



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

***Diferenciación a Linaje Adipogénico de
Células Troncales de Folículo Dental***

TESIS

Para obtener el grado de:

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ LIZBETH

Director: Esp. Pabel Antonio Gómez Hernández

Asesores: Dr. Raúl Rosales Ibáñez

Mtro. José T. Cano Brown



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México Junio 2017



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 está 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.

Dedicatorias y Agradecimientos

A mis Padres: Ana María Gutiérrez y Venancio Hernández, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por los ejemplos de superación, lucha y perseverancia que me han infundado, por el apoyo y valor mostrado para salir adelante y sobre todo por su incondicional amor.

A mis hermanos: Hugo y Ricardo por sus palabras de aliento, por ser cómplices, por apoyarme y ser ejemplo, los quiero mucho.

A mis tíos: Domingo Alberto y Carolina (†), quienes me brindaron todo el cariño, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y a quiénes estoy profundamente agradecida.

A mi compañero de vida: Sergio, quien siempre me alentó a seguir adelante, por ser motivación, apoyo, inspiración y a quien amo profundamente.

A mis Amigos: Incondicionales, de vida, de la facultad, por creer en mí, por brindarme una sonrisa, que han sido motor y que han hecho más liviano el camino.

A mis Asesores: Por el conocimiento y experiencia compartidos, por ser excelentes guías, por su paciencia, por confiar en mí, gracias por su apoyo para concluir el presente trabajo.

A mi Alma Mater: La Universidad Nacional Autónoma de México, quién me abrió las puertas en su preparatoria N°3 y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, donde conocí a mis mentores y gente que dio forma a mi vida profesional. "Por mi Raza Hablará el Espíritu"

CONTENIDO

Glosario de Términos	III
Resumen	IV
Introducción	V
Justificación	V
Hipótesis	VI
Objetivos	VII
1. Marco Teórico.....	1
1.1 Medicina Regenerativa e Ingeniería de tejidos	1
1.2. Clasificación de <i>Stem cell</i>	3
1.2.1. SC Embrionarias (ESC):	3
1.2.2. SC Postnatales (PSC):.....	3
1.2.3. Se clasifican según su potencialidad ⁵	3
1.3. SC o células troncales y la Actualidad.....	4
1.4 Aplicaciones en Odontología	4
1.5. Criterios Mínimos para definir <i>stem cells</i>	8
1.6. Clasificación de SC de Origen Bucodental	8
1.7. Folículo Dental	11
1.7.1. Embriología e histología del folículo dental	12
1.8. Características principales reportadas de DFPC	13
1.8.1. Diferenciación de las <i>Stem Cell</i>	15
1.8.2. Diferenciación de Tejido Adiposo.....	16
1.9. Tejido Adiposo	17
1.9.1. Histogénesis del tejido adiposo.....	17
1.9.2. Funciones de tejido adiposo	18
2. Metodología de Investigación	20
2.1 Obtención de Muestras	20
2.2. Transporte de la Muestra	20
2.3. Aislado y Caracterización.....	20
2.3.1. Por explante:.....	20

2.3.2 Por Digestión Enzimática:	22
2.4. Obtención De Primer Pase	24
2.4.1. Separación celular:	24
2.5. Purificación MAC´s (<i>Magnetic activated cell sorting</i>)	25
2.6. Determinación de Viabilidad Celular	28
2.6.1. Prueba de Troncalidad.....	28
2.6.2. DAPI	30
2.6.3. <i>LIVE/DEAD</i> :.....	31
2.6.4. <i>EDU Proliferation</i>	32
2.6.5. CFU (Unidades Formadoras De Colonias).....	35
2.6.6. TUNEL.....	36
2.7. INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA	39
2.8. Evaluación de la Adipogénesis por Tinción <i>Oil-Red</i>	41
4. DISCUSIÓN	52
5. CONCLUSIONES:.....	55
6. BLIBIOGRAFÍA	56

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ag	Antígeno de superficie
ADN	Acido desoxirribonucleico
ASC	Células madre antólogas
ASCs	Células madres adultas
BM	Médula ósea
BMSSC	Células madre estromales de médula ósea
CO ₂	Dióxido de carbono
CFU	Unidades formadoras de colonias
CFU-F	Unidades formadoras de colonias fibroblastoides
DPSCs	Células madres de la pulpa dental
DMEM	Medio Eagle modificado Dulbecco
DFPCs	Células progenitoras del folículo dental
DPBS	Solución salina de fosfato tamponada de Dulbecco
ESCs	Células madres embrionarias
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero bovino fetal
HSCs	Células madre hematopoyéticas
hTGSCs	Células mesenquimales del germen dental
ISCT	Sociedad internacional para la terapia celular
MSCs	Células madres mesenquimales
Oil-Red	Aceite rojo
PDLSCs	Células madres del ligamento periodontal
PBS	Solución salina de fosfato tamponada
PSC	Células madre postnatales
SC	<i>Stem Cell</i> (célula madre, célula troncal)
SCAPs	Células madre de la papila apical
SHED	Células madre de dientes deciduos exfoliados
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ECM	Matriz Extracelular
CMM	Células Madre Mesenquimales
hMSC	Células Madre Mesenquimales derivadas de médula ósea

RESUMEN

La tendencia actual en la ingeniería de tejidos es el empleo de células madre mesenquimales (MSCs). Existe gran interés en el uso de células madre de tejidos bucales. Por ello, el propósito de este estudio fue realizar una revisión narrativa de la literatura científica disponible para la obtención de muestras, aislamiento y caracterización *in vitro* de células madre (SCs) derivadas del folículo dental de dientes permanentes humanos en formación.

Desde el descubrimiento de las células mesenquimales de médula ósea¹, cordón umbilical y células embrionarias, se ha intensificado la búsqueda de diversas fuentes de células mesenquimales con ventajas sobre las 3 mencionadas anteriormente. Actualmente se encuentran en cavidad bucal alrededor de 10 fuentes de células mesenquimales, las primeras en ser caracterizadas fueron de pulpa dental². El aislamiento y la primera caracterización de las células precursoras (PCs) derivados del folículo dental humano de los terceros molares extraídos fue en el 2004 por C. Morsczeck. Posteriormente, diversos estudios han demostrado su capacidad de diferenciación a diversos linajes como: osteogénico, adipogénico, condrogénico y neurogénico.

Metodología: se aisló y cultivó folículo dental de terceros molares inmaduros humanos, de pacientes jóvenes menores a 20 años. Se utilizaron 2 diferentes técnicas de cultivo: por explante y por digestión enzimática. Para la obtención de una población homogénea de células mesenquimales se realizó purificación celular con anticuerpo CD44 mediante MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*), para determinar viabilidad y proliferación se realizaron ensayos como: *Live & Dead*, TUNEL, *EDU Proliferation* y CFU. Se demostró su capacidad de diferenciación manteniendo a las células en medio inductor adipogénico (insulina, isobutilmetilxantina y dexametasona) más DMEM, durante 30 días. Posteriormente se realizó tinción con *oil-red*.

Resultados: se logró cultivar células de folículo dental por medio de la técnica de digestión enzimática en un tiempo de dos semanas, se mostró un gran potencial de viabilidad y proliferación celular de DFPCs, obteniendo una población

homogénea de células mesenquimales utilizando MAC's. Su potencial de diferenciación a linaje adipogénico quedo demostrado mediante la tinción con *oil-red*, previo a establecer las condiciones específicas de diferenciación.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales o *stem cell* (SC por sus siglas en inglés) adultas, son células prometedoras en ingeniería tisular. Estas son diferenciadas con capacidad de autorenovarse, y pluripotenciales. Presentan morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares como: osteogénico, dentinogénico, neurogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico. Se han hecho proliferar en cultivos in vitro, lo que ha permitido estudiar algunas de sus propiedades funcionales³.

Han sido aisladas, cultivadas y caracterizadas de diversos tejidos, dentro de los cuales se incluyen tejidos bucodentarios. En cavidad oral se encuentran en pulpa, folículo dental y en el tejido conectivo gingival, papila dental, ligamento periodontal, paladar entre otros. El presente trabajo pretende aislar, cultivar *stem cells* de folículo dental humano, caracterizar su inmunofenotipo y su potencial de diferenciación a linaje adipogénico, con la intención de responder y aportar información a la comunidad para posteriores investigaciones.

JUSTIFICACIÓN

Aplicación Clínica: Los adipocitos se pueden usar con una diversidad de materiales para formar una composición para propósitos tales como la cirugía de reconstrucción. Las células se pueden combinar con una biomatriz para formar un material bidimensional o tridimensional. Como alternativa las hMSC adipogénicas se podrían aislar del paciente y hacer crecer en un cultivo, para después ser mezcladas con un biomaterial compatible tal como colágeno, material de ácido poliláctico, etc; para formar un compuesto, por ejemplo se puede mezclar con colágeno solubilizado que después se permite gelificar para formar un compuesto

tridimensional que se podría usar para el aumento de pecho después de una mastectomía.

Su uso en cirugía reconstructiva, las hMSC adipogénicas serán de elección en cirugía estética opcional de una forma muy parecida; para aumentar el tejido subyacente debajo de la piel con un compuesto de células autólogas y material biocompatible.

Por otra parte, el desequilibrio del metabolismo energético en el cuerpo conduce a varios estados de enfermedad, los más notables, obesidad y diabetes inducida por obesidad, y éstas se pueden describir como disfunciones de los tejidos de almacenamiento de energía⁴. El gen OB es una proteína de 16.000pm llamada leptina o proteína OB. La leptina solamente se produce por los adipocitos y es una hormona que regula el hipotálamo. Se ha informado de que la leptina puede servir como una hormona que regula la fertilidad, y que puede ser el vínculo entre el peso corporal apropiado y la fisiología reproductiva⁵. Las mujeres de peso insuficiente y las mujeres con sobrepeso tienen dificultades para concebir, y esto probablemente se asocia con el desequilibrio hormonal en el cuerpo de estos individuos. La conexión entre peso corporal, fertilidad y la leptina producida por los adipocitos se ha sospechado. Hasta el grado de que las hMSC adipogénicas son una buena fuente de leptina, estas se pueden usar como un implante para la liberación de leptina al cuerpo de tales mujeres. Tal implante puede tomar la forma de hMSC adipogénicas encapsuladas o de una matriz que contiene hMSC adipogénicas que se pueden implantar donde los productos secretados tendrán acceso al sistema circulatorio.

HIPÓTESIS

Alternativa:

- Se obtendrán *stem cells* a partir de folículo dental, así como su diferenciación a linaje adipogénico.

Nula:

- Se obtendrán células poco fiables de ser *stem cells*, no logrando su diferenciación adipogénica.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Inducción a linaje Adipogénico de células troncales de folículo dental.

Objetivos específicos

- Obtención de folículo dental de pacientes jóvenes de 16 a 20 años.
- Aislar y cultivar células heterogéneas de folículo dental.
- Purificación por medio de MAC´S (inmunomarcaje).
- Confirmar marcadores de membrana correspondientes a células mesenquimales de folículo dental.
- Determinación de la Viabilidad celular de células de folículo dental por medio de la Prueba De Live/Dead.
- Medición de la síntesis de ADN a través de la prueba EDU *Proliferation*.
- Observación de Unidades Formadoras de Colonias (CFU) por tinción de azul de toluidina.
- Examinar el nivel de apoptosis celular a través de la prueba de Tunel.
- Inducción estandarizada a linaje adipogénico.
- Tinción de células adipogénicas por medio de *oil-red*.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MEDICINA REGENERATIVA E INGENIERÍA DE TEJIDOS

La medicina regenerativa es un campo amplio que incluye la ingeniería de tejidos, pero también incorpora la investigación sobre auto curación, donde el cuerpo usa sus propios sistemas, algunas veces con ayuda de material biológico extraño, para recrear células y reconstruir tejidos y órganos. Los términos “ingeniería de tejidos” y “medicina regenerativa” han llegado a ser intercambiables, ya que el campo intenta enfocarse en las curas en lugar de en los tratamientos para enfermedades complejas y a menudo crónicas.

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que se ha desarrollado en paralelo con los avances biotecnológicos recientes; evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales.

El objetivo de la ingeniería de tejidos es recopilar ideas o teorías que restauren, mantengan o mejoren los tejidos dañados u órganos completos. Uno de los elementos clave para la ingeniería de tejidos son las células madre o *stem cell*, generalmente se definen como células clonogénicas capaces de autorrenovarse², es decir células no especializadas que se renuevan durante largos tiempos por división celular, y son capaces de diferenciarse en células específicas por medio de inducciones correspondientes; dichas células poseen una morfología fibroblástica y plástica³.

La historia de las *stem cells* comenzó ya hace dos décadas durante las cuales se ha producido un cambio radical en el horizonte de la medicina. El reconocimiento de la existencia de varios tipos de linajes celulares provenientes del blastocisto y de la sangre periférica del adulto, junto con su capacidad de producir nuevos tejidos, inclusive de capas embrionarias diferentes, ha permitido diseñar nuevos

tratamientos antes considerados imposibles⁴. En 1961, se establece la existencia y las propiedades de las células madre para trasplantes de médula ósea de ratón. Este descubrimiento sentó las bases para todas las investigaciones actuales sobre las células troncales adultas y embrionarias⁵. Poco después se descubre que las células madre en la sangre del cordón umbilical humano son trasplantables. Si bien lo anterior representa un gran avance en el campo de la medicina utilizando las *stem cells*, su origen sea embrionario o de tejido fetal ha generado una gran controversia en el campo de lo Ético y lo legal⁶.

Los progenitores mesenquimales son un grupo de células madre adulta que fueron caracterizadas por primera vez por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaz de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos⁷. Varios estudios han asignado a este grupo celular diversos nombres como: Células de Estroma Medular, Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides, Precursores Estromales o Células Adultas Progenitoras Multipotentes⁸.

Gronthos y cols. aislaron por primera vez las SC de origen dental provenientes de la pulpa (DPSC's)⁹, en esta investigación demuestran que dicho tejido contiene células que son clonogénicas y altamente proliferativas. Su utilidad radica tanto en su fácil obtención como en su extenso potencial terapéutico que poseen gracias a su plasticidad hacia diversos tejidos tales como sistema nervioso central, el tejido óseo, el cartílago, el tejido adiposo y el hígado¹⁰, además de sus aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades sistémicas, por lo tanto hoy en día se consideran como una estrategia prometedora en ingeniería de tejidos, debido no solo a la ausencia de dilemas éticos al obtener el tejido de fuente de *stem cells*, si no esencialmente al fácil acceso quirúrgico durante la recolección de la muestra.

1.2. CLASIFICACIÓN DE STEM CELL

Existen dos tipos de SC: Embrionarias (ESC) y Postnatales (PSC)¹¹.

1.2.1. SC EMBRIONARIAS (ESC):

Son células que se obtienen a partir de tejidos embrionarios (cordón umbilical, placenta y feto). Estas células totipotenciales y pluripotentes poseen una capacidad ilimitada de renovación y diferenciación. Estas células fueron estudiadas inicialmente por Leroy Stevens y aunque la idea de utilizarlas apareció desde los 70's, estas nunca han sido vistas como ideales debido a que proviene de tumores y presentaban aneuploidias¹².

1.2.2. SC POSTNATALES (PSC):

También denominadas de adulto, son células que se obtienen a partir de tejidos formados y diferenciados (médula ósea, piel, músculo, tejido adiposo, mucosa, dientes, cerebro, pulmón, hígado, páncreas, etc.), estos puede ser donados por el paciente o modelo de estudio. La capacidad de auto renovación y diferenciación de estas células se ve reducido pero con gran potencialidad a múltiples estirpes celulares (multipotentes, oligopotentes o unipotentes). Estas células fueron llamadas células progenitoras multipotenciales adultas (MAPC, por sus siglas en inglés) por Jiang *et al*¹³.

1.2.3. SE CLASIFICAN SEGÚN SU POTENCIALIDAD^{14, 5}.

- Totipotentes: Aquellas capaces de originar un embrión y un individuo completo, diferenciándose hacia cualquier estirpe celular. (epiteliales, mesenquimales, musculares y neurales)
- Pluripotentes: Capacidad de desarrollar la totalidad de los tejidos a excepción del tejido extraembrionario.
- Multipotentes: Pueden originar un subconjunto muy diverso de tipos celulares.
- Oligopotentes: Originan un subconjunto reducido de tipos celulares.
- Unipotentes: Sólo son capaces de generar un único tipo celular.

1.3. SC O CÉLULAS TRONCALES Y LA ACTUALIDAD.

Actualmente las células madre preconizan una revolución en todos los ámbitos de la medicina moderna. La identificación y caracterización de estas células es objeto de investigación intensa y amplia en múltiples centros y países y la cantidad de recursos destinados a ello son enormes. Todo este esfuerzo apunta a un objetivo relativamente simple: conseguir que estas células actúen como reparadoras de tejidos dañados o regeneradoras de funciones perdidas por enfermedad. A esto se le ha llamado en un sentido amplio medicina regenerativa y abarca conceptualmente desde usos actuales de las células madre en el tratamiento de enfermedades hematológicas a la mejoría de enfermedades comunes que constituyen causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad. La expectativa que las terapias basadas en células madre puedan ofrecer en el futuro es también muy alta entre la comunidad científica, los medios de comunicación y el público en general. Esta expectativa está alimentada por reportes de experiencias anecdóticas de equipos técnicos que pintan como realidad algo que todavía está en un futuro más o menos distante. Afortunadamente esto no ha impedido la labor perseverante y callada de múltiples grupos científicos que han conseguido avances significativos en las últimas décadas. Hasta la fecha y con la excepción del uso en trasplante hematopoyético, la mayor evidencia de las propiedades y posibles aplicaciones de células madre proviene de estudios en animales de laboratorio¹⁵.

