



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CÉLULAS TRONCALES DERIVADAS DE LA LÁMINA PROPIA DE
LA MUCOSA BUCAL: SU POTENCIAL EN LA REGENERACIÓN
ÓSEA *IN VIVO*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

SONIA LÓPEZ LETAYF

TUTOR:

DR. HIGINIO ARZATE FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CIUDAD DE UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO 2017

DGAPA UNAM IT200717, IA202516, IA200917



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al Dr. Higinio Arzate por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, sus enseñanzas y su apoyo durante toda mi maestría. Por sus consejos que me han enriquecido de forma personal y profesional.

A mi jurado de examen de grado: Dra. Ana María Fernández Presas, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Yonathan Omar Garfías Becerra y Dr. Alejandro Navas Pérez; por leer mi tesis y darme sus comentarios, que representaron un aporte importante para este trabajo.

Al Dr. Luis Alberto Medina del laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular micro PET, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología México, por el apoyo para tomar las microtomografías que forman parte de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados: Lia, Quique, Fabiola, Janeth, Rodrigo, Mika, Gonzalo, Kevin, Rita y Mary Chuy; por su apoyo, paciencia, enseñanzas, consejos y amistad.

A mi familia que siempre han estado a mi lado, me han apoyado en todas mis aventuras y me han dado siempre su cariño.

A mis amigos (Bere, Memo, Xochi, Karol, Mariana y Abril), porque a pesar de la distancia siempre han estado a mi lado animándome a seguir adelante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para poder realizar mis estudios de maestría.

Índice

Índice.....	1
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
Antecedentes	8
Concepto de Célula Troncal.....	8
Origen	8
Clasificación.....	9
Células Troncales Adultas	10
Células troncales derivadas de la mucosa bucal	12
Marcadores para células troncales	12
¿Qué tipo de células son las células troncales derivadas de la mucosa bucal?	15
Diferenciación	15
Osteogénesis	15
Vías de señalización que participan en la osteogénesis.....	16
Diferenciación osteogénica de células troncales	17
Planteamiento del Problema	18
Justificación.....	18
Hipótesis	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
Materiales y Métodos	20

Cultivo Celular.....	20
qRT-PCR	20
Western Blot	21
Preparación de los andamios.....	22
Procedimiento Quirúrgico	22
Eutanasia.....	24
Histología e Histomorfometría.....	24
μCT	24
Expresión de marcadores de células troncales, hueso y humanos	24
Análisis Estadístico	25
Resultados	26
qRT-PCR	26
Western Blot	28
Histología e Histomorfometría.....	29
μCT	33
Expresión de marcadores de células troncales.....	34
Expresión del marcador HNA.....	34
Discusión.....	38
Conclusiones.....	41
Referencias	42
Abreviaciones.....	46

Resumen

La mucosa bucal tiene la capacidad para regenerarse después de una herida, esto se debe a que posee células troncales mesenquimales. Dichas células expresan marcadores de pluripotencia y mediante su uso se ha logrado obtener, *in vitro*, tejidos de las tres capas embrionarias. Estas células se encuentran en un sitio anatómico que hace fácil su obtención, a diferencia de las derivadas de la médula ósea, lo que representa una ventaja para la terapia celular la cual requiere, en algunas ocasiones, de grandes cantidades de células para la generación de nuevos tejidos. El objetivo de esta tesis fue demostrar que las células troncales de la mucosa bucal son capaces de diferenciarse a osteoblastos y asistir en terapias de regeneración ósea. Se utilizaron ratas Wistar macho, a las que se les realizaron defectos de tamaño crítico en calvaria y se formaron los siguientes grupos: Grupo 1: control sin tratamiento; Grupo 2: esponja reabsorbible; Grupo 3: fibroblastos dérmicos humanos cultivados en medio inductor incluidas en esponja reabsorbible; y Grupo 4: células troncales cultivadas en medio inductor incluidas en esponja reabsorbible. La eutanasia se realizó a los 30 y 120 días después de la implantación y se procesó el tejido para su análisis histomorfométrico utilizando la tinción de Tricrómica de Masson e inmunofluorescencia para confirmar el origen del tejido óseo neoformado. Mediante PCR y Western Blot se confirmó la presencia de proteínas relacionadas a osteoblastos, después de la inducción *in vitro*. La histomorfometría del grupo con células troncales demostró que se logró regenerar el 86.1% de la superficie del defecto. En la inmunofluorescencia, a los 30 días, las células troncales presentaban positividad tanto a marcadores de MSC como de biomineralización; también se confirmó en origen de estas células con el marcador HNA. La mucosa bucal representa, entonces, un buen candidato para la obtención de manera simple de células troncales que pueden ser usadas en ingeniería de tejidos.

