que se encuentra presente en todas las etapas de la vida postnatal, a diferencia de otros sitios de obtención que se presentan sólo a determinada edad, además de que la proliferación de sus células no representa un límite, ya que la mucosa retromolar es un sitio expuesto a una constante estimulación debido al proceso fisiológico de la masticación. Como parte de la metodología se tomaron las muestras de pacientes de entre 15 y 30 años de edad, todos con presencia del tercer molar adyacente a ésta mucosa, por lo que consideramos que la erupción del tercer molar es otro factor estimulante de éste tejido, motivo por el cual fue posible obtener una vasta cantidad de células madre mesenquimales. Además, al realizar la cirugía para la extracción de estos terceros molares se consiguió una porción de la mucosa retromolar sin necesidad de realizar otro procedimiento traumático.

En relación a la proliferación de las población celular heterogénea, se puede decir que las células de mucosa retromolar a diferencia con las GMSC cultivadas por Hernández *et al.*(2010) aparecieron antes, aun cuando ambas fueron cultivadas por la técnica de disgregación mecánica. Al comparar nuestros resultados con los de Yang *et al.*(2013) la aparición de las células de mucosa retromolar fue tres días posteriores a las GMSC debido a que el método de cultivo que realizaron Yang *et al.*(2013) fue por colagenasa y dispasa.

En cuestión de la confluencia celular, los cultivos de las GMSC de Mitrano *et al.*(2010) y de Mostafa *et al.*(2011) llegaron a su 80% de confluencia entre los días 14 y 21, Hernández *et al.*(2011) tuvieron confluencia a los 15 días y en cambio Yang *et al.*(2013) reportaron confluencia celular entre los días 12 y 18; en esta tesis la confluencia celular se obtuvo al día 17, lo cual está dentro de los parámetros reportados por estos autores, probablemente, debido a que el sitio de obtención de estas células es una zona expuesta a un trauma masticatorio constante y por la asociación con el proceso de erupción del tercer molar, el cual involucra la regeneración y reparación de los tejidos que constituyen a la mucosa retromolar; ésta es una zona en la que se promueve la proliferación celular.

Con los resultados de los ensayos de Live and Dead, Edu, MTT y azul alamar (Alamar Blue) comprobamos que hay un incremento gradual en la proliferación y viabilidad de las células de mucosa retromolar, como se menciona en los trabajos de Mostafa *et al.*(2011) y Zhang *et al.*(2012) con GMSC. Lo anterior hace de las células madre mesenquimales de mucosa retromolar una opción de calidad en la medicina regenerativa.

En cuanto al inmunofenotipo, nuestras células fueron positivas al marcador de membrana CD44, demostrando que son células madre mesenquimales. Hernández *et al.*(2011), Mitrano *et al.*(2010), Zhang *et al.*(2012) y Xu *et al.*(2014) utilizaron el mismo marcador para verificar que las células que cultivaron de mucosa oral fueran GMSC y sus resultados fueron similares a los de esta tesis. Con lo que se comprobó la existencia de células madre mesenquimales en la mucosa retromolar y al comprobarlo se piensa que estas células son capaces de diferenciarse en distintos linajes, siendo una opción para su diferenciación condrogénica, en la medicina regenerativa e ingeniería tisular.

La diferenciación hacia linaje condrogénico fue en comparación con los trabajos de Yang *et al.*(2013), Stromps *et al.*(2014) y Xu *et al.*(2014) más rápida, ya que, al día 7 las células mostraron tinción positiva con azul alcian, más tarde, al día 14 presentaron tinción positiva a safranina O y en cuanto a las pruebas de inmunohistoquímica las células expresaron ACAN en 14 días. La diferenciación de estas células a linaje condrogénico es una alternativa en el tratamiento de defectos en cartílago, como ya se ha visto estas células además de su fácil acceso, su proliferación constante y alta viabilidad, tienen la capacidad de diferenciarse en un menor tiempo del reportado y a su vez es una alternativa en desgastes articulares presente en edades avanzadas por su estimulación y presencia a cualquier edad.