1.4 APLICACIONES EN ODONTOLOGÍA

Las aplicaciones de las células madre en el campo odontológico se encuentran en una fase de estudio prometedora, la Ingeniería tisular, una nueva disciplina, puede presentar nuevas opciones de tratamiento para reemplazar la pérdida parcial o total de un diente dañado¹⁶. Estas prometedoras posibilidades han focalizado la investigación dental en este campo, augurando ser la delantera de la nueva generación de tratamientos dentales ante daños de dichos tejidos (esmalte, pulpa, dentina), pudiendo reconstruir defectos dentoalveolares óseos, y eventualmente reemplazar un diente completo¹⁷.

La formación de nuevos tejidos requiere la participación de 3 componentes esenciales: 1.- población de *stem cells* pluripotentes, 2.- la presencia de moléculas de señales que induzcan la morfogénesis y 3.- la matriz extracelular o andamios, necesarios para vehicular las *stem cells* al lugar de la regeneración tisular, retenerlas en el espacio, determinar la morfología y permitir la llegada de oxígeno y nutrientes al nuevo tejido en formación.

Actualmente, se podría concretar el papel de las células madre en Odontología en diferentes campos:

- **Periodoncia regenerativa:** la periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica del periodonto, que puede producir una destrucción de los tejidos y pérdida de unión entre el diente y los tejidos de soporte¹⁸. En un intento de paliar la destrucción tisular se han utilizado injertos óseos, factores de crecimiento y membranas de barrera¹⁹. Una alternativa que nos brinda la ingeniería tisular es la posibilidad de regenerar el periodonto y la funcionalidad de todos sus tejidos, utilizando el tratamiento celular con *stem cells* de origen dental, administrada en andamios y proteínas morfogenas adecuadas. Se planteo la posibilidad de usar MSCs dentales, que tienen la ventaja de regenerar periodonto completo, y la facilidad de su obtención en la clínica dental, sin requerir una técnica invasiva²⁰. Uno de los grandes problemas ha sido la falta del ligamento periodontal. Un artículo más reciente nos muestra el trasplante de un germen dentario (diente en desarrollo), se extrajo el diente, se esperó 4 a 6 días, este órgano dental se insertó en un mecanismo de control de tamaño para después ser trasplantado. El germen almacenó tejido duro (esmalte), logró la extensión de la raíz y finalmente la función masticatoria²¹.
- **Cirugía (implantología):** La pérdida de uno o varios dientes requiere tratamiento con prótesis parciales o implantes. Sin embargo la osteointegración representa una conexión directa entre implante y tejido óseo, faltando el tejido periodontal y cemento que forma parte de la

estructura de un diente natural²². La capacidad de diferenciación multipotencial de PDLSCs para regenerar tejido blando y duro cuando se emplean andamios de ácido poliglicólico, demuestran cuando se insertan en la superficie de las raíces dentales de la regeneración de tejido óseo, cemento y fibras de colágeno bien orientadas. El uso combinado de MSCs transplantadas de origen dental, a las que se añade moléculas de señalización pueden acelerar la diferenciación de MSCs in vivo logrando una nueva regeneración de tejido periodontal. El último objetivo en ingeniería tisular odontológica es encontrar un método biológico que reemplace la pérdida del diente. Un implante basado en células y no en metal. Para que el diente formado sea funcional, necesita raíces, ligamento periodontal, nervios y vasos sanguíneos²³.

- **Endodoncia Regenerativa:** la pulpa dental es un tejido mesenquimal altamente especializado con capacidad de regeneración limitada. Si se produce una pulpitis, el tratamiento necesario es una endodoncia, todo ello implica una pérdida significativa de dentina, dejando un diente débil y desvitalizado para el resto de la vida, alcanza especial importancia cuando se produce trauma dental en paciente jóvenes con dientes inmaduros²⁴. En la actualidad se intenta minimizar las consecuencias negativas de la endodoncia, desarrollándose nuevas estrategias e tratamiento endodóntico, sustituyéndolo por la endodoncia regenerativa, campo emergente de la ingeniería tisular que ofrece resultados comprometedores y tiene como objetivo regenerar la pulpa dental²⁵.

La ingeniería del tejido pulpar es un campo que está en continua expansión y que tiene como objetivo el reemplazo de una pulpa inflamada o necrótica por una pulpa sana y un tejido funcionalmente competente, capaz de formar nueva dentina. La capacidad de las células madre diferenciadas para generar complejos dentinopulpares y complejos cemento-ligamento periodontal sugiere el posible potencial de éstas en procesos de

apicogénesis y tratamientos de apicoformación, que básicamente consisten en formar y cerrar el extremo final de la raíz del diente²⁶

- **Regeneración dental:** el tratamiento restaurador tradicional ante la pérdida dental en un diente sintético tal como se realiza en la práctica clínica actual, puede tener una alternativa en un futuro con la regeneración de un diente mediante ingeniería tisular y su implante posterior en mandíbula. El diente puede regenerarse de dos maneras, la primera; mediante técnicas de ingeniería tisular convencional consistentes en implantar in vitro, cultivando y expandiendo varias poblaciones de *stem cells* dentales, transportadas en andamios de polímeros²⁷. La segunda; implantando en mandíbula poblaciones de *stem cells* expandidas in vitro y transportadas en andamios de polímeros con la forma y tamaño de la porosidad adecuado para el diente que queremos regenerar. Se desconoce la respuesta inmune que puede producirse al implante dental biológico, por lo que el tratamiento ideal del reemplazamiento con diente formado con bioingeniería debe ser autólogo, evitando el riesgo potencial de respuesta inmunológica y rechazo consecuente²⁸.

Aunque ya existen una serie de investigaciones, que pretenden ir más allá hasta llegar a la regeneración completa de dientes (logrando que sean funcionales), aún falta un poco para que estas tecnologías lleguen de lo experimental a lo clínico, lo que sí es seguro, es que conforme pase el tiempo, los bancos de órganos dentarios, así como las regeneraciones por medio de células madre, marcarán la diferencia en la salud bucal en un futuro, ya que se podrá lograr formar un diente e implantarlo en cualquier momento de su formación, para que erupcione en boca y se logre su función²⁹.

La ingeniería tisular, específicamente en la odontología, se ha dado a conocer más durante los últimos años, sin embargo, se han realizado numerosas investigaciones y experimentos donde aún existen muchas dudas para su uso clínico, pero lo que sí está claro, es que esto será el futuro de la rehabilitación bucal en poco tiempo para finalmente poder lograr la regeneración de dientes completos.

Todas las técnicas regenerativas que podrían emplearse actualmente en la odontología presentan muchas ventajas y desventajas por lo que debe seguir trabajándose en su desarrollo para ser utilizadas adecuadamente. Por lo tanto, es prudente que continúen las investigaciones en este campo, con el fin de que este conocimiento pase del laboratorio a la práctica clínica permitiéndole al paciente mejorar la calidad de vida a través de terapias regenerativas de vanguardia³⁰.

1.5. CRITERIOS MÍNIMOS PARA DEFINIR *STEM CELLS*

Existen criterios mínimos para definir *stem cell* humanas, tanto para investigaciones científicas basadas en experimentación in vitro, como para estudios pre-clínicos según *The International Society for Cellular Teraphy position statemen* (ISCT) *Dominicci et al, 2006*³¹, *Flores et al, 2006*, *Salinas y Anseth, 2009*, *Rodríguez Lozano et al*. Dentro de estos criterios se mencionan:

- a) Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo
- b) Morfología celular fibroblastoide.
- c) Expresión de antígenos de superficie específicos, 95% de la población celular exprese fenotipo positivo para CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺, en células mesenquimales de origen dental CD44⁺ y STRO-1⁺ y CD34⁻, CD45⁻.
- d) Capacidad multipotencial de diferenciación a diferentes linajes, bajo condiciones estándar in vitro.

1.6. CLASIFICACIÓN DE SC DE ORIGEN BUCODENTAL

Existen diversos tipos de células madre de origen bucodental:

En los tejidos bucodentales, se obtienen SC con una capacidad de diferenciación multipotente, a partir de las siguientes estructuras²¹:

- **DPSC (*Dental Pulp Stem Cells*):** Células troncales de la pulpa dental. Fueron las primeras células madre dentarias que se aislaron³². Por analogía con las células madre de la médula, se consideró que había una comunidad de células multipotenciales en el tejido pulpar. Las células madre de la pulpa dental (DPSCs) han demostrado que el acceso al lugar donde se encuentran estas

células es fácil y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular³³.

- **PDLSC (*Periodontal Ligament Stem Cells*):** Células troncales de ligamento periodontal contiene poblaciones de células que pueden diferenciarse tanto hacia cementoblastos como hacia osteoblastos. Sus fibras colágenas generadas son capaces de unirse con la nueva estructura formada de cemento, imitando así la unión fisiológica de las fibras de Sharpey. Se puede decir que las PDLSC contienen un subgrupo de células capaces de diferenciarse hacia cementoblastos/cementocitos así como hacia células formadoras de colágeno³⁴.

- **SHED (*Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth*):** Células troncales de dientes deciduos exfoliados. Se han aislado células de la pulpa remanente de los dientes deciduos exfoliados, denominadas SHED. Los resultados revelaron que ésta, contenía una población de células madre multipotenciales diferentes a las aisladas anteriormente de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSC). Se consideran una fuente de stem cells de fácil obtención. sus características morfológicas se correspondían con el fenotipo de células madre epiteliales, pudiendo llegar a expresar marcadores epiteliales³⁵.

- **SCAP (*Stem Cells from the Apical Papilla*):** Células troncales de la papila apical. Existe una zona muy rica en células entre la papila apical y la pulpa, estas SCAP son las precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular. Las SCAP se muestran positivas para varios marcadores neurológicos, pero cuando se someten a estimulación neurológica, el número de marcadores aumenta notablemente³⁶.

- **Stem Cells de Mucosa Oral:** *Yang et al* (3013) aisló por primera vez a una población dentro de los tejidos gingivales, a las cuales denomino *Gingival Mesenchymal Stem Cells* (GMSC) con la capacidad de formar colonias clonogénicas. Son sensibles a marcadores superficiales que corresponden a las

células mesenquimales y poseen la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes mesodérmicos³⁷. Además de su capacidad de autorenovación y formación de estructuras como tejido conectivo, las GMSC tienen propiedades regenerativas y tienen funciones inmunoregulatorias.

- **DFPC (*Dental Follicle Precursor Cells*):** Célula troncal del folículo dental. El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación. Este tejido contiene *stem cells* que son las que acabarán formando el periodonto, constituido por cemento, ligamento, hueso alveolar y encía. Ha sido considerado como un tejido multipotente³⁸, estas células se pueden mantener en cultivo durante al menos 15 pasajes. Pueden diferenciarse en cementoblastos *in vitro* y son capaces de formar cemento *in vivo*. Las células de folículo dental tienen la capacidad de formar ligamento periodontal después de la implantación *in vivo*³⁹.

- **HTGSCs (*Human Tooth Germen Stem Cells*):** Células mesenquimales del germen dental, se han reportado en la última década que contienen células pluripotentes que dan lugar a estructuras dentales y periodontales. Las células mesenquimales del germen dental mostraron la capacidad de diferenciarse en osteogénico, adipogénico y neurogénico⁴⁰.

- **Células mesenquimales de dientes supernumerarios (*stem cells from a supernumerary tooth*):** *Huang et al.*, (2008)⁴¹ aisló células mesenquimales de pulpa dental a partir de mesiodens. En estudios anteriores se ha aislado este mismo tejido, sólo que de terceros molares. Este estudio dio pauta a una diferente fuente de aprovechamiento como son los dientes supernumerarios. Los resultados de *Huang et al.*, sugiere que la pulpa dental de mesiodens tienen características comunes a las DPSCs de terceros molares, lo que los convierte en una fuente viable en la regeneración de tejidos.

- **Células mesenquimales de la Bola de Bichat (*Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad*):** *Broccaioli et al.*, (2013)⁴² aisló células

mesenquimales obtenidas de la grasa encapsulada encontrada en los carrillos, comúnmente denominado bola adiposa de bichat. Este tejido expresó características de células mesenquimales como positividad a marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, negativo CD14, CD31 y CD34, con diferenciación a tejido osteogénico y adipogénico, demostrando así su potencialidad en la regeneración de tejidos.

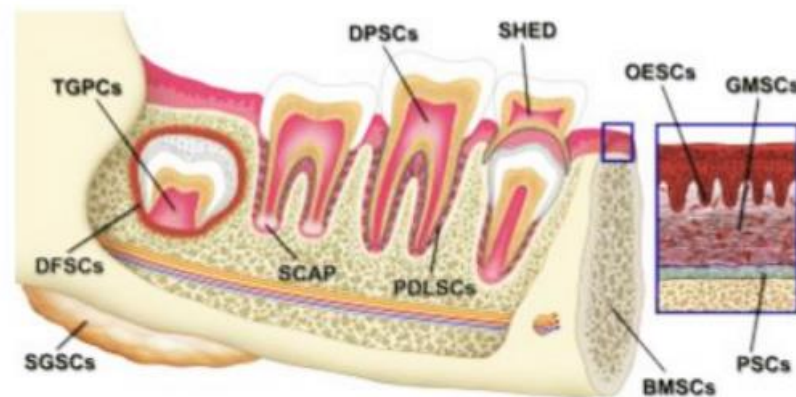


Fig 1; SC de origen bucodental.

1.7. FOLÍCULO DENTAL

El folículo dental es un tejido conectivo blando, de origen mesenquimal, que rodea al órgano del esmalte y la papila dental del germen dentario en desarrollo. Se forma durante la etapa de copa (odontogénesis), a partir de una población de células progenitoras del ectomesénquima que derivan de crestas neurales. Corresponde a una fuente rica en stem cells que pueden persistir durante la vida adulta en caso de dientes impactados (terceros molares)⁴³. Una importante función biológica del folículo dental es la coordinación de la erupción del diente⁴⁴. Además, este tejido alberga células progenitoras para el periodonto. Se cree que las células del folículo dental cerca de la raíz de conformación (más interna) se diferencian en la formación de cemento y cementoblastos y que las células hacia el hueso alveolar (más

externa) se diferencian a osteoblastos y secretan matriz ósea. Las células del folículo dental que se encuentran en el centro entre las células precursoras cementoblasto y osteoblastos se desarrollan en los fibroblastos que producen la matriz extracelular (ECM) de la PDL⁴⁵.

1.7.1. EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGÍA DEL FOLÍCULO DENTAL

Tiene origen del ectomesénquima, este tejido se encuentra inmediatamente por fuera del casquete, rodeándolo casi en su totalidad, salvo en el pedículo que se condensa volviéndose fibrilar formando el folículo dentario primitivo, esto comienza en el estadio de casquete. Su formación continúa en el estadio de campana que ocurre sobre las catorce a dieciocho semanas de vida intrauterina, en el que se observan modificaciones estructurales e histoquímicas.

En esta etapa es cuando más manifiesta su estructura. Está formada por dos capas: una interna celulo-vascular y otra externa o superficial con abundantes fibras de colágena, esta fibras se disponen en forma circular envolviendo al germen dentario en desarrollo. La colágena presente a este nivel es de tipo I y III.³⁵

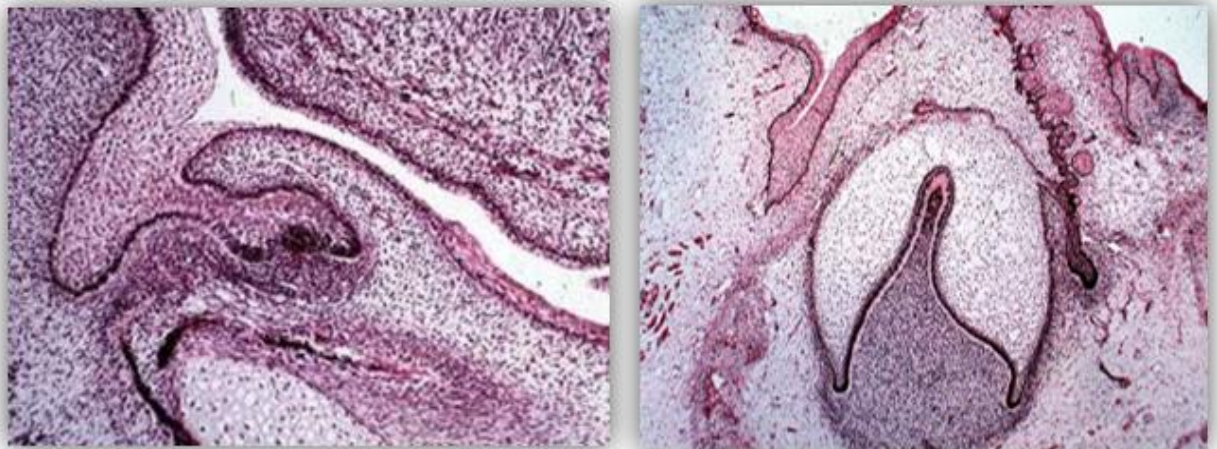


Fig.2 a) Estadio de Casquete, Gómez Ferraris; b) estadio de campana Gómez Ferraris

De la capa celular constituida por células mesenquimáticas diferenciadas derivan los componentes del periodoncio de inserción: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Las células mesenquimatosas que se diferencian hacia hueso alveolar son ricas en glucógeno, al igual que ocurre en otras ubicaciones en las que el tejido mesenquimatoso evoluciona hacia tejido óseo⁴⁶.