Abstract

Oral mucosa can self-regenerate after an injury due to its population of mesenchymal stem cells. These cells express pluripotency markers and have been used to obtain tissues from the three germ layers. These cells are in an accessible anatomical site, which makes their isolation easier compared to bone marrow derived stem cells, this is an advantage for cellular therapy which need cells in great quantities to generate new tissues. The objective was to demonstrate oral mucosa derived stem cells' capacity for bone regeneration. Critical size defects (9 mm) were made in male Wistar rats; they were sorted into one of four groups: Group 1: Control without treatment; Group 2: Sponge of absorbable gelatin; Group 3: Dermic human fibroblasts cultured in inductive media in sponge of absorbable gelatin; and Group 4: Stem cells cultured in inductive media in sponge of absorbable gelatin. The euthanasia was done on days 30 and 120 after implantation and the tissue was processed for histomorphometric analysis using Masson's Trichrome stain and immunofluorescence to confirm the origin of the newly regenerated bone. The histomorphometric analysis of the stem cell group demonstrated regenerated bone in up to 86.1% of the defect's area. Oral mucosa represents a good candidate for the isolation of stem cells that can be used for cellular therapy due to their capacity for bone regeneration and ease of access to the anatomical site.

Introducción

Las células troncales tienen la capacidad de replicarse y dar origen a células diferenciadas. Poseen tres características: 1) autoregeneración; 2) habilidad para diferenciarse en distintos linajes celulares, y 3) habilidad de crear un tejido específico *in vivo*.¹ El término surge desde el siglo XIX, por las interrogantes generadas por la embriología y el surgimiento del sistema hematopoyético. El descubrimiento de estas células en la médula ósea, llevo a la posibilidad de encontrarlas en otros órganos como la piel, mucosas, sistema nervioso central, etc.² Actualmente, se conocen dos tipos principales de células troncales: las embrionarias y las somáticas o “adultas”. Sin embargo, también se pueden clasificar de acuerdo a los tejidos que pueden formar en: células totipotenciales, cuando pueden dar origen a tejidos de las tres capas embrionarias, extraembrionarios y cuando se encuentran en la etapa de mórula; pluripotenciales y de línea germinal cuando dan origen a tejidos de las tres capas embrionarias y cuando se encuentran en el centro del blastocisto; y somáticas o progenitoras, cuando dan origen al tejido del órgano donde se aislaron.³

Las células troncales adultas se han identificado en varios tejidos, las más estudiadas son las células troncales hematopoyéticas que pueden regenerarse y formar todas las células de la sangre. También se han identificado otras células troncales como las neurales, capaces de originar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos en el cerebro; y las células troncales mesenquimales que dan origen a fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, adipocitos y células de músculo esquelético, entre otras.³⁴ Además las células mesenquimales tienen un cierto grado de plasticidad, lo que significa que pueden diferenciarse en células de dos o tres diferentes capas embrionarias.¹

Un tipo de células recientemente desarrolladas son las células pluripotenciales inducidas, las cuales son células adultas, como fibroblastos dérmicos, queratinocitos, células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental o médula ósea, sangre periférica y células troncales neurales o adiposas, a las cuales se les introducen los factores Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc, mediante transferencia retroviral. Este tipo de células tienen gran capacidad de generar tumores por el uso de c-Myc y Klf4, aunado al uso de

la transferencia retroviral. Por lo que se requiere de investigación de mejores técnicas de de-diferenciación.⁵

Hay otra característica que recientemente se ha estudiado, específicamente de las células troncales mesenquimales, y es su capacidad para inmunomodular su microambiente mediante la secreción de citocinas e IFN- γ , que impiden la detección tanto de células NK como de linfocitos T.^{34,23}

En la mucosa bucal se han logrado aislar células troncales de diferentes sitios de la boca, las cuales incluyen médula ósea, pulpa dental, pulpa dental de dientes deciduos exfoliados, del folículo dental, del germen dental, de la papila apical, mucosa bucal, periostio, ligamento periodontal, glándulas salivales y células derivadas del tejido adiposo.³⁴

La mucosa bucal representa un sitio privilegiado, tanto por ser un sitio sencillo para la obtención de células troncales, como porque estas células son las que tienen el mayor potencial de diferenciación de todos los sitios de la boca. Estas células expresan los marcadores embrionarios sin necesidad de ser inducidas. Kalmani, y cols. (2010) estudiaron la expresión de marcadores, tanto de células troncales mesenquimales (por sus siglas en inglés MSC) como embrionarias (ESC) y la capacidad de diferenciación de las células troncales de la lámina propia de la mucosa bucal *in vitro*. Estas células son positivas >95% a CD29, CD73, CD90, CD105 y CD166, los cuales son marcadores de MSC; positivas ($\geq 60\%$) para SSEA4, Oct4 y Sox2 y en 40% a Nanog que son marcadores para ESC. Mediante el cultivo de estas células se ha logrado obtener, *in vitro*, tejidos de las tres capas embrionarias e *in vivo* tumores mixtos derivados del mesodermo y ectodermo³⁵.

Uno de los principales usos de las células troncales es la regeneración. En cavidad bucal, el hueso es un tejido que se pierde con facilidad y sus características impiden su reparación. El estudio de células troncales en cavidad bucal para usos terapéuticos tiene como objetivo principal regenerar hueso. Treves-Manusevitz *et al.* (2013) lograron diferenciar por primera vez células troncales de la lámina propia de la mucosa bucal a tejidos mineralizados parecidos a cemento y hueso. Confirmando estos resultados con la expresión de moléculas específicas del proceso de biomineralización como lo son: la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP), proteína del cemento

1 (CEMP1), sialoproteína ósea (BSP), fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN), amelogenina (AMEL) y ameloblastina (AMBN)¹⁷.