Como se demuestra en esta tesis, la mucosa retromolar es una opción prometedora como fuente de células madre mesenquimales, por su fácil acceso al tejido ya que para obtenerlo no es necesario un procedimiento altamente

traumático, es una zona de recuperación rápida, baja inflamación y con el tiempo no deja cicatriz. Sus células tienen una alta capacidad proliferativa, así como una alta viabilidad, se pueden aislar y caracterizar para su posterior inducción a linaje condrogénico.

11. CONCLUSIONES

El rango de edad para obtener células madre mesenquimales de mucosa retromolar es de 15 a 30 años de edad, una ventaja sobre otras fuentes de origen dental.

La mucosa retromolar es una opción prometedora como fuente de células madre mesenquimales, por su fácil acceso al tejido ya que para obtenerlo no es necesario un procedimiento altamente traumático.

La técnica de MACS resultó eficiente para obtener una población homogénea de células madre mesenquimales de mucosa retromolar.

La capacidad de proliferación y viabilidad de las células quedó demostrada con técnicas como mtt, azul alamar, edu y live and dead lo que las hace idóneas para su posterior uso en la ingeniería de tejidos.

El anticuerpo CD44 es un marcador positivo de células mesenquimales de mucosa retromolar.

La diferenciación de las células madre mesenquimales de la mucosa retromolar al linaje condrogénico se logró al día 7 bajo la inducción con medio QN.

El potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales de mucosa retromolar quedó demostrado mediante la tinción con azul alcian y safranina O e inmunofluorescencia con agregán.

12. BIBLIOGRAFÍA

Anzaldúa Arce SR, Juárez Mosqueda ML, Villaseñor Gaona H, Ríos Mas MC, Cornejo Cortés, Meraz Ríos MA. ¿Qué son las células troncales o “células madre”? *Veterinaria México OA*, 2007;38(1):81-104.

Aras MA, Hartnett KA, Aizenman E. Assessment of Cell Viability in Primary Neuronal Cultures. *Current Protocols in Neuroscience*. 2008;4:7.18.1-7.18.15.

Arévalo Romero JA, Páez Guerrero DM, Rodríguez Pardo VM. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA-Publicación científica en ciencias biomédicas*. 2007;5(8):101-112.

Avery James K. *Oral Development and Histology*. (3ª ed.) Thieme; 2002.

Baghaban Eslaminejad M, Malakooty Poor E. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World Journal of Stem Cells*. 2014;6(3):344-354.

Boeuf S, Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem Cell Research and Therapy*. 2010;1:31.

Capitán Cañadas LM. Caracterización histológica de mucosa oral de espesor completo obtenida mediante ingeniería tisular [Tesis Doctoral]. España: Universidad de Granada, Departamento de Histología Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial; 2006.

Chaparro Padilla AP. Biocompatibilidad de células mesenquimales gingivales humanas con una matriz colágena de origen porcino: estudio experimental piloto in vitro [Tesis para Maestro en Ciencias Odontológicas]. España: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Odontología; 2012.

Cui D. Atlas of Histology whit Functional y Clinical Correlations. (1ªed.) Philadelphia: Wolters Kluwer; 2011.

Davies LC, Locke M, Webb RD, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, Archer CW, Stephens P. A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem Cells and Development*. 2010;19(6):819-830.

Del Pizzo M, Modica F, Bethaz N, Prieto P, Romagnoli R. The conectivo tissue graft: a comparativa clínica evaluation of round healing at the palatal donor site. *Journal of Clinical Periodontology*. 2002;29:848-854.

Eceizabarrena Guridi II, García Romero MJ, González Cívicos S. Células madre de la pulpa dentaria. *Reduca*. 2014;6(1):175-179.