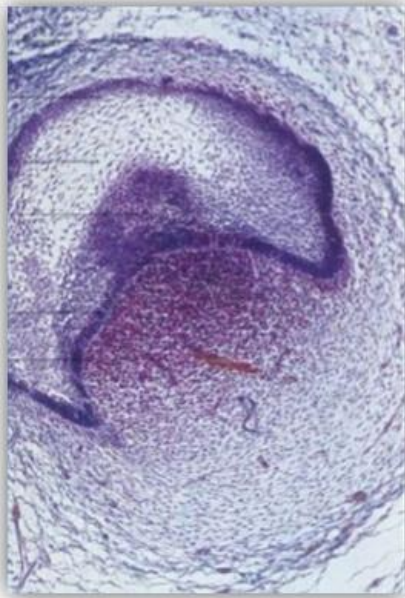


Fig.3 Saco Dental, Gómez Ferraris

Tanto la inervación, como la irrigación presentan dos variedades, una destinada al saco y la otra a la papila, donde los vasos y nervios atraviesan el saco para distribuirse por la misma.

1.8. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES REPORTADAS DE DFPC

El aislamiento y la primera caracterización de las células precursoras (PCs) derivados del folículo dental humano de los terceros molares extraídos fue en el 2004 por C. Morsczeck. Se cree que este tejido contiene células madre y linaje comprometido células progenitoras o células precursoras (PCs) para cementoblastos, células del ligamento periodontal, y osteoblastos⁴⁷.

Estas células tienen la capacidad de adherirse a un sustrato de plástico, son clonogénicas y tienen la capacidad de proliferar in vitro en condiciones

adecuadas. Por otra parte, las PCs tienen la capacidad de diferenciarse en condiciones in vitro a una membrana como la estructura con nódulos calcificados. Se examinó la expresión génica de las células del folículo dental humana recién aisladas durante la diferenciación osteogénica in vitro. Se encontraron Notch- 1 y nestina en el tejido del folículo dental como marcadores probables para las células no diferenciadas⁴⁸. Fue descrito Notch- 1 como un marcador para las células madre neuronales y de las células madre dentales⁴⁹. Notch- 1 activa células precursoras mesenquimales suprime la diferenciación osteoblástica in vitro⁵⁰. Además Notch- 1 juega un papel crítico en el desarrollo mamario humano normal actuando sobre ambas células madre y células precursoras, afectando la autorrenovación y diferenciación de linaje específico.

Se diferenciaron las células del folículo dental con dexametasona o protocolos basados en la insulina en estructuras parecidas a membranas que contienen focos de mineralización³⁹. Se demostró la diferenciación de las células de folículo dental con un protocolo basado en la insulina por primera vez.

Se presentó la inmunolocalización de STRO-1 (un marcador de células progenitoras mesenquimales multipotenciales) y receptores de BMP (BMPR) en el folículo dental in vivo⁵¹.

Se demostró que las células madre de folículo dental de molares y caninos se pueden utilizar para mejorar la regeneración de hueso en las superficies de los implantes de titanio. Este estudio manifiesta la presencia de células madre en folículo dental su potencial para adherirse y diferenciarse en osteoblastos en diferentes tipos de superficies de titanio con diferentes recubrimientos bioactivos, hidroxiapatita (TIHA) y con silicatitanate (TiSiO₂), e implantes porosos Ti6Al7Nb como control (TiCtrl). Fue estudiada en términos de la adhesión celular y la viabilidad, demostrando así que las células madre tienen una tendencia espontánea para la diferenciación osteogénica y se puede utilizar para mejorar la regeneración del hueso en las superficies de los implantes de titanio⁵².

Las DFPC tienen la capacidad de formación de grupos celulares clonogénicas adherentes a la caja de cultivo CFU-F (unidad de formación de colonias fibroblásticas), similar a las observadas para diversas poblaciones de células madre mesenquimales.

La población de células madre de folículo dental expresa altos niveles de survivina y telomerasa, que son ambas moléculas importantes en la mediación de la proliferación celular, esta evidencia sugiere que las DFPC al ser derivadas de un tejido en desarrollo puede representar una población de progenitores tempranos que tienen ventajas sobre su uso en la regeneración de tejidos.

Se comprobó que las células aisladas y cultivadas de pulpa y folículo dental correspondían a células madre mesenquimales humanas, siendo éstas últimas más fáciles de obtener y proliferar. Las CMM de folículo dental poseen mayor potencial de crecimiento y capacidad de diferenciación en comparación a las CMM de pulpa dental, probablemente debido a su estado evolutivo más inmaduro⁵³.

1.8.1. DIFERENCIACIÓN DE LAS STEM CELL

Las células madre pueden hacer células especializadas nuevas. A ese proceso se conoce como diferenciación, esta hace que las células puedan adoptar propiedades de fenotipo, bioquímicas y propiedades funcionales de las células más diferenciadas.

El tejido adiposo representa una alternativa de recurso de células troncales. Siendo abundante en tejido adiposo blanco murino (tejido celular subcutáneo)⁵⁴.

La obtención de estas células adiposas troncales, no requiere una implicación quirúrgica compleja, por lo que cabe resaltar que es un recurso de fácil obtención mediante lipoaspirados de zonas con tejido adiposos en el cuerpo (mencionados anteriormente)⁵⁵.

La investigación con células madre adiposas se inició en el año de 1992 con Zuk y colaboradores, cuando los investigadores utilizaron la grasa peritoneal porcina, encontrando una morfología similar a las células adiposas subcutáneas humanas, en los cultivos con Factor Vascular Estromal (SVF) de las células en los medios de comunicación con la heparina y el factor de crecimiento de células endoteliales. Y se ha demostrado la existencia de células madre mesenquimales multipotentes, que residen en la región perivascular del estroma⁵⁶.

Estas células mesenquimales tienen la capacidad de diferenciación en linajes endodérmicos y ectodérmicos. Este tejido es un recurso con características de pluripotencialidad y diferenciación mesenquimal y no mesenquimal; además de ser de fácil acceso mediante lipoaspirados.

Estudios *in vitro* demuestran que las células poseen una adherencia plástica, con una expansión favorable para la terapia regenerativa y la caracterización de estas células sin ninguna alteración cromosómica⁴⁷.

Dichas características antes mencionadas de las ASC, sugieren una buena aplicación en la medicina regenerativa, en el trasplante de células troncales autólogas y siendo utilizado en la cirugía plástica para la reconstrucción de tejidos enfermos. Pero también tienen la capacidad de diferenciarse en estirpes multipotenciales, como son osteoblastos, condrocitos, miocitos, células epiteliales y células neuronales⁵⁷.

1.8.2. DIFERENCIACIÓN DE TEJIDO ADIPOSO

Adipogénesis es un proceso por el que las células madre mesenquimales o preadipocitos se diferencian para adquirir características fenotípicas de adipocitos maduros. Los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso *in vitro* se presentan típicamente en una secuencia bien definida, que ha sido descrito a fondo⁵⁸. En resumen, el proceso adipogénico comienza con un compromiso de diferenciación de adipocitos caracterizado por la activación de los factores de transcripción/potenciador de unión proteínas CCAAT (C / EBP) -b y -d, y - esterol regulador elemento proteína 1 determinación/diferenciación de los adipocitos y el

factor 1 de unión (SREBP1 / ADD 1). El compromiso Adipogénico a su vez conduce a la transcripción de los factores específicos de adipocitos pivotaes de transcripción (C / EBPA) y peroxisoma activados prolifera el receptor -G (PPAR- g). Esta etapa es entonces, para algunos tipos de células, seguido por la expansión clonal y la detención del crecimiento antes que la diferenciación termine. Las etapas posteriores de diferenciación adipogénica se caracterizan por la transcripción de los marcadores finales, tales como ácido graso de unión a proteína aP2 y la adiponectina, así como la acumulación intracelular de vesículas lipídicas⁵⁹.

1.9. TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es una variedad especializada de tejido conjuntivo; integrado por un grupo de células denominadas adipocitos o células adiposas, especializadas en almacenar grasas o lípidos, sustancias consideradas como la fuente de reserva de energía química más importante de un organismo animal. El tejido adiposo se constituye por la unión, mediante fibras reticulares (colágena tipo III), de los adipocitos. Entre ellos discurre abundante irrigación sanguínea. Las células adiposas, al unirse, forman lobulillos y éstos constituyen lóbulos adiposos. La distribución del tejido adiposo es casi general en el cuerpo humano. Existen lugares en donde el tejido adiposo se acumula aún en mayor cantidad, por ejemplo: en el tejido subcutáneo, formando el “panículo adiposo”; en la palma de las manos y la planta de los pies, en la región perirrenal, en el tejido conjuntivo que rodea a ciertos órganos como en el pericardio, alrededor de las vísceras abdominales (omentos mayor y menor), por detrás del globo ocular; en las glándulas mamarias y en la región glútea.

1.9.1. HISTOGÉNESIS DEL TEJIDO ADIPOSO.

Los adipocitos se diferencian de células mesenquimatosas, en el quinto mes fetal. Hacen su aparición en el citoplasma de ellas, gotitas de lípidos, a partir de este momento se denominan *adipoblastos* o *adipocitos inmaduros* que van confluyendo para constituir una gran gota de grasa que ocupa casi la totalidad del volumen de la célula, obligando al núcleo, citoplasma y organelos a ocupar una posición periférica del *adipocito* o adipocito maduro. Así se originan las células de la grasa unilocular.

A diferencia del mecanismo anterior, en los adipoblastos de la grasa parda, las gotitas de lípidos no confluyen, sino que permanecen separadas entre ellas, recubiertas por filamentos de vimentina y por pequeñas porciones de citoplasma.

El adipocito es un tipo celular derivado del fibroblasto cuya principal función es almacenar lípidos, en concreto triglicéridos y colesterol esterificado, como reserva energética. Existen dos tipos de adipocitos, el blanco y el pardo, que forman dos tipos de tejido graso. El adipocito blanco se caracteriza por tener una sola vesícula de grasa que ocupa casi todo el volumen celular quedando el citosol, los orgánulos y el núcleo en una estrecha franja periférica. El adipocito pardo tiene menos cantidad de grasa presentando un mayor número de vesículas de menor tamaño además de un gran número de mitocondrias. El tejido adiposo pardo tiene como principal función generar calor y el tejido adiposo blanco está especializado en el almacenamiento de lípidos como reserva energética a largo plazo.

Las células adiposas una vez diferenciadas, no suelen reproducirse. Después del nacimiento se formarán nuevos adipocitos por especialización de células mesenquimatosas.

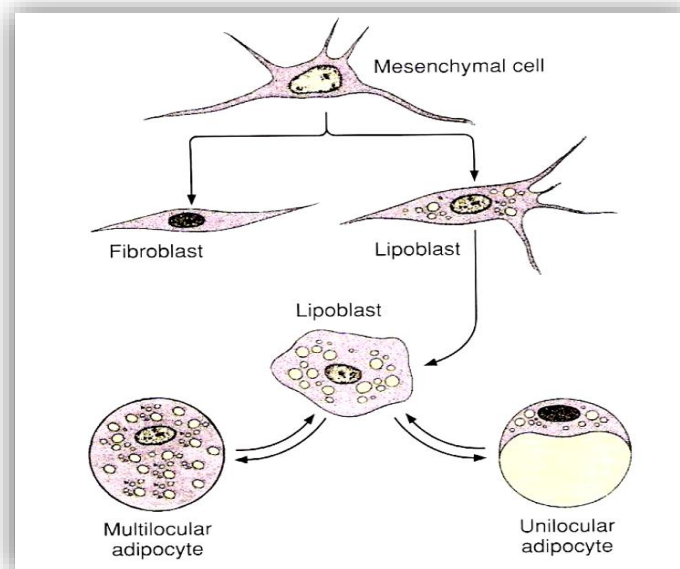


Fig. 4 Histología de la Adipogénesis

1.9.2. FUNCIONES DE TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo cumple las siguientes funciones:

- Interviene como un reservorio de energía química.
- Modela la superficie corporal.
- Forma almohadillas amortiguadoras.
- Conserva la temperatura corporal, pues es un mal conductor del calor.
- Ocupa espacios entre los tejidos y órganos manteniéndolos en sus posiciones.

La presente investigación pretende realizar la descripción, revisión, análisis y una interpretación en forma experimental en relación al origen, cultivo, aislamiento, caracterización de *stem cells* de folículo dental humano, así como marcadores candidatos y su diferenciación a tejido adipogénico con el fin de ofrecer perspectivas de futura aplicación en clínica. Estos procesos experimentales son fundamentales para encontrar una futura terapia celular aplicada al desarrollo de células adipogénicas. La posible afabilidad de estas células, podrán proporcionar nuevos paradigmas e innovadoras teorías hacia el campo de la medicina regenerativa y de la ingeniería tisular.

2. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

En la clínica Odontología Cuauhtepc, FESI, UNAM, se recolectaron órganos dentarios (terceros molares impactados) sin caries, de pacientes sanos entre 16 y 20 años de edad. Se mencionó y lleno cuidadosamente cada uno de los anexos de donación de órganos dentarios a desarrollarse.

-Se realizó antisepsia en la cavidad oral, con un enjuague de clorhexidina al 0.12% durante un tiempo de 30 segundos antes del procedimiento quirúrgico.



Fig.5 a) extracción del órgano dental; b) colocación del órgano en medio de transporte. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

2.2. TRANSPORTE DE LA MUESTRA

- Las muestras fueron transportadas en un tubo de punta cónica de 15 ml (KIMA) con 3 ml de medio antibiótico, antimicótico y salino (penicilina 100U/ml, estreptomina 100 µg/ml, anfotericina B 5µg/ml) (SIGMA), para la preservación profiláctica de la muestra y su posterior cultivo.
- Las muestras fueron preservadas a una temperatura aproximada de 4°C.

2.3. AISLADO Y CARACTERIZACIÓN.

2.3.1. POR EXPLANTE:

- Llegada la muestra al laboratorio, se lavó el órgano dentario con suero fisiológico y se colocó en un nuevo medio de transporte (solución fisiológica con

Penicilina (1000U/ml) /Estreptomicina (1mg/ml) /Anfotericina B (2.5mg/ml) SIGMA ALDRICH) a una temperatura de 4°C, durante 24 horas.

- Transcurridas las 24 hrs., se preparó la campana de flujo laminar (Telstar BIO II ADVANCE) con etanol al 70% y luz ultravioleta durante 15 min. Todo material e instrumental introducido al área blanca fue empapado de alcohol al 70%.

- Dentro de la campana de flujo laminar el tejido del folículo fue cuidadosamente disecado de la corona dental y cortado en varias piezas de 1mm³ (Fragmentación mecánica), con hoja de bisturí n° 15 y con ayuda de una cucharilla.

- Los explantes fueron colocados en las cajas tipo Falcón (NUNC) de manera ordenada en forma lineal y equidistante una de otra. (Aproximadamente líneas de 5 X 4). Fig 6.



Fig.6 Técnica de cultivo por explante, Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

- Después de haber colocado los explantes, se esperó durante 10 minutos, para lograr adhesión a la caja de cultivo, Se agregó 5ml. de Medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle's modificado por Dulbbeco, SIGMA-ALDRICH), enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO) Penicilina (1000U/ml) /Estreptomicina (1mg/ml) /Anfotericina B (2.5mg/ml) SIGMA ALDRICH), de manera suave, fluida y constante.

- Las cajas de cultivo fueron colocadas en la incubadora con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C (Binder modelo CB150UL).

- El medio de cultivo fu reemplazado con la ayuda de una pipeta de 5ml., por cultivo fresco, dos veces por semana, durante un mes.



Fig.7 Incubación de los explantes en incubadora Binder, Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional.

- Transcurrido este tiempo se esperó a que las células hayan proliferado en toda la extensión de la caja y tomen forma fibroblastoide, que corresponde a la morfología descrita para las células mesenquimales de folículo dental.

2.3.2 POR DIGESTIÓN ENZIMÁTICA:



Fig. 8 Colagenasa y dispasa utilizados para la preparación de la técnica digestión enzimática, Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería

Se preparó colagenasa tipo I (3g por 1ml) de solución salina y Dispasa, en una concentración de 4g sobre 1ml de solución salina. El tejido del folículo fue cuidadosamente disecado de la corona dental y cortado en varias piezas de 2mm a 3mm (Fragmentación mecánica). con hoja de bisturí n°15 y con ayuda de una cucharilla.