Antecedentes

Concepto de Célula Troncal

El término célula troncal surge en Alemania (Stemzelle) en 1868, para describir el origen de todos los organismos de un ancestro común; y en 1898 se utilizó para describir el origen del sistema hematopoyético a partir de una sola célula³¹. En el siglo XIX, se empezó a utilizar para explicar la capacidad que tenían algunos tejidos para regenerarse³². Durante mucho tiempo se han definido como células indiferenciadas capaces de auto-renovarse, proliferar, producir un gran número de tejidos y regenerar tejidos. Esto se les atribuía únicamente a las células troncales embrionarias (ESC) que son pluripotentes. Siempre se ha pensado que la capacidad de diferenciación de las células troncales derivadas de tejidos adultos está restringida al tejido del cual provienen. Sin embargo, esta visión está cambiando, ya que algunas células pueden diferenciarse no solo a fenotipos del tejido del que provienen, sino también a otros, por ejemplo, las células troncales hematopoyéticas (HSC) no solo sirven para regenerar la sangre, también contribuyen al mantenimiento de músculo, cerebro, hígado, corazón y endotelio vascular³.

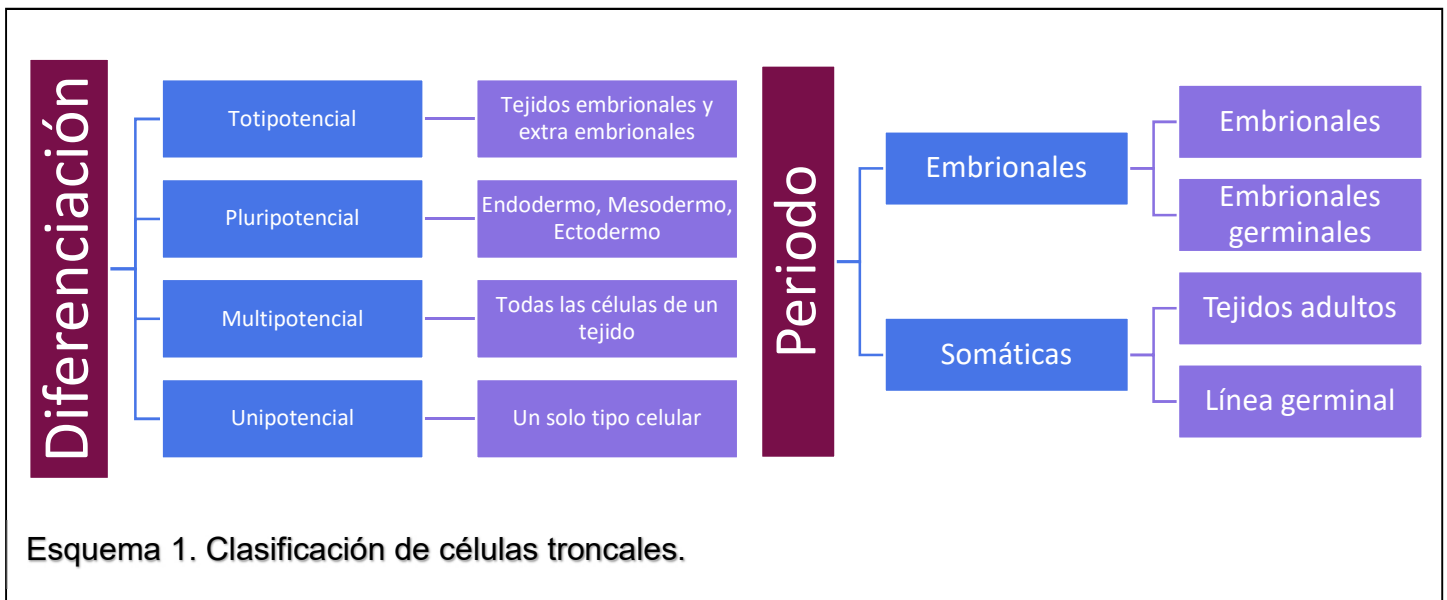
Origen

Las células troncales tienen su origen en la fecundación de un óvulo por un espermatozoide, formando la primera célula: el cigoto. El cigoto es una célula totipotencial ya que de ella se formarán los tejidos embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo) y los tejidos extraembrionarios (trofoblasto, citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto). Sin embargo, no es considerada célula troncal porque no tiene la capacidad de autorenovarse (aunque es tema de discusión). Al dividirse el cigoto y formar la mórula, las células adquieren la capacidad de autorenovarse, por lo que ya se les considera células troncales totipotenciales. Cuando en la mórula se logra identificar el trofoblasto y la masa celular interna se le llama blastocisto y de aquí sólo se podrán obtener células troncales pluripotenciales (si se obtienen de la masa interna y pueden formar tejidos del endodermo, mesodermo y ectodermo) y multipotentes (si se obtienen

del trofoblasto). Durante la gastrulación, la masa celular interna se dividirá en las tres capas germinales, las cuales darán origen a todos los tejidos del cuerpo. En los tejidos adultos, hay una población responsable de mantener el número celular o reparar el daño que puede presentar un organismo a lo largo de su vida; estas células son consideradas multipotentes, porque pueden originar las diferentes células presentes en el tejido. En tejidos que se renuevan constantemente, como los epitelios, hay células capaces de autorenovarse y restablecer el tejido (células basales de los epitelios), ya que solo pueden formar ese tejido en específico se les considera células troncales unipotentes³¹.