Erich M, Sharova L. In Vitro Methods for Detecting Cytotoxicity. *Current Protocols in Toxicology*. 2000;3:2.6.1-2.6.27.

Fawcett B. Tratado de Histología. (12ª ed.) Madrid: McGraw-Hill, Interamericana; 2005.

Fournier BP, Ferre FC, Couty L, Lataillade JJ, Gourven M, Naveau A, Coulomb B, Lafont A, Gogly B. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Engineering Part A* 2010;16(9):2891-2899.

Gartner LP, Hiatt JL. Texto atlas de histología. 3º ed. China: Mc Graw Hill Interamericana; 2007.

Geetanjali B., Rupesh K. Srivastava, Navita Gupta, et al. Human gingiva derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;393:377-383.

Gehron Robey P. Stem cells near the century mark. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(11):1489-1491.

Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. (3ª ed.) México, D.F.: Panamericana; 2010.

González Orta LJ, Font Rytzner A, De Nova García J. Investigación con células madre de origen dentaría. Actualización. *Gaceta Dental*. 2011;118(223).

Gutiérrez Alcántara J. Características de las Células Madre, su importancia en la práctica odontológica. *ECOS*. 2011;6(8).

Hernández B. M., Inostroza V. C., Carrión A. F., Chaparro P. A. QHA. Proliferación de células madres mesenquimales obtenidas de tejido gingival humano sobre una matriz de quitosano: estudio in vitro. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2011;4:59-63.

Hsu SH, Huang GS, Lin SY, Feng F, Ho TT, Liao YC. Enhanced chondrogenic differentiation potential of human gingival fibroblasts by spheroid formation on chitosan membranes. *Tissue Engineering Part A*. 2012;18(1-2):67-79.

Hsu SH, Huang GS, Feng F. Isolation of the multipotent MSC subpopulation from human gingival fibroblasts by culturing on chitosan membranes. *Biomaterials*. 2012;33(9):2642-2655.

Izumi K, Neiva RF y Feinberg SE. Intraoral Grafting of Tissue-Engineered Human Oral Mucosa. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2013;28(5):e295-e303.

Jaime Pérez JC, Garza Veloz I, Ortiz López R. Células Madre. *Medicina Universitaria*. 2007;9(36):130-140.

Jesús L, Orta G. Investigación con células madre de origen dentario. *Ciencia. Gaceta Dental*. 2011;118-129.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histología Básica*. 6º ed. España: Elsevier Masson; 2005.

Kalpakci KN, Brown WE, Hu JC, Athanasiou KA. Cartilage tissue engineering using dermis isolated adult stem cells: the use of hypoxia during expansion versus chondrogenic differentiation. *Plos One*. 2014;9(5):e98570.

Kamata N, Fujimoto R, Tomonari M, Taki M, Nagayama M, Yasumoto S. Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligamento cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2004;33:417-423

Koji O, Takeshi M, Nobuyuki K, Hideaki S, Kunikazu T, Ichiro S. Comparison of Gingiva, Dental Pulp, and Periodontal Ligament Cells From the Standpoint of Mesenchymal Stem Cell Properties. *Cell Medicine*. 2010;4(1):13-21.

Kong H, Introduccion A. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2008;1-5.

Krishnan S, Iyer GK, Krishnakumar S. Culture y characterisation of limbal epithelial cells y oral mucosal cells. *Indian Journal of Medical Research*. 2010;131:422-428.

Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research and Therapy*. 2013;4:117.

Magallanes Fabián M, Carmona Rodríguez B, Álvarez Pérez MA. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Revista Odontológica Mexicana*. 2010;14(1):15-20.

Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, Pitaru S. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells*. 2010;28(5):984-995.

Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierros FS, Quintero A, Chaparro A, Sanz A. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *Journal Periodontol*. 2010;81(6):917-925.