- Los fragmentos obtenidos de tejido se colocaron en tubos de punta cónica de 15ml (star dent) en preparación de colagenasa tipo I y al 2% y dispa diluida con solución salina al 0.9%, siendo un total de 3ml durante 2hrs en incubadora a 37°C.
- Se agregó medio de cultivo 1/1 para detener digestión enzimática.
- Se centrifugó a 1000rpm durante 10 min a una temperatura de 25°C.
- Posteriormente, se desechó el sobrenadante cuidadosamente con micropipetas, recogándose el pellet celular.
- Se resuspendió el medio con el pellet y se colocó en toda la extensión de la caja falcom. Se dejó durante 10 min para lograr la adhesión en la caja de cultivo.

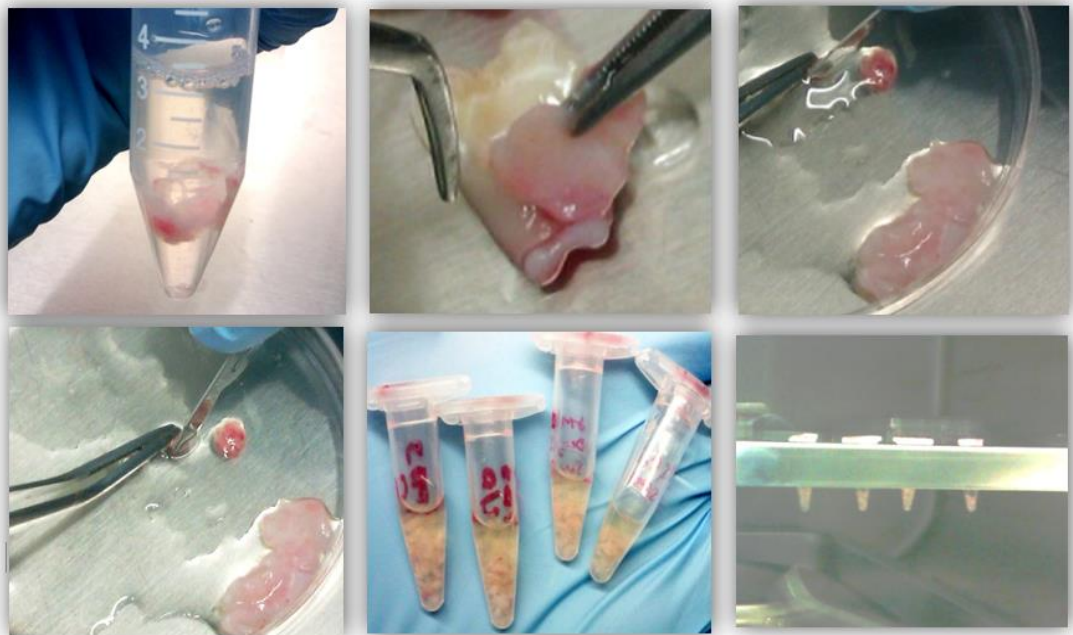


Fig. 9 Técnica de Digestión Enzimática. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

- Posteriormente, se incubó a 37 ° C (incubadora BINDER) en una solución que contiene 5ml. de Medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle's modificado por Dulbbeco, SIGMA-ALDRICH), enriquecido con 10% de Suero Fetal

Bovino (GIBCO) Penicilina (1000U/ml) /Estreptomicina (1mg/ml) /Anfotericina B (2.5mg/ml)SIGMA ALDRICH).

- El medio de cultivo fue reemplazado con la ayuda de una pipeta de 5ml., por cultivo fresco, dos veces por semana, durante un mes.
- Pasado este tiempo, se esperó que las células hayan proliferado en toda la extensión de la caja y tomen forma fibroblastoide.

2.4. OBTENCIÓN DE PRIMER PASE

2.4.1. SEPARACIÓN CELULAR:

- Se retiró el medio de cultivo de la caja Falcón (NUNC), y se le agregó 5ml de Tryple Express (GIBCO) Posteriormente se incubó (BINDER) por 5 min. con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C.
- Transcurrido este tiempo, se observó al microscopio óptico invertido (LEICA) que las células se hallan despegado de la caja de cultivo (se deberá observar una morfología redondeada, en suspensión en el medio de cultivo, lo cual demostró que las células se hayan desprendido del plástico, de ser así, se les agregó 3 ml de medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle's modificado por Dulbbeco, SIGMA-ALDRICH), esto para detener el efecto del tryple express, en caso contrario se incubó de nuevo por 2 minutos.
- El contenido fue colocado cuidadosamente con ayuda de una pipeta de 5 ml. en tubos de 15ml. (KIMA) y posteriormente se colocó en la centrífuga (SIGMA modelo 1-14) durante 10 minutos a 1000 rpm. Se retiró con mucho cuidado el sobrenadante, procurando de no mover el pellet, posteriormente con una micropipeta se colocó las células en una cantidad de 0.200 ul. en cajas Falcon de 75cm². Se agregó 20ml. de Medio de cultivo DMEM (SIGMA-ALDRICH), enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO) Penicilina (1000U/ml) /Estreptomicina (1mg/ml) /Anfotericina B (2.5mg/ml) SIGMA ALDRICH).

- Las cajas de cultivo se colocaron en la incubadora con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C (BINDER).
- El medio de cultivo fue reemplazado con la ayuda de una pipeta de 25ml., dos veces por semana, durante 15 días o hasta que llegue al 80% de confluencia, para así obtener el siguiente pase celular.
- Este procedimiento se realizó nuevamente para obtener los siguientes pases celulares.

2.5. PURIFICACIÓN MAC´S (MAGNETIC ACTIVATED CELL SORTING)

El principio de separación mediante Magnetic activated cell sorting (MACS), consiste en que las células CD44 positivas están magnéticamente etiquetadas con microperlas con el anticuerpo CD44. La suspensión celular se carga en una columna MAC´S, colocada en el campo magnético de MAC´S separador, las células CD44+ marcadas magnéticamente se retienen dentro de la columna, las células no marcadas pasan a través de la columna, estas células se pueden obtener como una fracción celular seleccionada positivamente.

CD44 MicroBeads, human. Miltenyi Biotec

El buffer de separación para 50ml se preparó con:

- BSA: 0.5% = 25mg
 - EDTA: 2mM = 38mg
 - PBS: hasta llegar a 50ml
- Tanto las células como el Buffer se mantuvieron a baja temperatura (2-8°C) para evitar obstruir las columnas
 - Se despegaron las células de la caja de cultivo (Punto # 4 separación celular).

- Obtenido el pellet, se le agregó 5ml del buffer de separación, con el fin de lavar las células, se resuspendieron hasta que no quedarán sedimentos.

Determinar número de células:

- Se realizó el método de tinción con azul tripán y conteo celular en cámara de Neubauer.
- Se mezcló 10µl de azul tripán en papel parafilm y 10µl del pellet celular.
- Se llevó a la cámara de Neubauer colocando un cubreobjetos encima. Entre el, la cámara y el cubreobjetos se depositó la suspensión celular. El conteo se realizó de la siguiente manera: se contaron todas las células que habían en un sólo cuadrante. Primero las muertas, fueron teñidas por el azul tripan, las viables o vivas no fueron teñidas.

- Ejemplo:
$$\frac{n^{\circ} \text{ células vivas} \times 10000 (1ml)}{4 (n^{\circ} \text{ de cuadrante})} (2)|(5)=$$

- Se centrifugó la suspensión celular por 10 minutos a 1000rpm.
- Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 80 µL de solución buffer por 10^7 de células.
- Se añadió 20µl de CD44 por cada 10, 000,000 de células.

20µl-----10, 000,000
X-----n° cel. Contadas

- Se mezcló perfectamente y se incubó por 15 minutos en el refrigerador (2-8° C)
- Se lavaron las células con 1 o 2 ml de Buffer y se centrifugó a 1000rpm por 10min. y se retiró el sobrenadante.
- Se resuspendió en buffer, 500ul por cada 10^8 células.

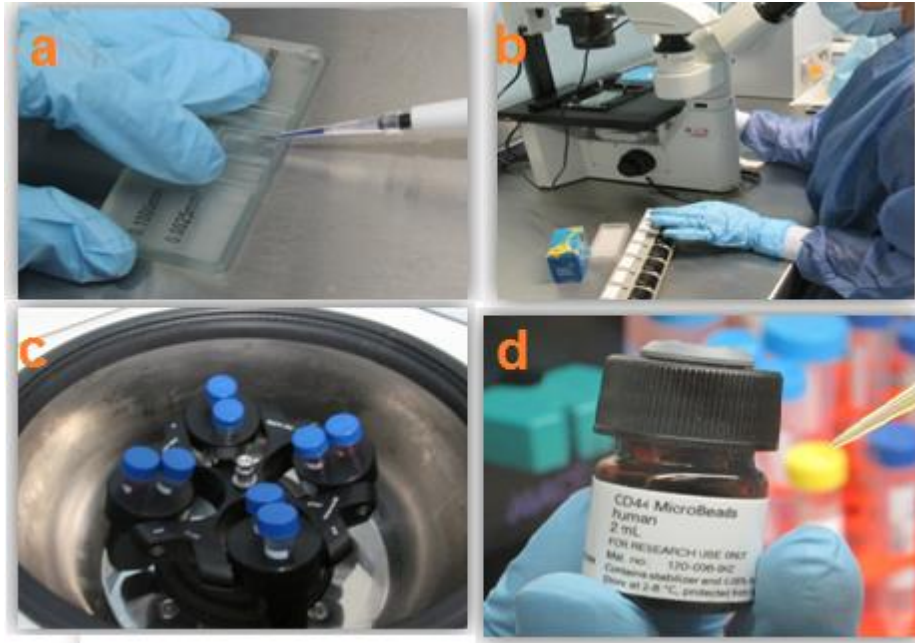


Fig. 10 a) y B), Conteo Celular, c) centrifugado, D) CD44MicroBeads. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

Separación magnética:

- Se seleccionó la columna de acuerdo a la cantidad de células que se deseen filtrar.
- Se colocó la columna, debajo de ella un tubo de 15ml donde cayeron las células que no sean positivos al anticuerpo CD44
- Se preparó la columna colocando 3ml de Buffer de 1ml en 1ml 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 lava con 3 ml de buffer para retirar las células que no sean positivos al anticuerpo CD44 de las paredes.
- Al terminar de caer la última gota, esta se retiró y se le colocó de una sola intención el émbolo para depositar las células en un tubo de 15ml.
- Las células fueron centrifugadas a 1000rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se colocó 3ml de DMEM, se resuspendió el pellet y posteriormente se sembró en una caja de 75cm².

- Se esperó unos minutos para que haya adhesión a la caja y se colocó medio de cultivo.
- Fueron incubadas a 37°C y CO₂ al 5 % se esperó a obtener el 80% de confluencia, para realizar los ensayos correspondientes.



Fig.11 Separación celular por medio de MACs. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

2.6. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

2.6.1. PRUEBA DE TRONCALIDAD

La inmunocaracterización consiste en marcar estructuras específicas detectadas mediante anticuerpos marcados para revelar, mediante microscopía, la presencia “*in situ*” de antígenos. Estos anticuerpos pueden estar unidos directa o indirectamente a moléculas fluorescentes, a enzimas o partículas de oro coloidal, de modo que las estructuras marcadas deben ser reconocidas a moléculas fluorescentes, por un microscopio de inmunofluorescencia.

Procedimiento

- En cajas de 24 pocillos, fueron colocados cubreobjetos redondos. En cada uno se colocaron 100 μ l de la línea celular y se agregó medio DMEM (SIGMA), suero fetal bovino (FCS) (GIBCO) al 10%. Se incubaron por 24 horas en ambiente húmedo al 100%, CO₂ al 5% y a una temperatura de 37°C (BINDER).
- Para este proceso los cultivos fueron preparados de la siguiente manera:

Procedimiento:

- Se lavó con PBS durante 2 minutos, tres veces.
- Se fijó con solución fijadora durante 30 min (100 μ L por pocillo).
- Repitiendo el lavado de PBS 3 veces.
- Se permeabilizó con Tritón X 100 (SIGMA) (100 μ L por pocillo) por 20 minutos.
- Repitiendo el lavado de PBS 3 veces.
- Fueron bloqueadas por un tiempo de 45 minutos con BSA (Santa Cruz Bio.) (200 μ L por pocillo)
- Repitiendo el lavado de PBS 3 veces.
- Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario (100 μ L de CD44) se dejó 1hr a temperatura ambiente y otra prueba toda la noche a 4°C.
- Repitiendo el lavado de PBS 3 veces.
- Se Colocó el anticuerpo secundario (Alexa 488) con una dilución 1:500, diluyendo con solución bloqueadora por 1hr a temperatura ambiente, y en otra prueba toda la noche a 4°C. Se realizó a oscuras y fue tapado muy bien con papel aluminio.
- Enseguida, en otros seis pocillos se incubaron las muestras con el primer anticuerpo, 100 μ L de CD44 (Abcam) a 45 minutos a temperatura ambiente.
- Se realizó lavado 3 veces con agua.

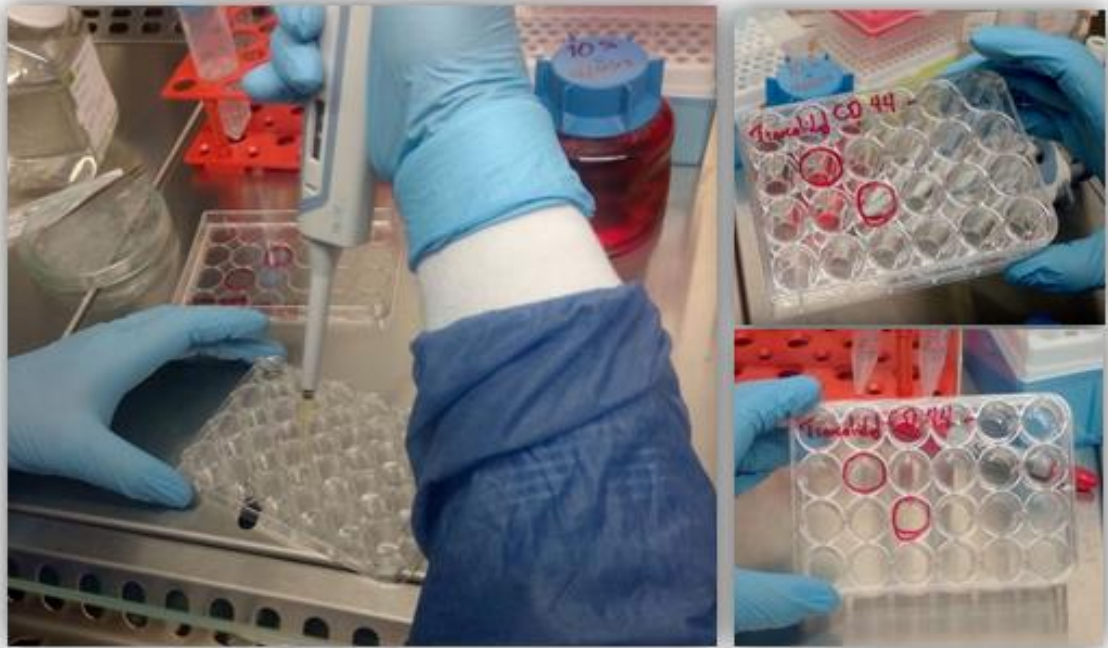


Fig. 12. Preparación de las muestras para prueba de troncalidad, siembra de células en pocillos. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

2.6.2. DAPI

4'6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro, es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN de doble cadena (dsDNA), tiñendo de azul el ADN, tiene una molécula de colorante para cada base de 3 pares. La unión de DAPI a dsDNA produce un aumento de fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente. Es utilizado ampliamente en la microscopía de fluorescencia, siendo este un marcador nuclear.

- Se retiró el medio de cultivo por medio de una punta de micropipeta de 1000 μ l (BIOLOGIX) y micro-pipeta de 100-1000 μ l

- Se colocaron 3 μ l de DAPI (SIGMA-ALDRICH) por muestra
- Se le adicionó papel aluminio sobre toda la caja de 24 o 96 pocillos.
- Se dejó Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se observó a través de microscopio de fluorescencia (ZEISS HXP 120 C)
- Las lecturas se realizaron con el programa ZEN lite 2012.
- Fueron realizados 3 ensayos a partir de 7, 14 y 21 días respectivamente.

2.6.3. LIVE/DEAD:

Este ensayo está basado en la determinación simultánea de las células vivas y muertas por medio de dos pruebas:

- 1) Actividad esterasa intracelular.
- 2) Integridad de la membrana plasmática.

Consta de dos principales componentes:

1) la calceina AM que no es fluorescente, es absorbida por las células vivas siendo transportada a través de la membrana celular. La actividad de las enzimas esterasas transforma la calceina AM en calceina fuertemente fluorescente, esta es retenida por las células vivas provocando que fluoresca intensamente en color verde.

2) El Homodímero de Etidio, penetra en las células con daño en la membrana y aumenta su fluorescencia tras unirse a ácidos nucleicos, produciendo de esta manera una fluorescencia de color rojo brillante en las células muertas.