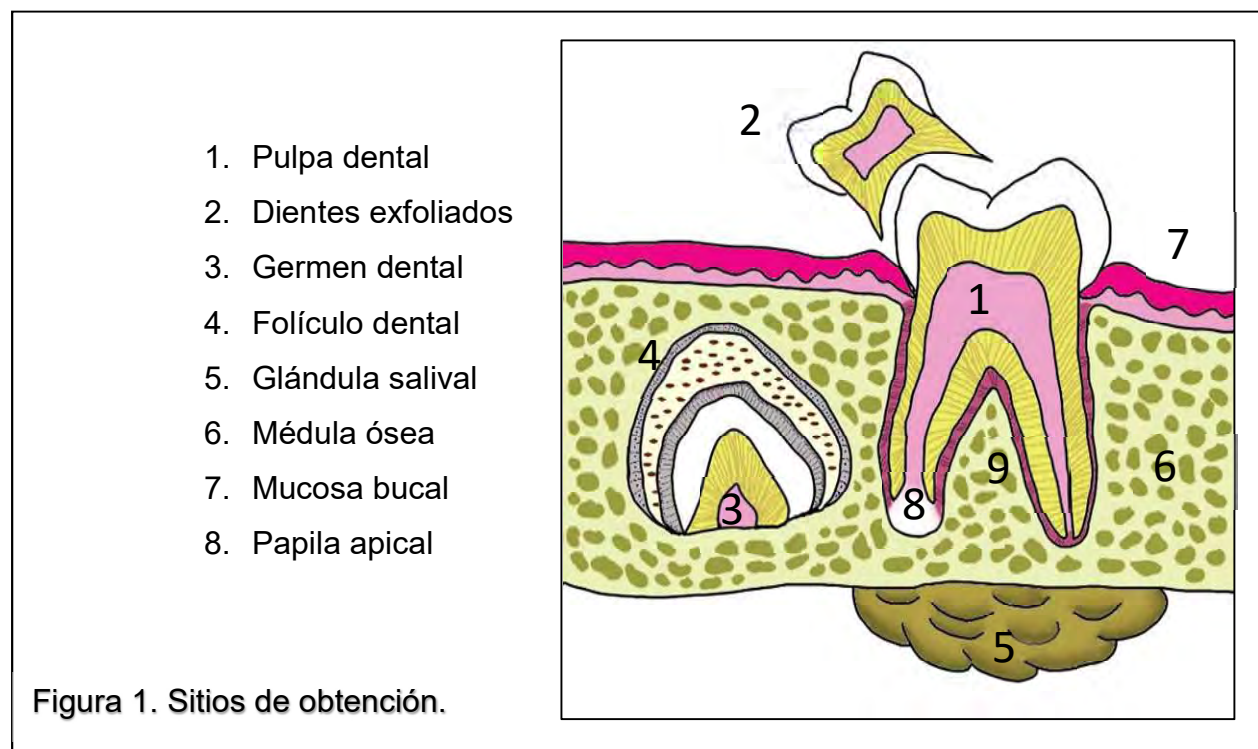
Clasificación

Por lo anterior las células troncales se clasifican de acuerdo al periodo en el que fueron aisladas y a su capacidad de diferenciación (Esquema 1).



Células Troncales Adultas

Este tipo celular se encuentra en todos los tejidos adultos, ya que se requieren para mantener a los tejidos y reparar daño que puedan presentar. Usualmente se encuentran en pocas cantidades, y en lugares específicos de los tejidos conocidos como nichos, en los cuales el microambiente se controla para mantenerlas en quiescencia (sin dividirse) hasta que se requieran, para que no se pierdan durante el envejecimiento. Se pueden aislar de casi cualquier tejido del cuerpo, incluyendo tejidos cavidad bucal³⁴. En cavidad bucal, se han aislado de distintos sitios; como pulpa dental, dientes exfoliados, germen dental, folículo dental, glándulas salivales, médula ósea, mucosa bucal y papila apical (Figura 1).



Cada sitio tiene sus propias características, tanto de expresión de marcadores, como de capacidad de diferenciación³⁴ (Tabla 1).

Tabla 1. Diferencias de las células troncales por sitio de obtención.