Mostafa NZ, Uludag H, Varkey M, Dederich DN, Doschak MR, El-Bialy TH. In Vitro Osteogenic Induction of Human Gingival Fibroblasts for Bone Regeneration. *The Open Dentistry Journal*. 2011;5:139-145.

Mundial M. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial
Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica
en personas. 1989;1-4.

Munévar JC, Acosta L, Galindo LD, Mondol I, Mejía A, Forero J. El interés de las
células stem y sus aplicaciones en odontología. *Universidad el Bosque,
Facultad de Odontología*. 2003;9(2).

Padrón K, Salmen S, Berrueta L, González E, Dávila L, Rojas J, Sosa L, Olávez D,
Solórzano E. Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la
mucosa bucal (Gingival fibroblast purification from oral mucose tissue)
Avan Biomed. 2012;1(1):4-8.

Pelayo R., Santa-Olalla J., Velasco I. Células Troncales y Medicina Regenerativa.
México, D.F.: UNAM; 2013.

Ramos M, Martínez A, Tardieu I. Curso de Cultivo Celular [Tesis]. España:
Universidad Autónoma de Madrid; 2008.

Rodríguez-Pardo VM. Células Madre: Conceptos generales y perspectivas de
investigación. *Universitas Scientiarum*. 2005;10(1):5-14.

Rosales Ibáñez R. Aislamiento y control de calidad microanalítico para ingeniería tisular de los condrocitos del tejido cartilaginoso hialino y fibroso [Tesis Doctoral]. España: Universidad de Granada, Facultad de Medicina; 2008.

Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histología, Texto y atlas a color con biología celular y molecular. 4º ed. Argentina: Médica panamericana; 2005.

Snyder TN, Madhavan K, Intrator M, Dregalla RC, Park D. A fibrin/hyaluronic acid hydrogel for the delivery of mesenchymal stem cells and potential for articular cartilage repair. *Journal of Biological Engineering*. 2014;8:10.

Stromps J-P, Paul NE, Rath B, Nourbakhsh M, Bernhagen J, Pallua N. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: a new path in articular cartilage defect management? *Biomed Research International*. 2014;740926.

Ude CC, Sulaiman SB, Min-Hwei N, Hui-Cheng C, Ahmad J, Yahaya NM, Saim AB, IdrusRBH. Cartilage regeneration by chondrogenic induced adult stem cells in osteoarthritic sheep model. *Plos One*. 2014;9(6):e98770.

Valencia R, Espinosa R, Saadia M, Velasco Neri J, Nario H. Panorama Actual de las Células Madre de la Pulpa de Dientes Primarios y Permanentes. *RODYB*. 2013;2(2).

Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, Yang P, Pei X. Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cell-Mediated Therapeutic Approach for Bone Tissue Regeneration. *Stem Cells and Development*. 2011;20(12):2093-9102.

Wu S-M, Chiu H-C, Chin Y-T, Lin H-Y, Chiang C-Y, Tu H-P, Fu MMJ, Fu E. Effects of enamel matrix derivative on the proliferation and osteogenic differentiation of human gingival mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014;5:52.

Xu Q-C, Wang ZG, Ji Q-X, Yu X-B, Xu X-Y, Yuan C-Q, Deng J, Yang P-S. Systemically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells contributing to bone tissue regeneration. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014;7(8):4922-4929.

Yang H, Gao LN, An Y, Hu CH, Jin F, Zhou J, Jin Y, Chen FM. Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. *Biomaterials*. 2013;34:7033-7047.

Zapata NM, Zuluaga NJ, Betancur SN, López LE. Cultivo de Tejido Cartilaginoso: acercamiento conceptual. *Revista EIA*. 2007;8:117-129.

Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH, Le AD. Human Oral Mucosa and Gingiva: A Unique Reservoir for Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Dental Research*. 2012;91(11):1011-1018.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *Journal of Immunology*. 2009;183(12):7787-7798.