PROCEDIMIENTO

Preparación de solución:

- 997.5 μ l de PBS (SIGMA)

- 0.5 μ L de Calceina (INVITROGEN)
- 2 μ L Homodímero de etidio-1 (INVITROGEN)
- 1000 μ L en total
- Se retiró el medio basal DMEM (BIOWEST)
- Se lavaron las muestras 2 veces con PBS (Biowest)
- Se colocó 300 μ l de la solución de L/D por muestra; el procedimiento se realizó sin luz. Es importante recubrir los pocillos con papel aluminio
- Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Pasado el tiempo se realizaron las observaciones en microscopio de fluorescencia ZEISS HXP 120 C con el programa ZEN lite 2012.
- A la observación microscópica de fluorescencia las células vivas mostraron fluorescencia color verde.
- A la observación microscópica de fluorescencia las células muertas o no viables mostraron fluorescencia color roja.
- Fueron realizados 3 ensayos a partir de 7, 14 y 21 días respectivamente.

2.6.4. EDU PROLIFERATION

La medición de la capacidad de una célula a proliferar es un método fundamental para la evaluación de la salud celular, la determinación de genotoxicidad, se realiza mediante la medición directa de la síntesis de ADN.

EdU (5-etinil-2 ´desoxiuridina) es un análogo de nucleósido de timidina y se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN.

a) Preparación de soluciones:

Permitir que los viales alcancen la temperatura ambiente.

- Se añadió 2 ml de DMSO (Componente C) al componente A para hacer una solución 10mM EdU. (se conservó a -20 °C).
- Para realizar una solución 1X de tampón de reacción EdU se añadió 36 ml de agua desionizada para el Componente D. (se conservó a 2-8 °C).

- Para hacer la solución 10X-it® EdU búfer aditivo, se añadió 2 ml de agua desionizada para componente F, se mezcló perfectamente. (se conservó a -20 ° C)
- Se diluyó Hoechst 33342 (componente G) 1: 2000 en PBS para obtener una solución 1X.

b) Se sembraron células sobre cubreobjetos y se incubaron durante la noche.

- En cajas de 24 pocillos, fueron colocados cubreobjetos redondos, en cada uno se colocaron 100 µl de la línea celular y se agregó medio DMEM (SIGMA), suero fetal bovino (FCS) (GIBCO) al 10%, se incubaron por 24 horas en ambiente húmedo al 100%, CO2 al 5% y a una temperatura de 37°C (BINDER).
- Se diluyó 10 µl de 10 mM EdU solución stock en 5 ml de medio de cultivo tisular precalentado para hacer una solución de 20 mM EdU etiquetado (suficiente para 10 cubreobjetos).
- Se retiraron la mitad del medio de las células.
- Se reemplazaron con un volumen igual de solución de etiquetado EdU (concentración final de 10 mM).
- Se incubaron las células en condiciones de crecimiento apropiadas y tratamientos durante dos horas.
- Se procedió inmediatamente a la fijación y permeabilización

c) Fijar y permeabilizar las células

- Se transfirió cada cubreobjetos en un pocillo de una placa de 6 pocillos.
- Se añadió 1 ml de 3,7% de formaldehído en PBS a cada pocillo.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el formaldehído y se lavó dos veces con 1 ml de 3% de BSA en PBS.

- Se retiró la solución de lavado y se añadió 1 ml de 0,5% Tritón X-100 en PBS a cada pocillo.
- Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Detección de EdU.

Se realizó EdU búfer aditivo 1X-it® diluyendo la solución 10X creada por encima 1:10 en agua desionizada. Preparamos Click-it® Plus cóctel reacción para 2 cubreobjetos: 860 µL de 1X Click-iT® reaction buffer, 40 µL de Copper protectant (Component E, 2.5 µL de Alexa Fluor® picolyl azide (Component B), 100 µL de 1X Click-iT® EdU buffer additive para obtener un volumen de 1ml.

- Posteriormente se retiró la solución de permeabilización de las células y se lavó dos veces con 1 ml de 3% de BSA en PBS.
- Se retiró la solución de lavado.
- Se añadió 0,5 ml de Click-it® Plus cóctel de reacción a cada pocillo, brevemente para asegurar una distribución uniforme de cóctel de reacción.
- Se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- Se retiró el cóctel de reacción y se lavó cada pocillo una vez con 1 ml de 3% de BSA en PBS.

Tinción Nuclear

- Se realizó el etiquetado de anticuerpos de las muestras en ese momento.
- Se lavó cada pocillo con 1 ml de PBS. Se retiró la solución de lavado.
- Se añadió 1 ml de solución 1X Hoechst® por pocillo.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- Se retiró la solución Hoechst® 33342.
- Se lavó cada pocillo dos veces con 1 ml de PBS.

- Se retiró la solución de lavado.
- Se observó al microscopio de fluorescencia.

2.6.5. CFU (UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS)

Ensayo en el cual el azul de toluidina posee una afinidad por los ácidos nucleicos, por lo tanto se une a los componentes nucleares de los tejidos con un alto contenido de ADN y ARN.

Procedimiento:

- Se sembraron en suspensión, células individuales de folículo dental en placas de 6 pocillos. Los cultivos se realizaron doblemente y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en un ambiente húmedo de 95% durante 12 días.
- Posteriormente, al doceavo día se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron en 1% de paraformaldehído durante 20 min.
- Los cultivos fijados se tiñeron con 0.1% de azul de toluidina durante 1hr, posteriormente se lavaron con agua destilada.
- Se observaron usando microscopio de luz de disección.

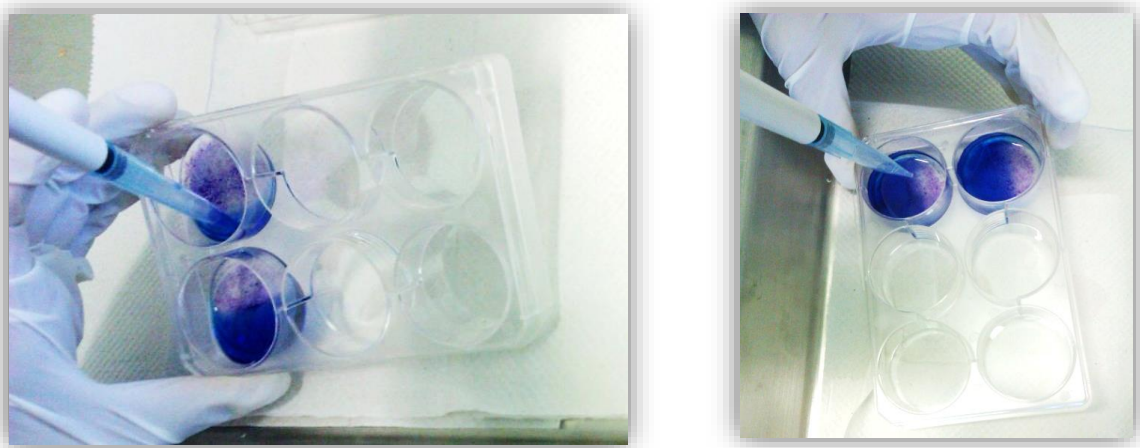


Fig. 13 Tinción de las células con azul de toluidina, para CFU. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

2.6.6. TUNEL

La tinció TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*), detecta la fragmentació del ADN, basada en la capacitat que presenten els extrems del ADN hidrolitzats per la endonucleasa a unir-se a una cadena de dioxigenina dUTP. Són identificats per la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), que catalitza la addició de dUTPs en els extrems 3'-OH del ADN fragmentat.

Este mètode pot marcar cèl·lules que han sofert dany severo en el ADN, se logra mediante fluoróforos o haptenos, en este caso biotina o bromo, que pueden ser detectados con estreptavidina o anticuerpos, para lo cual se puede utilizar biotin, Dtpu o BrdUTP.

A) Protocolo para las células en cubreobjetos

1. Fijación y permeabilización de la célula

Este protocolo se optimizó con una etapa previa de fijación usando 4% de paraformaldehído en PBS, seguido de una etapa de permeabilización con 0,25% de Triton®X-100, es apto a otras de fijación y permeabilización con reactivos tales como el etanol al 70%.

- Se retiró los medios y lavó cada cubreobjetos una vez con PBS.
 - Se añadió un volumen suficiente de fijador (4% de paraformaldehído) para cubrir completamente los cubreobjetos.
 - Se incubó las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 - Se retiró el fijador.
 - Se añadió un volumen suficiente del reactivo de permeabilización (0,25% Triton® X-100 en PBS) para cubrir completamente los cubreobjetos.
 - Se incubaron las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- A continuación, se lavaron dos veces con agua desionizada.

2. Preparación de un control positivo

La DNasa I genera roturas de la cadena en el ADN para proporcionar una reacción positiva de TUNEL.

- Se lavaron cubreobjetos con agua desionizada.
- Se preparó la solución de DNasa (I) para 200 μ L se ocupó 178 μ L de agua desionizada, 20 μ L de DNase I buffer (Component H) y 2 μ L de DNase I (Component G) y se mezcló bien.
- Se añadió 100 μ L de la solución de DNasa I (preparado en el paso 2) a cada cubreobjetos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavó los cubreobjetos una vez con agua desionizada y se continuó con TDT Reacción.

3. Reacción TDT

- Se utilizó 100 μ L de cóctel de reacción TDT por cubreobjetos.
- Se añadió 100 μ L de tampón de reacción TdT (Componente A) a cada cubreobjetos, permitiendo que la solución se haya extendido completamente sobre la superficie.
- Se incubó cubreobjetos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se retiró tampón de reacción TDT.
- Se preparó el cóctel reacción TDT para 200 μ L, utilizamos: 188 μ L de TdT reaction buffer (Component A), 4 μ L de EdUTP (Component B) y 8 μ L de TdT* (Component C).
- Inmediatamente después de usar la enzima TdT (componente C), se disolvió el vial a -20 ° C.
- Se añadió 100 μ L de la cóctel reacción TdT (preparado en el paso 4) a cada cubreobjetos permitiendo que el solución se extendió completamente sobre la superficie.
- Se incubó cubreobjetos durante 60 minutos a 37 ° C. Se retiró el cóctel de reacción, a temperatura ambiente.

- Lavar cubreobjetos dos veces con 3% de BSA en PBS para 2 minutos cada uno.

4. Reacción clic-it®

- Se preparó el Click-it® aditivo tampón de reacción (componente E) mediante la adición de 625 µl de agua desionizada al vial E Componente. Después de su uso, la alícuota se almacenó a = -20 ° C.
- Se preparó el cóctel de reacción-Click it® para 200 µL: 195 µL de Click-iT® reaction buffer (Component D), 5 µL de Click-iT® reaction buffer additive (preparada en el paso 4). Se dejó reposar 15 minutos.
- Se añadió inmediatamente 100 µl de la reacción de cóctel-Click it® (preparado en el paso 2) a cada cubreobjetos se dejó que la solución se extendiera completamente sobre la superficie.
- Se incubó el cubreobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- Se retiró el cóctel de reacción-Click it® y se lavó cada cubreobjetos con 3% de BSA en PBS 1X durante 5 minutos.

5. Detección de anticuerpos.

- Se bloquearon los cubreobjetos o pozos con 3% de BSA en PBS 1X durante el tiempo recomendado, protegido de la luz. Se eliminó la solución de bloqueo.
- Se preparó y añadió la solución de anticuerpo primario según lo recomendado por el fabricante.
- Se incubó durante la hora y la temperatura recomendada, protegido de la luz
- Se retiró la solución de anticuerpo primario.
- Se lavó cada cubreobjetos o bien dos se lavó veces con 3% de BSA en PBS. Se retiró la solución de lavado.

- Se preparó y añadió la solución de anticuerpo secundario como se recomienda por el fabricante.
- Se incubó durante la hora y la temperatura recomendada, protegido de la luz.
- Se retiró la solución de anticuerpo secundario.
- Se lavó cada cubreobjetos o bien dos veces con 3% de BSA en PBS. Se retiró la solución de lavado.

6. La tinción de ADN

- Se diluyó Hoechst (componente F) 1: 5000 en PBS para obtener una solución 1X Hoechst 33342.
- Se añadió 100 ml 1X solución Hoechst 33342 por cubreobjetos o bien se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Se eliminó la solución de Hoechst 33342.
- Se lavó cada cubreobjetos o bien dos veces con PBS. Se retiró la solución de lavado.

2.7. INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA

Insumos:

1. Isobutilmetilxantina (Sigma) 0,5 mM 10^{-3} molar.
2. Dexametasona (Sigma) 0,5 μ M, 10^{-6} molar
3. Medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle's modificado por Dulbbeco, SIGMA-ALDRICH).
4. Suero Fetal Bovino (GIBCO) 20%
5. insulina (Sigma) 10 μ g / ml
6. Oil Red (Sigma)



Fig. 14 Insumos para diferenciación adipogénica, Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

Método:

1. Se retiró el medio de cultivo de la caja Falcón (santa cruz), y se le agregó 5ml de Tryple Express (GIBCO). Posteriormente, se incubó en la incubadora (BINDER) por 5 min. con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C.

2. Transcurrido este tiempo, se observó al microscopio óptico invertido (LEICA) que las células se hallan despegaran de la caja de cultivo (se deberá observar una morfología redondeada, en suspensión en el medio de cultivo, lo que demostrará que las células se desprenden del plástico), si las células ya están despegadas, se le agregara 3 ml de medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle's modificado por Dulbbeco, SIGMA-ALDRICH) para dedeter el efecto del tryple express, de lo contrario se incubará de nuevo por 2 minutos.

3. Se colocará este contenido cuidadosamente con ayuda de una pipeta de 5 ml. en tubos de 13ml. (KIMA) y posteriormente se colocará en la centrifuga (SIGMA modelo 1-14) durante 10 minutos a 1000 rpm. Se retirará con mucho cuidado el sobrenadante, procurando de no mover el pellet, posteriormente con una micropipeta se colocarán las células en placas de 24 pocillos, en una cantidad de 0.200 ul. Se agregará 2ml de Medio de cultivo DMEM (SIGMA-ALDRICH), enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO) Penicilina (1000U/ml) /Estreptomicina (1mg/ml) /Anfotericina B (2.5mg/ml) SIGMA ALDRICH).

4. Los pocillos de cultivo se colocarán en la incubadora con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C (BINDER). Se cambiara medio de cultivo cada 3 días. Durante 10 días. Hasta que alcancen el 50-60% de confluencia.

5. La diferenciación a adipocitos se inicia cambiando el medio a 2ml de Medio de Inducción Adipogénico (DMEM con suero fetal bovino al 20% que contiene 0,5 µM, 10⁻⁶ molar de dexametasona, isobutilxantina 0,5 mM 10⁻³ molar (Sigma).Este medio se deja sobre las células durante 48 horas con las células mantenidas a 37°C, CO₂ al 5% y 90% de humedad⁶⁰.

6. Después se sustituye por Medio de Mantenimiento Adipogénico (DMEM que contiene FBS al 20% y 10 µg/ml de insulina). El medio se cambia

cada 3-4 días. Las células comienzan a mostrar pequeñas vacuolas lipídicas a los 3-7 días, y éstas aumentan y se hacen más numerosas con el tiempo, hasta al menos 30 días.

2.8. EVALUACIÓN DE LA ADIPOGÉNESIS POR TINCIÓN OIL-RED

Hay varios métodos para evaluar la diferenciación adipogénica, tales como la tinción de vesículas lipídicas.

El método más directo es la detección de la deposición de lípidos intracelular, que puede demostrarse por tinción de las monocapas ASC diferenciadas con Oil Red.

1. Se preparará 30% de Oil red en 70% de isopropanol, se mezclan durante 2 horas y se filtra con un filtro de 0.45μ antes de su uso. Lavar las células diferenciadas 2-3 veces con PBS.
2. Las Células se fijan en paraformaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se colocarán las células con 30 % Oil Red O en isopropanol durante 60 min.
4. Visualizar los depósitos de lípidos en las células diferenciadas utilizando microscopía de luz

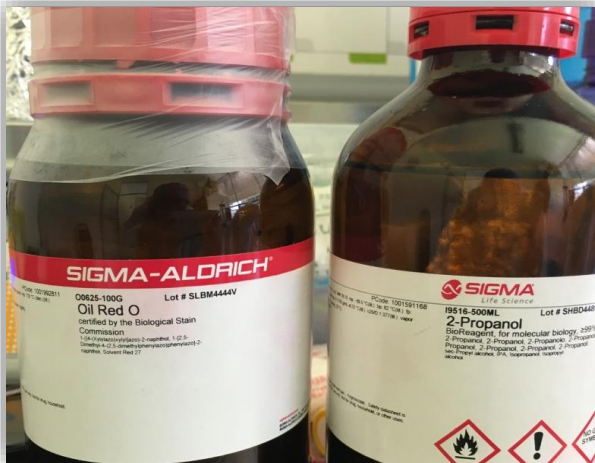


Fig 15 Insumos utilizados para la tinción, Oild-Red e Isopropanol, Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

3. RESULTADOS:

Cultivo Celular.

Iniciado el cultivo por explante, las células fueron observadas diariamente bajo microscopía óptica para evaluar su proliferación, no dando resultados de morfología fibroblastoide y adherencia a la superficie plástica, según los criterios de la ISCT (Dominici et al.). A las 4 semanas de cultivo no se observó la presencia de células madre mesenquimales con la morfología mencionada y adherencia al plástico. Se realizaron varios cultivos por explante, en los cuales en ninguno se observó confluencia.