Origen	Marcadores representativos	Diferenciación <i>in vitro</i>	Diferenciación <i>in vivo</i>
<i>Pulpa dental</i>	STRO-1, Nestin	dent (od), mes (os, ad, cho, mio), ect (neu)	dent (dentina, pulpa), mes (adiposo, músculo)
<i>Dientes deciduos</i>	STRO-1, Oct-4, Nanog, Nestin, SSEA-3, SSEA-4	dent (od), mes (os, ad, cho, myo, endo), ect (neu)	dent (dentina), mes (hueso, capilares)
<i>Folículo dental</i>	STRO-1, HLA clase 1	dent (cem), mes (os, ad, cho), ect (neu)	dent (cemento, PDL), mes (hueso alveolar)
<i>Germen dental</i>	STRO-1, Oct-4, Nanog, HLA class 1	mes (os, ad, endo), ect (neu), end (hep)	mes (hueso)
<i>Papila apical</i>	STRO-1, Nestin, Survivin	mes (ad), ect (neu)	dent (dentina, pulpa)
<i>Ligamento periodontal</i>	STRO-1, Scleraxis	dent (cem), mes (os, ad, cho), ect (neu)	dent (cemento, PDL), mes (hueso alveolar)
<i>Mucosa bucal</i>	STRO-1, Oct-4, Nanog, Nestin, SSEA-4, HLA-ABC, Sox-2, Tra2 49, Tra2-54	mes (os, ad, cho), ect (neu, célula glial), end (célula definitiva del endodermo)	mes (hueso, cartílago, adiposo, músculo), ect (epitelio, tejido neural)

Linajes de diferenciación: dent (dentinogénico), mes (mesodérmico), ect (ectodérmico), end (endodérmico), od (odontoblasto), os (osteoblasto), ad (adipocito), cho (condrocito), myo (mioblasto), neu (célula neuronal), endo (célula endotelial), cem (cementoblasto), hep (hepatocito). Modificado de: Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M. Stem Cells in Dentistry – Part I: Stem Cell Sources. J Prosthodontic Research, 2012, 56:151–165

Células troncales derivadas de la mucosa bucal

La mucosa bucal es un tejido que proviene de la cresta neural, que es una especialización del ectodermo. Durante la vida, la mucosa bucal está en constante regeneración, esto debido a la fricción que sufre durante la actividad de masticar y hablar. Usualmente las heridas de la mucosa bucal se curan por regeneración sin complicaciones y sin dejar cicatriz³⁵. En varios estudios se ha visto que incluso los fibroblastos de mucosa bucal se comportan de manera muy similar a fibroblastos fetales e incluso su matriz extracelular tiene características parecidas a la fetal^{5,6,7}. Debido a esto, se pensó que la mucosa bucal debería tener una población de células troncales, con gran capacidad de proliferación que pudieran mantener la población. En 2010 se caracterizaron por primera vez las células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal⁵. Estas células presentan una gran capacidad de proliferar. Expresan marcadores tanto de células troncales embrionarias, como de troncales mesenquimales; su eficiencia de expansión *in vitro* y de diferenciación no se ve disminuida por el envejecimiento. De manera relevante, su rango de diferenciación es muy amplio ya que se han obtenido células derivadas de las tres capas embrionarias *in vitro* y teratomas bilineales (ectodermo y mesodermo) *in vivo*³⁵.

Marcadores para células troncales

Las células troncales, para poder ser identificadas como tales, tienen que tener un cierto fenotipo. Este fenotipo suele cambiar dependiendo del tipo de célula troncal o del tejido adulto del cual fueron aisladas. Sin embargo, ciertos marcadores siempre permanecen igual.

Embrionales

La pluripotencia y la autorenovación son las características más importantes de una célula troncal; estas características son reguladas mediante una red de expresión de tres factores principales que son: Oct4, Sox2 y Nanog. Cualquier cambio en esta red de expresión coordina cambios en diferentes aspectos celulares, que llevarán a la célula por un camino definido, ya sea mantener la pluripotencia y autorenovación, o diferenciarse⁸.

Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4)

Es un regulador transcripcional de la pluripotencia (naive). Pertenece a la familia de factores de transcripción POU (P- pituitary-specific, O- octamer binding, U- neural Unc-86 transcription factor). Este factor está relacionado a la autorenovación de ESC indiferenciadas. Su inactivación o sobreexpresión promueve la diferenciación. Es capaz de reprogramar células somáticas⁹.

Sox2

Es miembro de la familia de factores de transcripción Sox (SRY-related HMG-box), se requiere para el desarrollo del epiblasto. Mantiene la pluripotencia en ESC. Sin embargo, éste, a diferencia de Oct4 y Nanog, también es expresado por células que no son pluripotenciales¹⁰.

Nanog

Es un factor de transcripción, específico de células troncales. Su expresión ayuda a mantener la autorenovación y pluripotencia. En su ausencia las células se diferencian inmediatamente¹⁰.

Mesenquimales

Ya que las células troncales mesenquimales (MSC) pueden provenir de cualquier tejido adulto, su inmunofenotipo ha sido más difícil de determinar. El consenso actual es que deben ser positivos a CD73, CD105 y CD90 y negativos a CD45, CD34, CD14, CD79a y HLA-DR¹¹.

CD73 (ecto-5'-nucleotidasa)

Es una enzima que sirve para convertir el adenosinmonofosfato (AMP) en adenosina. Se encuentra unida a la cara externa de la membrana plasmática. También se cree que participa en las interacciones estromales de la médula ósea, migración de MSC y modulación de la inmunidad por parte de las MSC¹².

CD 90 (Thy-1)

Su función no está bien definida, pero se ha propuesto que participa en interacciones célula-célula, como la adhesión de monocitos al endotelio y a fibroblastos y también en la adherencia al estroma de células CD34+¹².