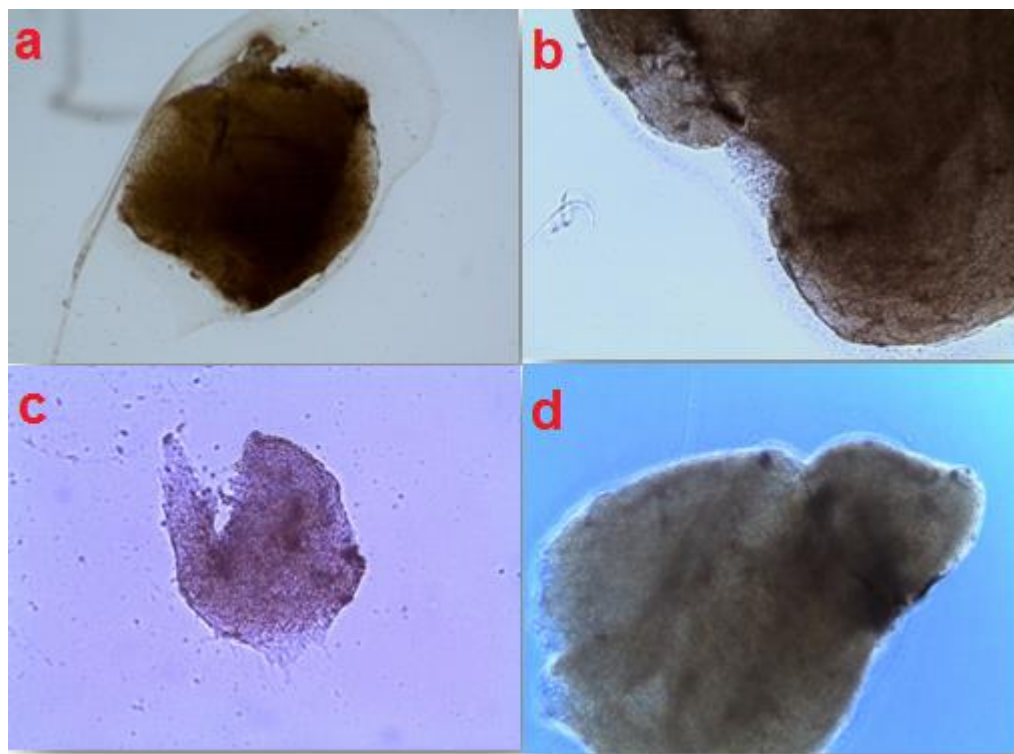


Fig.16 Cultivo por explante: a) Explante observado a los 7 días, b) explante observado a los 14 días, c) Explante observado a los 21 días, d) explante observado a los 28 días. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional.

En cambio los cultivos realizados por medio de la técnica de digestión enzimática se observaron a las 2 semanas las primeras células con fenotipo fibroblastoide, fueron observadas por medio de microscopía óptica, se dejaron

durante 4 semanas hasta alcanzar una confluencia del 85% y se realizó el primer pase. Las CMM de folículo dental alcanzaron una confluencia del 90%. Se demuestra su capacidad de proliferación. Se observaron los cultivos de CMM derivadas de folículo dental que alcanzaron una confluencia del 100%

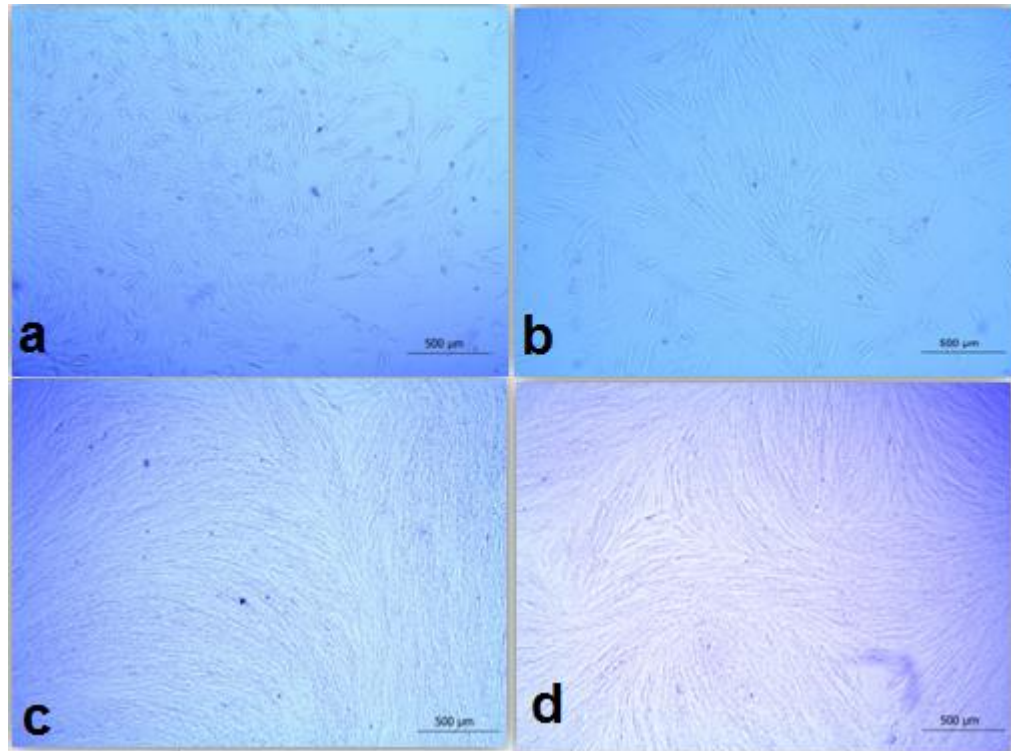


Fig.17 Cultivo realizado por técnica de digestión enzimática; a) Confluencia celular a la semana 2, b) confluencia celular semana 4, c) y d) confluencia celular a la semana 5 y 6 respectivamente, Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

Expresión de marcadores antigénicos de superficie celular para la indentificación de células mesenquimales de folículo dental a través de la purificación por medio De MACS, con anticuerpo anti-CD44+.

La indentificación de células mesenquimales obtenidas a partir de folículo dental se realizó mediante la purificación celular por medio de MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) las células fueron filtradas, siendo las positivas al anticuerpo

CD44, estas fueron sembradas y se dejaron proliferar para posteriormente realizar el análisis inmunocitoquímico, al realizar el coteo con la siguiente formula se obtuvo:

$$\frac{n^{\circ} \text{ células vivas} \times 10000 (1\text{ml})}{4 (n^{\circ} \text{ de cuadrante})} (2)|(5) = \frac{95 \times 10000 (1\text{ml})}{4 (n^{\circ} \text{ de cuadrante})} (2)|(5) = 95000 \text{ células}$$

por ml

Las células positivas fueron sembradas en portaobjetos, para posteriormente realizar el análisis inmunohistoquímico, utilizando el anticuerpo anti-CD44 y con el marcador de superficie para células hematopoyéticas con anticuerpo CD34 y tinción del núcleo con DAPI, (4',6-diamino-2-fenilindol), para el control negativo.

Las células aisladas de folículo dental humano de segundo y tercer pasaje expresaron positivamente a los marcadores de superficie celular CD44, confirmando así la presencia de células mesenquimales, en cuanto al marcador específico para células hematopoyéticas.

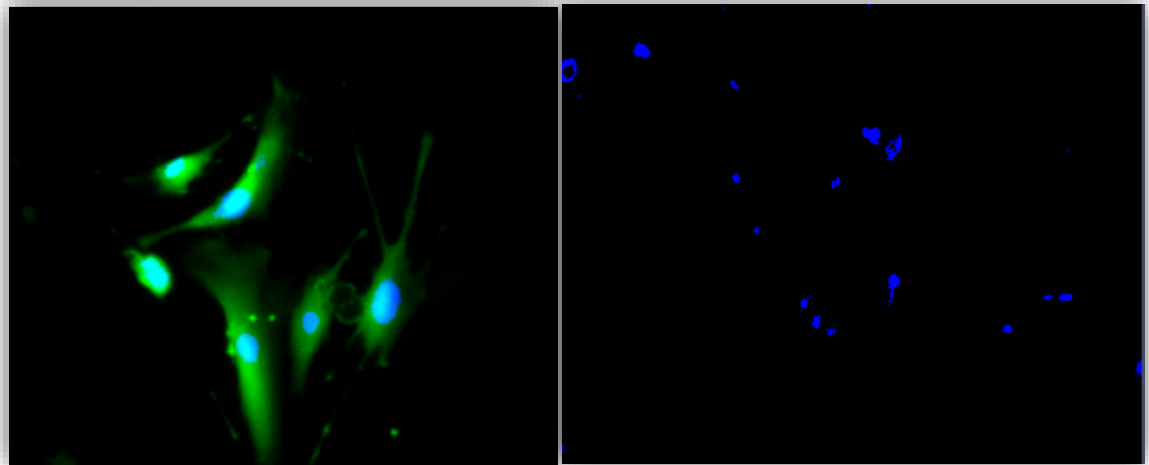


Fig. 18 Identificación de DFPCs. Imágenes de microscopia de fluorescencia de DFPCs para marcadores anti-CD44, la población purificada muestra positividad al anticuerpo CD44 y tinción de núcleos con DAPI. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia (UBIMED, FESI)

DETERMINCIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

LIVE & DEAD

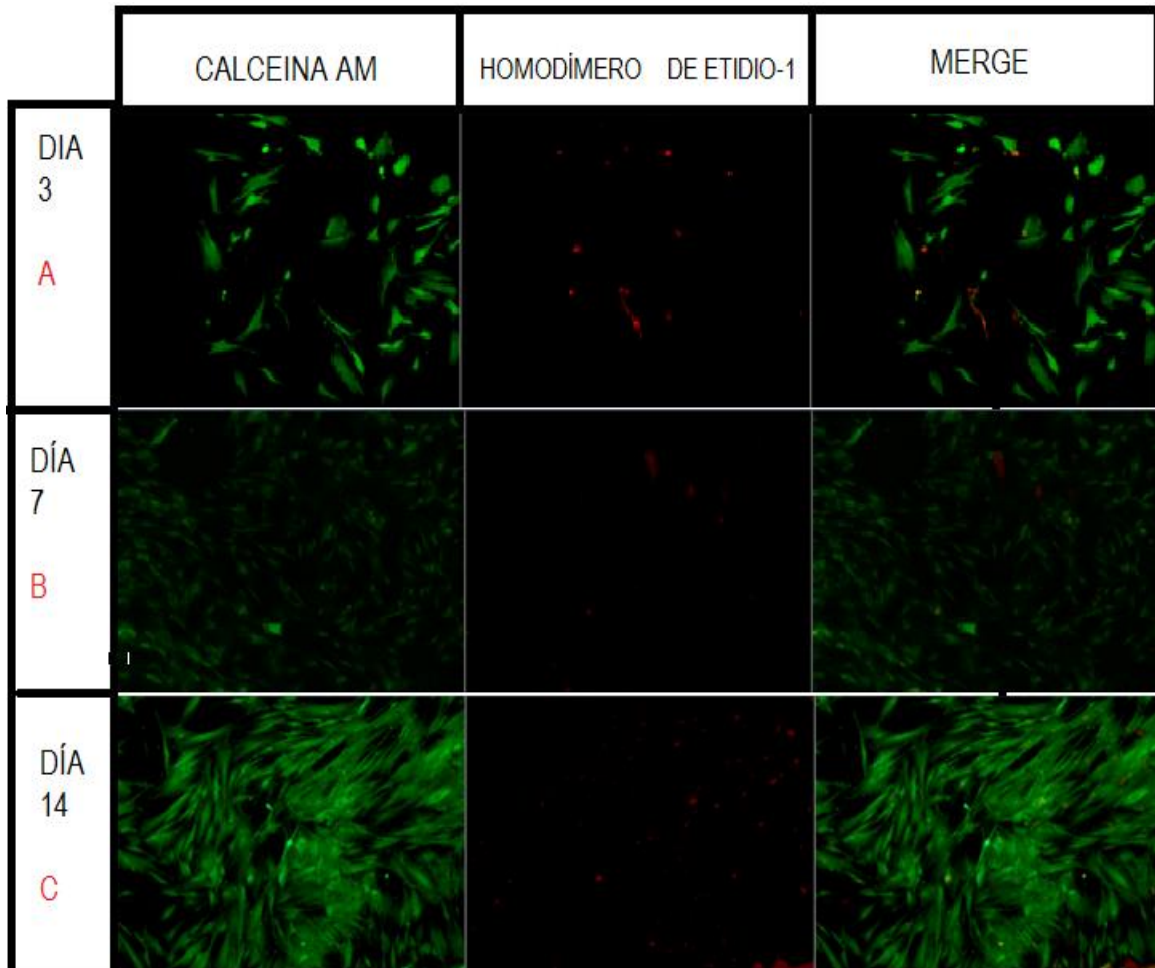


Fig. 19 Evaluación de la viabilidad celular de DFPCs con Live & Dead en 3 tiempos: a) día 3, b) día 7, C) día 14. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia (UBIMED, FESI)

Durante los ensayos de viabilidad se realizó prueba de live/dead a los 7, 14 y 21 días respectivamente. Mediante tinción verde fluorescente calceina AM, fue absorbida por las células vivas siendo transportada a través de la membrana celular. La actividad de las enzimas esterasas transforma la calceina AM en calceina fuertemente fluorescente, esta es retenida por las células vivas provocando que fluoresca intensamente en color verde. El homodímero-1 de etidio rojo fluorescente para indicar las células con daño en la membrana plasmática, aumentando su

fluorescencia tras unirse a ácidos nucleicos, produciendo de esta manera una fluorescencia de color rojo brillante en las células muertas.

TRONCALIDAD

Para comprobar la presencia de células mesenquimales en los cultivos se realizó inmunomarcaje.

Las células madre de Folículo Dental humano se expresaron positivas a los marcadores de superficie celular CD44 y Alexa 488 confirmando así la presencia de células mesenquimales. Se puede observar fluorescencia gracias al anticuerpo secundario Alexa Fluor 488, observándose en verde la membrana celular y en color azul la tinción de los núcleos DAPI. Fig. 20

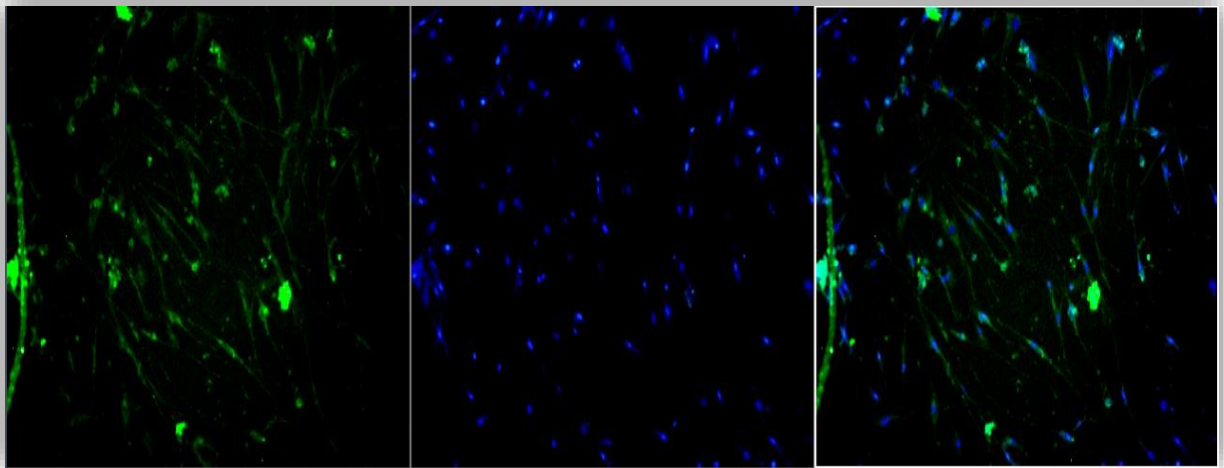


Fig. 20 puede observar fluorescencia gracias al anticuerpo secundario Alexa Fluor 488, observándose en verde la membrana celular y en color azul la tinción de los núcleos DAPI. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia (UBIMED, FESI)

EDU PROLIFERATION

Ensayo Edu proliferation con click-It. Edu Alexa Fluor 488

Los ensayos exponen células en fase S del ciclo celular (citoplasma verde, núcleos azules) expresando así que se encuentran en proliferación. Contradictorio a las células a las cuales se les agrego DMSO, en estas se observa un citoplasma no delimitado y la tinción de algunos núcleos, como lo muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia.

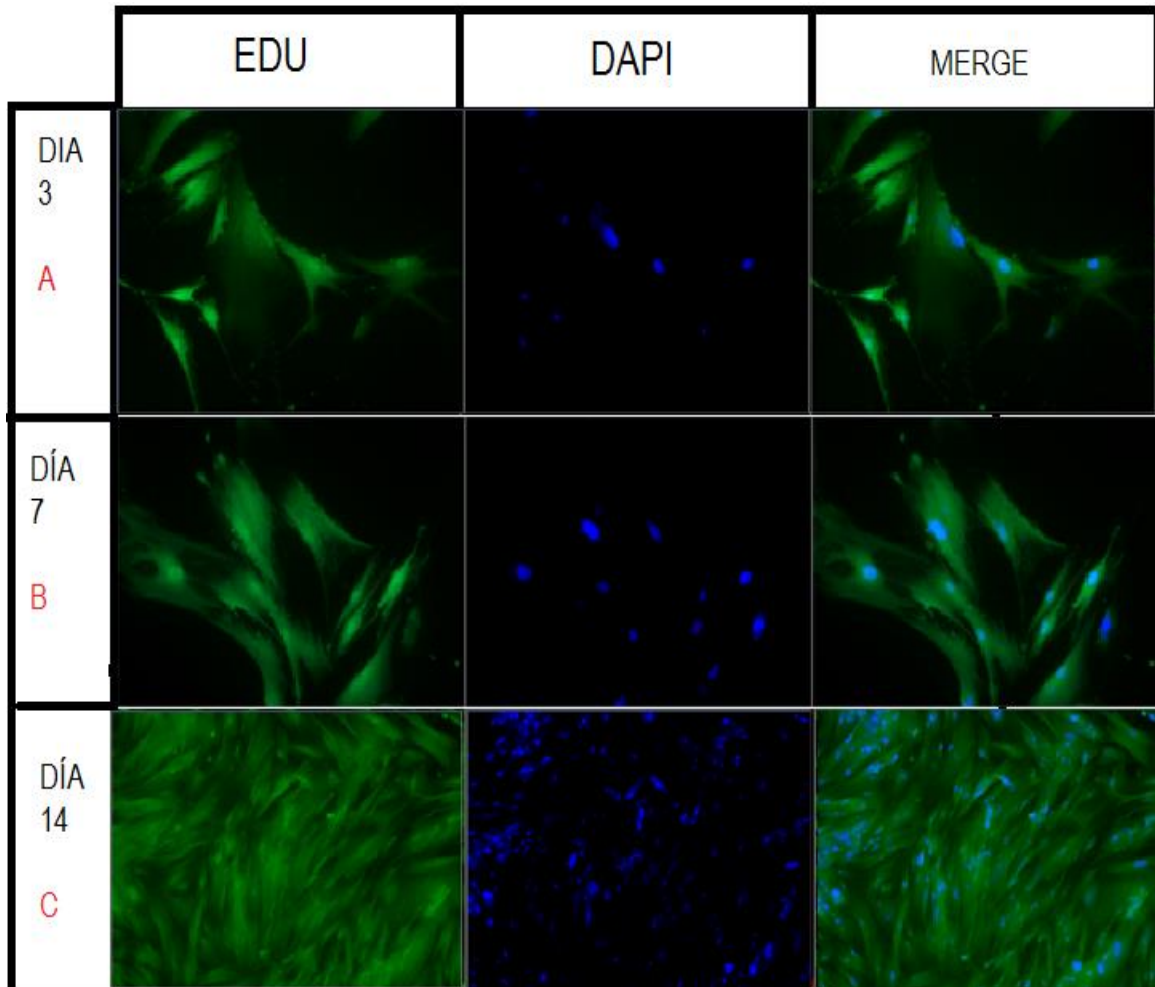


Fig. 21 Ensayo con EDU Proliferation tratados con Kit EdU Alexa Flúor. a) día 3, B) Día 7, C) Día 14. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia (UBIMED, FESI).

CFU

Los cultivos realizados de células mesenquimales de Folículo Dental, fueron valorados por medio de la técnica de tinción de azul de toluidina, evaluando así su eficiencia de la formación de colonias, siendo estas teñidas con colorante azul, que posee una afinidad por los ácidos nucleicos, uniéndose así a los componentes nucleares de los tejidos con un alto contenido de DNA y RNA para así teñir células que se encuentran en fase proliferativa.

Las evaluaciones se realizaron a 7 y 14 días, observándose la diferencia que hay entre el día 7 y 14, demostrando el que el crecimiento fue significativo.

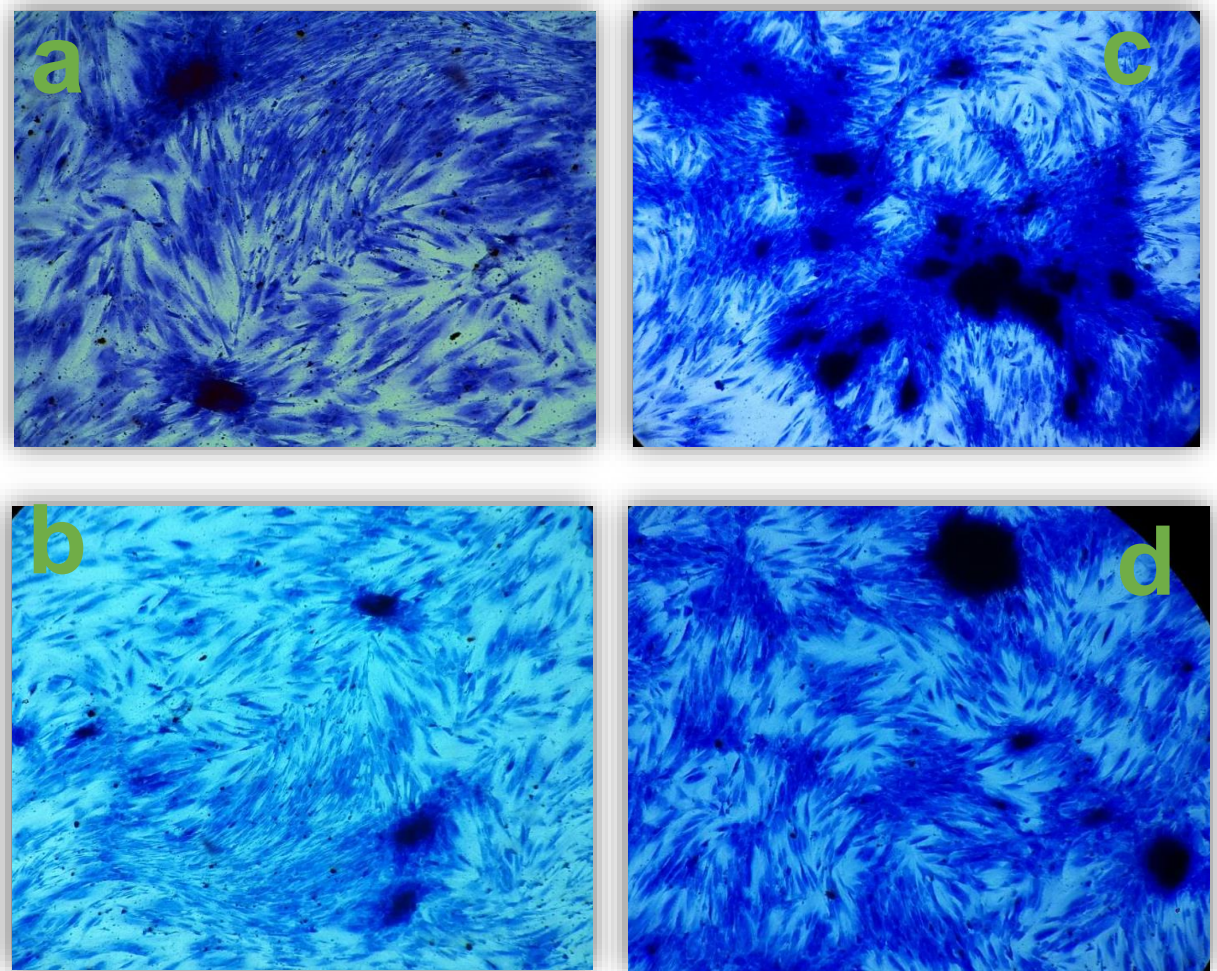


Fig. 22 Ensayo CFU a y b) día 7, c y d) día 14 respectivamente. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

TUNEL

Método directo para estudiar la apoptosis celular, fragmentación del ADN, durante esta las endonucleasas nucleares dirigen en DNA génomico en fragmentos oligonucleosomales. Estos se marcan mediante la incorporación catalítica, por medio de la enzima transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT).

Logramos observar aquellas células que presentaron rupturas de DNA características de apoptosis y sin rasgos morfológicos celulares aún de apoptosis.

APÓPTOSIS CELULAR POR TUNEL

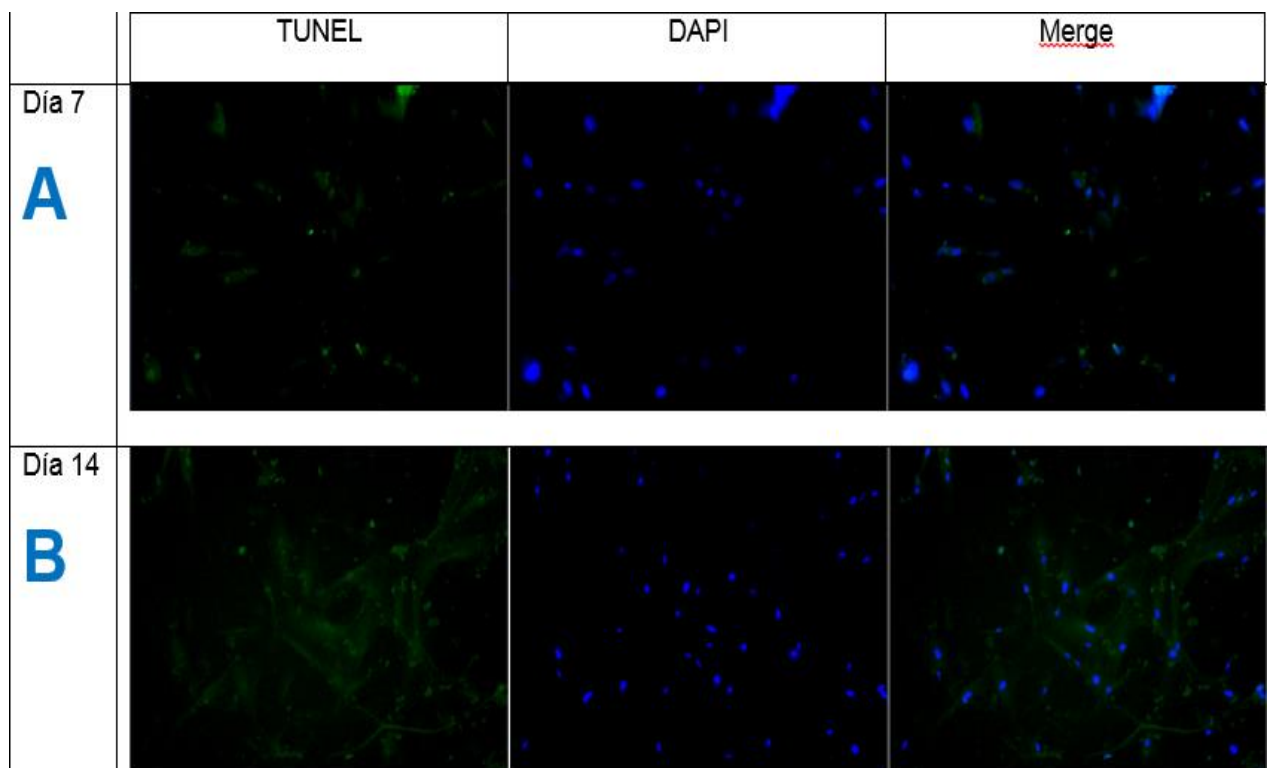


Fig. 23 Marcación de células que han sufrido daño severo en el ADN, para lo cual se utilizó BrdUTP. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia (UBIMED, FESI)

Diferenciación a linaje adipogénico.

Las células DFPCs fueron tratadas con un glucocorticoide, dexametasona, esta regula el AMPc (Adenosín monofosfato cíclico) es un nucleótido que funciona como segundo mensajero en varios procesos biológicos. Es un derivado del adenosín trifosfato, y se produce mediante la acción de la enzima adenilato ciclasa a partir del adenosín trifosfato, y un compuesto que inhibe la actividad de la fosfodiesterasa que degrada el AMPc, isobutil-metilxantina. Fue empleado también un factor de crecimiento, insulina.

El medio de Inducción Adipogénico (DMEM con suero fetal bovino al 20% que contiene 0,5 μM , 10^{-6} molar de dexametasona, isobutilxantina 0,5 mM 10^{-3} molar (Sigma) fue cambiado cada 3-4 días, las DFPCs comenzaron a mostrar pequeñas vacuolas lipídicas a los 7 días y estas fueron aumentando con el tiempo, hasta al menos 30 días.

Para evaluar su multipotencialidad las células provenientes de folículo dental fueron sometidas a la exposición de dexametasona, isobutil-metilxantina e insulina, las células experimentaron diferenciación que resulta en la producción de vacuolas intracelulares que contienen lípidos⁶¹.

Para evaluar la detección de vesículas lipídicas se dispuso de un colorante liposoluble, *oil red*, para teñir las vacuolas lipídicas en los adipocitos, este colorante hidrófobo tuvo una propensión a acumularse en las vacuolas que contienen lípidos de los adipocitos en desarrollo, pudiendo así identificar fácilmente las células adipogénicas en poblaciones de DFPCs que se están diferenciando.

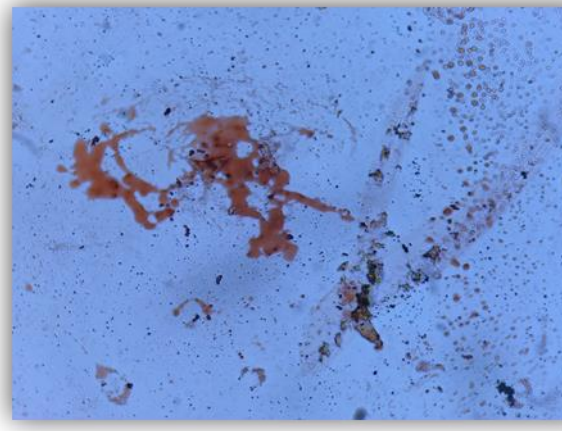
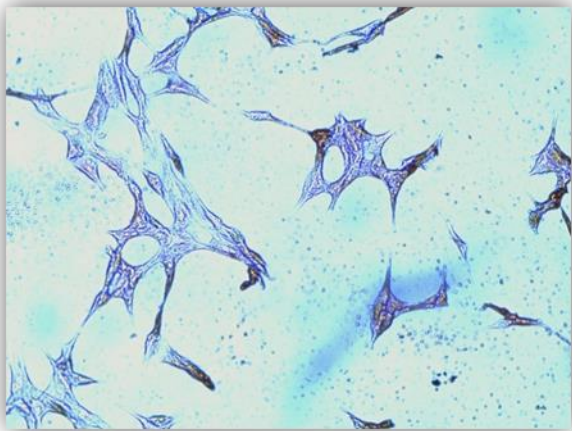
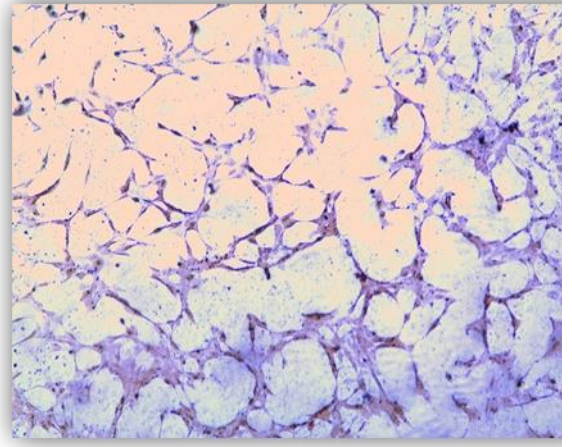
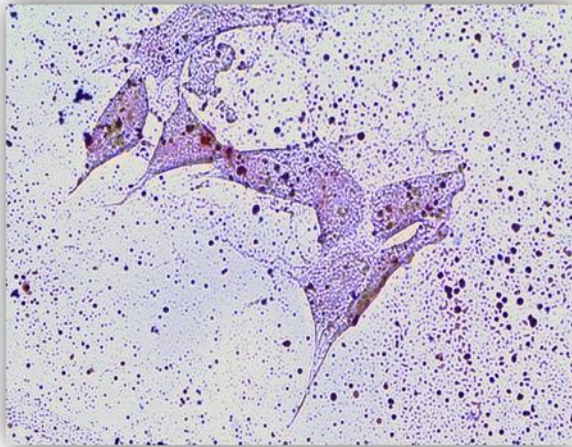


Fig. 24 Diferenciación adipogénica, tinción con Oil-Red, en las imágenes podemos observar cultivos confluentes, las células teñidas con oil-red, donde son evidentes las vacuolas lipídicas. Foto tomada del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional

4. DISCUSIÓN

Las DFPC constituyen una fuente celular útil en la generación de tejidos, surgen de un estadio temprano del desarrollo del órgano dentario y juega un papel muy importante para la función biológica de la erupción del diente⁶². Además, este tejido alberga células progenitoras para el periodonto. Se cree que las células del folículo dental cerca de la raíz de conformación (más interna) se diferencian en la formación cementoblastos (cemento) y que las células hacia el hueso alveolar (más externa) se diferencian a osteoblastos. Las Células del folículo dental que se encuentran en el centro entre las células precursoras cementoblasto y osteoblastos se desarrollan en los fibroblastos que producen la matriz extracelular (ECM) de la PDL⁶³.