CD105 (Endogлина)

Es un receptor de la familia TGF- β , que desempeña una función en la señalización durante la angiogénesis y durante la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos¹¹.

Estos tres marcadores no nos indican ninguna función troncal, pero la combinación de los tres nos ayuda a identificar células en nichos celulares específicos dentro de los tejidos adultos, mismas que, usualmente, se considera que se encuentran alrededor de capilares^{11,12,36}.

CD34

Es una proteína de adhesión que marca el inicio de la diferenciación en la hematopoyesis. Se le considera de linaje específico³⁶.

CD45

Es un marcador de linaje linfocítico T; es una proteína que se requiere para la activación de las células T³⁶.

HLA-DR

También conocido como el complejo mayor de histocompatibilidad clase II, es parte del complejo que presenta antígenos al sistema inmune adaptativo. También forma parte del sistema de reconocimiento de lo propio vs. lo extraño, por lo que suele ser uno de los causantes de rechazo en los trasplantes de órganos³⁶.

¿Qué tipo de células son las células troncales derivadas de la mucosa bucal?

Las células troncales obtenidas de la mucosa bucal son consideradas MSC, pero presentan positividad no sólo a los marcadores de células troncales mesenquimales, sino también a algunos marcadores de células troncales embrionales. Este hecho hace que estas células presenten la pluripotencia que demostraron *in vivo* y las hace candidatas adecuadas para ser utilizadas en estudios de ingeniería de tejidos.

Diferenciación

Para poder utilizar las células para regenerar un tipo de tejido específico, se requiere tener control sobre su destino final, por ejemplo, si queremos hueso, tenemos que asegurarnos de tener osteoblastos y no condrocitos.

Para poder diferenciar las células al tejido de nuestra elección, en este caso, el tejido óseo, lo primero que tenemos que conocer es cómo sucede de manera natural la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos.

Osteogénesis

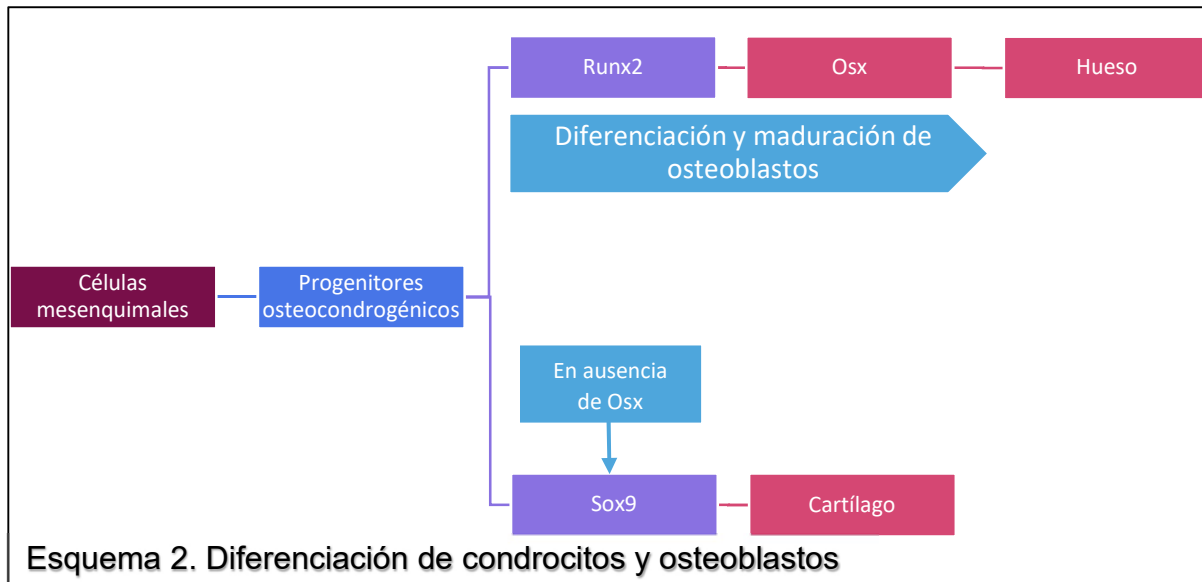
En el embrión hay dos tipos de osificación:

1. Formación de hueso intramembranoso. El hueso se deposita en la matriz de tejido conjuntivo o mesénquima.
 - a. El mesénquima embrionario se sustituye por tejido conjuntivo.
 - b. Las células se agregan y adquieren forma cilíndrica (osteoblastos) y secretan matriz ósea (centro de osificación).
 - c. Múltiples centros de osificación se fusionan formando trabéculas de hueso esponjoso (esto porque las fibras de colágeno están dispuestas de manera aleatoria).
 - d. El fosfato de calcio se deposita en esta matriz por aposición.
 - e. El hueso se remodela y ahora la matriz se deposita de forma lineal, lo que se conoce como hueso laminar o lamelar.
 - f. La formación ósea conduce a dos eventos: el atrapamiento de los osteoblastos (que se convierten en osteocitos) y la formación de la médula ósea.