Los objetivos de este estudio fueron aislar y cultivar células mesenquimales de folículo dental de dientes inmaduros de pacientes jóvenes, caracterizar su inmunofenotipo, determinar su proliferación y su potencial de diferenciación a linaje adipogénico. Para lograr estos objetivos, se definieron criterios de inclusión para los órganos dentarios a utilizar; de esta forma, se examinaron terceros molares de pacientes jóvenes de entre 16 y 20 años de edad. Para determinar la existencia de células madre, se realizaron dos técnicas de cultivo: por explante y por digestión enzimática. Esta última dando resultados a partir de la segunda semana observándose confluencia celular, con morfología fibroblastoide. Asimismo, a la quinta semana se observó CFU-F (Unidades formadoras de colonias fibroblásticas), características reportadas para células mesenquimales por Friedenstein *et al*¹. Caso contrario a la técnica de explante, en la cual no hubo confluencia celular.

Los cultivos de células madre de Folículo Dental humano que se obtuvieron presentaron una alta viabilidad mayor al 80% y un grado de apoptosis bajo. De tal modo, mostraron una buena proliferación en la segunda y tercera semanas mediante la técnica de digestión enzimática, en comparación a las pulpaes, ya que estas últimas dieron resultados positivos con técnica de explante, aunque más lento. Sin embargo, esto se puede deber a la diferente composición que presenta cada tejido. Mientras que el folículo corresponde a un tejido conectivo de características laxas, la pulpa presenta un tejido conectivo de características más fibrosas⁶⁴.

Gronthos *et al*¹. Reportaron a las moléculas CD44 y el STRO-1 como marcadores positivos de superficie específicos de las células mesenquimales de origen dental. Morscheck *et al*⁶⁰, fueron los primeros en caracterizar las DFPC, se encontraron Notch- 1 y nestina en el tejido del folículo dental como marcadores probables para las células no diferenciadas⁶⁵. Fue descrito Notch- 1 como un marcador para las células madre neuronales y de las células madre dentales⁶⁶.

En los resultados obtenidos de la técnica de viabilidad celular *LIVE & DEAD* sembradas a tres tiempos (días 7, 14 y 21) se observa una mayor actividad esterasa (fluorescencia en verde) en comparación con células muertas con fragmentación de membrana celular (fluorescencia en rojo) siendo visible escasa mortalidad celular.

Utilizando la prueba de TUNEL, ya que siendo un método directo para estudiar la apoptosis celular, esta detecta la fragmentación del ADN, basada en la capacidad que presentan los extremos del ADN hidrolizados por la endonucleasa a unirse a una cadena de dioxigenina dUTP. Son identificados por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), que cataliza la adición de dUTPs en los extremos 3'-OH del ADN fragmentado. Este método puede marcar células que han sufrido daño severo en el ADN, se logra mediante fluoróforos o haptenos, en este caso biotina o bromo, que pueden ser detectados con estreptavidina o anticuerpos, para lo cual se puede utilizar biotina, Dttup o BrdUTP. Logramos observar aquellas células que presentaron rupturas de DNA características de apoptosis y sin rasgos morfológicos celulares aún de apoptosis.

Se realizó ensayo con EDU proliferation a 3 tiempos (día 7, 14 y 21) donde se muestra que las DFPCs son altamente proliferativas observándose que las células se encuentran en la interfase, específicamente en la fase de síntesis (S) del ciclo celular, siendo en esta etapa donde la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas.

Realizando estas pruebas de viabilidad y proliferación celular, los resultados coinciden en que las DFPCs son altamente proliferativas y viables coincidiendo con los estudios citados anteriormente.

Se comprobó que las células aisladas y cultivadas de folículo dental correspondían a células madre mesenquimales humanas, siendo éstas más fáciles de obtener y proliferar. Las CMM de folículo dental presentaron un mayor potencial de diferenciación comparación a las CMM de pulpa in vitro, probablemente debido a su estado evolutivo más inmaduro⁶⁷. Es necesario destacar que en las condiciones de este experimento, las CMM de folículo dental lograron diferenciarse hacia adipocitos, siendo expuestas a medio inductor adipogénico (dexametasona, insulina e isobutyl-metilxantina) variando con otros estudios la isobutyl-metilxantina, siendo modificada por indometacina u omitiéndola, teniendo como resultado un buena diferenciación⁶⁸, mientras que las CMM de pulpa no lograron tener esa capacidad, indicando así el mayor potencial de diferenciación que presentan las células de folículo dental en comparación a las de pulpa. En este trabajo, las células mesenuimales de folículo dental, mantenidas en un medio específico se logró la inducción a linaje adipogénico, demostrando el potencial de las DFPCs para generar vacuolas lípidicas en las células inducidas analizadas con la tinciónmas usual, oil-red, en un estadio temprano.

La información de esta investigación demuestra que las CMM de folículo dental presentan una gran capacidad proliferativa, poseen plasticidad, existen indiferenciadas y mantienen ese fenotipo hasta que son expuestas a señales apropiadas, tienen habilidad de autorenovarse por tiempos prolongados. En consecuencia, existe un gran potencial para aislar CMM de folículo dental de un solo diente que pudieran ser utilizadas en medicina y odontología regenerativa.

5. CONCLUSIONES:

Las células derivadas del folículo dental de terceros molares inmaduros humanos, contienen poblaciones celulares, entre las cuales destacan células mesenquimales, que expresan marcadores como CD44, que las identifican como células mesenquimales multipotentes.

La técnica realizada por medio de digestión enzimática resultó efectiva para la realización de cultivo celular de folículo dental en un periodo de 2 semanas.

La técnica de MAC's resultó efectiva para obtener una población homogénea de células mesenquimales de folículo dental (DFPCs).

Los ensayos de viabilidad y proliferación celular de DFPCs demostraron su potencial altamente proliferativo y viable, siendo así una fuente utilizada para la medicina regenerativa.

El potencial de diferenciación quedó demostrado al realizar la tinción con oil-red, tiñendo así las vacuolas lipídicas de las células diferenciadas, bajo las condiciones específicas de inducción.

La utilidad de células mesenquimales depende de su fuente de obtención y la accesibilidad al tejido de origen.

Se confirma el potencial de diferenciación a linaje adipogénico de células troncales de folículo dental

6. BLIBIOGRAFÍA

- ¹ Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa S, Lueria E. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974
- ² Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:13625-13630.
- ³ Friedlander L; Cullinan, Ma & Love, R Dental stem cells an their potential role in apoxegenesis and apexificación. *Int. Endont J*. 2009.
- ⁴ AM Ingalls, MM Dickie, GD Shell. Obese, a new mutation in the house mouse. *Journal of Heredity*, 1950 -
- ⁵ Chehab, F.F., Lim, M.E. and Lu, R. (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genet.*, 12, 318–320.
- ¹ Mayordomo DL, Goldstein SA, Guilak F. ingeniería tisular funcional: el papel de la biomecánica. *J Biomech Esp*. 2000.
- ² Anzaldúa A, S; Juárez M, M; Villaseñor G, H; ¿Qué son las células troncales o “células madre”?; Artículo de Revisión, *Veterinaria México*; 2007, 38.
- ³ Magallanes F, M; Carmona R, B; Álvarez P, M; Aislamiento y caracterización parcial de las células madre de la pulpa dental; 2010, 14 (1); 15-20.
- ⁴ Yhen A, Sharpe T. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 2008; (331): 359-372
- ⁵ Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282, 1145- 1147.
- ⁶ Weissman IL. Stem cells ñ Scientific, medical and political issues. *N Engl J Med*. 2002; 346 (20) 1576- 1579
- ⁷ Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation in vitro Expansion and Characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;174:249-282.
- ⁸ Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal Stem Cells for bone, cartilage, tendon and skeletal repair. *Bone*. 2006;39:678-68
- ⁹ Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:13625-13630.
- ¹⁰ Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells derived form dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in Regenerative Medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9):792-806.

-
- ¹¹ Anzaldúa A, S; Juárez M, M; Villaseñor G, H; ¿Qué son las células troncales o “células madre”?; Artículo de Revisión, Veterinaria México; 2007, 38.
- ¹² Lovell-Badge R. The future for stem cell research. Nature 2001; 414: 88-91.
- ¹³ Jiang Yuehua et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002; 418: 41- 49
- ¹⁴ González, L., Font, A., (2011, marzo). Investigación con células madre de origen dentario. Actualización. Gaceta dental, 223, pp.118-129.
- ¹⁵ Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L,: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo:Nature Medicine 6, 1229 - 1234 (2000).
- ¹⁶ Wang Y, Preston B, Guan G. Tooth bioengineering leads the next generation of dentistry. Int J. paediatr Dent. 2012
- ¹⁷ Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. 2009. Cytokine and growth factor reviews. 20:435-440.
- ¹⁸ Ferrara N. vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. 2009. Endocrine reviews. 29:789-91
- ¹⁹ Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang T-M, Chen J-H, Wang BB, Huang G T-j, Wang S, Shi S. utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. 2010. Oral diseases. 16:20-28.
- ²⁰ Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold M. clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. 2000. Periodontology. 59:203-27.
- ²¹ Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, et al. Functional Tooth Regeneration Using a Bioengineered Tooth Unit as a Mature Organ Replacement Regenerative Therapy. PLoS ONE. 2011;6;7: 1-11
- ²² Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta K. stem cells in dentistry-Part I: Stem cells sources. 2012. Journal of prosthetic Research. 56:151-165.
- ²³ Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang T-M, Chen J-H, Wang BB, Huang G T-j, Wang S, Shi S. utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. 2010. Oral diseases. 16:20-28.
- ²⁴ Demarco F F, Muniz Conde M C, Cavalcanti B N, Casagrande L, Sakai V T, Nör J E. dental pulp tissue engineering. 2011. Brazilian dental journal. 22:3-14.

-
- ²⁵ Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. 2009. Cytokine and growth factor reviews. 20:435-440.
- ²⁶ Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics – biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. Australian Dental Journal. 2010; 55;4: 446–452
- ²⁷ Mitsiadis y Papageraki P. regenerated teeth: the future of tooth replacement? Future Medicine. 2011. 2:135-139
- ²⁸ Valponi A A, Pang Y, Sharpe P. stem cells-based biological tooth repair and regeneration. 2010. Trends in cells biology. 20:12.
- ²⁹ González Orta LJ, Font Rytzner A, Nova García J,. Investigación con células madre de origen dentario. Actualización. GACETA DENTAL. 2011; 223: 118-128.
- ³⁰ Rendón J, Jiménez LP, Urrego PA. Células madre en odontología. Revista CES Odontología. (2011); 24; 1:51-58.
- ³¹ Dominici, M, Blank, K; Mueller, I; Slaper-Cortenbach, I; Marini, FC; Krause, DS; Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy Position statement, USA 2006
- ³² Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:13625-13630.
- ³³ D'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool For Bone Regeneration. Stem Cell Rev. 2008; 4:21-26.
- ³⁴ Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in Regenerative Medicine. J Dent Res 2009; 88(9):792-806
- ³⁵ Nam H, Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 386:135-139.
- ³⁶ Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S et al. Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study. J Endod. 2008; 34(2):166-171.
- ³⁷ Yang, H., Gao, L., & An, Y. (2013). Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. Biomaterial, 34, pp.7033-7047.
- ³⁸ Morsczeck, C., Gotz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kuhn, U., Mohl, C., Sippel, C., & Hoffmann, K. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 24, pp.155-165.

-
- ³⁹ Kemoun, P., Laurencin, S., Rue, J., Farges, J., Gennero, I., Conte-Auriol, F., Briand, F., Gadelorge, M., Arzate, H., Nara, A., Brunel, G., & Salles, J. (2007). Human dental follicle cells acquire mesenchymal features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EDM) in vitro. *Cells Tissue Res*, 329, pp. 1-9.
- ⁴⁰ Yalvac, M., Ramazanoglu, M., Rizvanov, A., Sahin, F., Bayrak, F., Salli, U., Palotás, a., & Kose, G. (2009). Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of Young adults: implications in neo-vascularization, osteo-,adipo-and neurogenesis. *The pharmacogenomics Journal*, pp. 1-9.
- ⁴¹ Huang, A., Chen, Y., Lin, L., Shieh, T., & Chan, A. (2008). Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Patol Med*, 37, pp. 571-574.
- ⁴² Broccaioli, E., Niada, S., Rasperini, G., Ferreira, L., Arrigoni, E., Yenagi, V., & Brini, A. (2013, Abril) Mesenchymal stem cells from Bichat's Fat Pad: In vitro comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. *BioResearch Open Access*, 2, pp. 107-117.
- ⁴³ Gómez de Ferraris. *Histología y embriología bucodental*. 3er edición Edit. Medico Panamericana, España, 2009.
- ⁴⁴ Wise et al., 2002 G.E. Wise, S. Frazier-Bowers, R.N. D'Souza Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 13 (2002), pp. 323–334
- ⁴⁵ Elnesr and Avery, 2002 N.M. Elnesr, J.K. Avery Development of the teeth: root and supporting structures J.K Avery, P.F Steele, N. Avery (Eds.), *Oral development and histology* (3rd ed.), Thieme, Stuttgart, New York (2002), pp. 108–122
- ⁴⁶ Junqueira, L.C. and Carneiro, J. *Basic Histology. Texto y Atlas*. 11a Edition. McGraw-Hill. 2005
- ⁴⁷ Morszeck C¹, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005 Apr;24(2):155-65.
- ⁴⁸ Morszeck C¹, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, Sippel C, Hoffmann KH. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int*. 2005 Jul;29(7):567-75.
- ⁴⁹ Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., Frisen, J., 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25– 34.
- ⁵⁰ Shindo, K., Kawashima, N., Sakamoto, K., Yamaguchi, A., Umezawa, A., Takagi, M., Katsube, K., Suda, H., 2003. Osteogenic differentiation of the mesenchymal precursor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling.
- ⁵¹ Kémoun P¹, Laurencin-Dalcioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP. Human dental follicle

cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007 Aug;329(2):283-94. Epub 2007 Apr 19.

⁵² Lucaciu O, Sorițau O, Gheban D, Ciuca DR, Virtic O, Vulpoi A, Dirzu N, Câmpian R, Băciuț G, Popa C, Simon S, Berce P, Băciuț M, Crisan B. Dental follicle stem cells in bone regeneration on titanium implants. *BMC Biotechnol.* 2015 Dec 30;15(1):114.

⁵³ Claudia, Brizuela C. Sussy, Galleguillos G. Flavio, Carrión A. Carolina, Cabrera P. Patricia, Luz C. Carolina, Inostroza S. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *International Journal of Morphology.* 2013, Vol. 31 Issue 2, p739-746. 8p.

⁵⁴ Jeffrey M. Gimble, Adam J. Katz, Bruce A. Bunnell, *Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine.*

⁵⁵ Michelle Locke, John Windsor and P. Rod Dunba. *Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery.* 2009

⁵⁶ N. M. Vieira, V. Brandalise, E. Zucconi, M. Secco, B. E. Strauss,† and M. Zatz. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells.

⁵⁷ Ilaria Tocco, Alan David Widgerow, Shadi Lalezari, Derek Banyard, Ashkaun Shaterian, Gregory R.D. Evans *Annals of Plastic Surgery.* May 2014 Lipotransfer.

⁵⁸ Gregoire FM¹. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001

⁵⁹ MacDougald OA¹, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab.* 2002 Jan-Feb;13(1):5-11

⁶⁰ Bruce A. Bunnell 1, Bradley T. Estes 2, Farshid Guilak 2 and Jeffrey M. Gimble. *Differentiation of Adipose Stem Cells*

⁶¹ **Spiegelman**, B.M. y H. **Green**. 1980. Control of specific protein biosynthesis during the adipose conversion of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 255:8811-8818.

⁶² Wise et al., 2002 G.E. Wise, S. Frazier-Bowers, R.N. D'Souza Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 13 (2002), pp. 323–334

⁶³ ElNesr and Avery, 2002 N.M. ElNesr, J.K. Avery Development of the teeth: root and supporting structures J.K Avery, P.F Steele, N. Avery (Eds.), *Oral development and histology* (3rd ed.), Thieme, Stuttgart, New York (2002), pp. 108–122

⁶⁴ Claudia, Brizuela C. Sussy, Galleguillos G. Flavio, Carrión A. Carolina, Cabrera P. Patricia, Luz C. Carolina, Inostroza S. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *International Journal of Morphology.* 2013, Vol. 31 Issue 2, p739-746. 8p.

⁶⁵ Morsczeck C¹, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, Sippel C, Hoffmann KH. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int.* 2005 Jul;29(7):567-75.

⁶⁶ Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., Frisen, J., 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25– 34.

⁶⁷ Claudia, Brizuela C. Sussy, Galleguillos G. Flavio, Carrión A. Carolina, Cabrera P. Patricia, Luz C. Carolina, Inostroza S. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *International Journal of Morphology*. 2013, Vol. 31 Issue 2, p739-746. 8p.

⁶⁸ Zhang, Q.; Shi, S.; Liu, Y.; Uyanne, J.; Shi, Y.; Shi, S.; et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J. Immunol.*, 183(12):7787-98, 2009.