-
- g. Los eventos finales de la osteogénesis consisten en la sustitución del hueso trabecular por hueso lamelar y la condensación del tejido conjuntivo en el endostio y periostio¹³.
2. Formación de hueso endocondral. El hueso sustituirá al cartílago hialino preexistente.
- a. Debe haber primero una estructura de cartílago (cartílago esquelético).
 - b. El centro de osificación primario se formará dentro del cartílago.
 - c. Los vasos sanguíneos invaden al cartílago y se establece el centro de osificación secundaria.
 - d. Las células osteoprogenitoras alcanzan al cartílago calcificado y se diferencian en osteoblastos.
 - e. Los osteoblastos empiezan a secretar osteoide.
 - f. El centro de osificación primaria crecerá, por un lado, de manera intramembranosa y por el otro, a través de un centro de osificación dentro del cartílago, lo que le permite al hueso crecer¹³.

Vías de señalización que participan en la osteogénesis

Diversas vías de señalización convergen en el factor de transcripción Runx2, el cual es considerado el control maestro para la diferenciación de células mesenquimales y condrocitos hipertróficos, a osteoblastos. La principal vía de señalización por la cual se activa Runx2 es la de BMP2, que es un receptor de la familia del TGF- β . Una vez activo, Runx2 ayudará a la transcripción de Osx, que compromete a las células al linaje osteoblástico y a su posterior maduración a osteocitos; además, también inhibirá a Sox9 para que los condrocitos se diferencien en osteoblastos. Importante para la osificación intramembranosa, Osx también es mantenido a través de su activación por BMP2¹⁴ (Esquema 2).



Diferenciación osteogénica de células troncales

Para diferenciar a las células troncales en osteoblastos, o en algún otro tipo celular, se utilizan medios condicionantes que son capaces de activar las vías de señalización necesarias para expresar las proteínas que los distintos fenotipos celulares requieren.

Para poder diferenciar a hueso el principal factor que debe ser activado es Runx2. Para llevar a cabo su activación se utiliza el medio adicionado con tres suplementos:

1. Dexametasona
2. β -glicerofosfato
3. Ácido Ascórbico

Los tres participan en la diferenciación *in vitro* de células troncales de la siguiente manera:

1. La dexametasona a bajas concentraciones ($10^{-8}M$), puede activar receptores de glucocorticoides, que a su vez transcriben coactivadores de los factores de transcripción que incrementarán la expresión de Runx2.
2. El β -glicerofosfato sirve de fuente para que la matriz que generen las células durante su diferenciación mineralice y esto actúe para reforzar su fenotipo.
3. El ácido ascórbico facilita la síntesis de colágena tipo I, al ser secretada, se unirá a la integrina $\alpha1\beta1$ y activará la vía de las MAPK, que ayudarán a fosforilar a Runx2, lo que lo activará para que pueda transcribir a las proteínas relacionadas a la biomineralización¹⁵.

Planteamiento del Problema

Un defecto óseo, puede ser ocasionado por fracturas (por traumatismos, patologías o asociadas a enfermedades como osteoporosis), por tratamientos de neoplasias, tanto en maxilares como de huesos largos y por malformaciones congénitas (e.g. labio y paladar hendido). Los tratamientos para defectos óseos críticos (que no cicatrizan sin intervención) son procedimientos dolorosos, que conllevan el uso de placas de metal o injertos óseos, para los cuales se toma hueso de otros sitios como la cresta ilíaca. Incluyen múltiples cirugías en dos sitios anatómicos del paciente (el sitio donador y el sitio receptor), lo que provoca riesgos como infecciones, cicatrización lenta y dolorosa, tratamientos prolongados (hasta décadas) y un costo elevado tanto para la familia como para los sistemas de salud. El costo anual que tiene la corrección de estos defectos para el sistema de salud en Estados Unidos, es de aproximadamente \$549 millones de dólares¹⁶.

Justificación

Utilizando células troncales que tengan la capacidad de regenerar hueso, se puede eliminar la necesidad de tomar injertos óseos de otros sitios anatómicos de difícil acceso. Con esto se pueden reducir los tiempos de recuperación, número de cirugías y riesgos para el paciente.

Las células obtenidas de cavidad bucal son opción adecuada, ya que, la cavidad bucal, es un sitio de fácil acceso y su capacidad de proliferación no pone un límite a la obtención de las células, como en médula ósea. En estudios anteriores ya se ha determinado su capacidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo* hacia tejidos mineralizados^{35,17}.

Hipótesis

Las células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal, al ser inducidas hacia un fenotipo mineralizante *in vitro*, promoverán la regeneración de defectos óseos de tamaño crítico (no regeneran de manera espontánea) en calvarias de ratas Wistar.

Objetivo General

Determinar el potencial de regeneración ósea de las células troncales provenientes de la lámina propia de la mucosa bucal en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas Wistar.

Objetivos Específicos

- Evaluar mediante qRT-PCR y Western blot el fenotipo de las células después de su inducción *in vitro*.
- Evaluar histológicamente la formación y tipo de tejido en el área del defecto de tamaño crítico de las calvarias de ratas Wistar.
- Cuantificar la cantidad de tejido óseo formado en la zona del defecto en las calvarias de ratas Wistar, por medio de histomorfometría.
- Evaluar la expresión de marcadores, tanto de células troncales como de biomineralización en cortes obtenidos de las calvarias de ratas Wistar.

Materiales y Métodos

Cultivo Celular

Se llevó a cabo el cultivo celular de fibroblastos dérmicos humanos como grupo control (Primary Dermal Fibroblasts; normal, human, adult (ATCC® PCS-201-012™)) (HDF) y células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal (hOMSC) como grupo experimental. Las líneas celulares se obtuvieron por medio del método de explante y se cultivaron en cajas de cultivo de 75 cm² en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con SFB (Suero Fetal Bovino) al 10% y antibióticos (100 µg/ml estreptomina y 100 UI/ml penicilina, Sigma Chemical CO, Saint Louis MO). Tanto las células derivadas de piel humana como las células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal fueron inducidas hacia el fenotipo mineralizante al cultivarlas en medio DMEM, suplementado con SFB al 10%, 10 mM de β-Glicerofosfato, 50 µg/mL de ácido ascórbico y dexametasona a 10⁻⁸M. Las células se incubaron en un ambiente 100% de humedad a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂. Los cultivos celulares se utilizaron en pasajes tempranos (2^{do} pase) para los procedimientos experimentales.

qRT-PCR

El RNA fue aislado después de 0, 5, y 10 días de inducción en medio “mineralizante”, utilizando tiocinato de guanidina (Trizol) (Invitrogen, USA), de las células hOMSC y HDF de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El RNA fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro NanodropND-1000 (Eppendorf, USA) con 2µl de muestra. El rango se estableció entre 260 y 280nm para medir la pureza del RNA; se consideró adecuado si se encontraba entre 1.8 y 2 de densidad óptica.

Se determinaron transcritos de la línea osteoblástica mediante reacciones de qRT-PCR, para lo cual se utilizaron 10ng de RNA. Se realizó el análisis por triplicado, tanto por línea celular como por tiempo de cultivo. La programación fue la siguiente: dos periodos de desnaturalización a 60°C durante 30 segundos y realineamiento a 60°C por 30 segundos; la extensión fue a 72°C por un minuto.

Los primers utilizados están reportados en la tabla 2.

Tabla 2. Primers para qRT-PCR

Gen	Secuencia (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: CAACGGATTTGGTCGTATTGG R: GCAACAATATCCACTTTACCAAGAGTTAA
<i>BMP2</i>	F: CCCAGCGTGAAAAGAGAGAC R: GAGACCGCAGTCCGTCTAAG
<i>RUNX2</i>	F: AGGAATCGCCCCTAAATCACT R: ACCCAGAAGGCACAGACAGA
<i>OSX</i>	F: GCCAGAAGCTGTGAAACCTC R: GCTGCAAGCTCTCCATAACC
<i>MGP</i>	F: TGAAGAGCCTGATCCTTCTTGCCA R: TAGAGCGTTCTCGGATCCTCTCTT
<i>BSP</i>	F: AACGAGAAAGCGAAGXA R: CCTGCCTCGCTGGTGG

Western Blot

Se midieron las expresiones relativas de BMP2, Runx2, Osx y BSP, como control se utilizó GAPDH. Se midieron tanto para las hOMSC como para las HDF. Los cultivos se mantuvieron por 0, 5, y 10 días. En cada plazo, a las células se les retiró el medio y se les colocó amortiguador de lisis frío (1mM EDTA, pH 8.0, 10mM Hepes, 50mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 1mM fenil-feni-metil-sulfonil fluoriro, 5 µM de leupeptina y 10µg/µl aprotinina), posteriormente fueron sonicadas y centrifugadas por 5 min a 2,000 rpm. El sobrenadante se separó y se colocó en un tubo nuevo. La cuantificación se realizó por método de Bradford. Se cargaron 30µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 12% y se colocó en una cámara de electroforesis a 12mA por 2h. Posterior a la electroforesis se transfirieron a membranas de polímero de polivinildenedifloride (PVDF) (Millipore, USA). Inmediatamente después de la transferencia se tiñeron con solución de Ponceau, para observar de manera adecuada los carriles y cortar las membranas. Se bloquearon

con leche descremada al 5% durante 1hr a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con TBST. Los anticuerpos policlonales de conejo contra BMP2, Runx2, Osx, BSP y GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA), se incubaron a diluciones de 1:500 (BMP2), 1:1000(Runx2, Osx, BSP) y 1:2000 (GAPDH) durante 12hrs a temperatura ambiente en agitación. Después de realizar nuevamente 3 lavados con TBST se incubo el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) durante dos horas a temperatura ambiente. Para el revelado se realizaron lavados con TBST y se reveló con diaminobenzidina (Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), NiCl₂, H₂O₂, PBS). Los blots se escanearon y se analizaron con el software ImageJ, excluyendo el fondo y contando los pixeles presentados en cada gen comparándolos contra el GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes.

Preparación de los andamios

Se recortaron discos de Gelfoam a un diámetro de 9 mm, y fueron esterilizados con luz UV. Una vez realizado esto, se sembraron células HDF y hOMSC a una densidad de 2x10⁶ células en 100 µl en el Gelfoam y se incubaron durante 2h en las condiciones anteriormente mencionadas, para permitir la penetración de las células en la estructura tridimensional del Gelfoam. Posteriormente, los andamios, en conjunto con las células, se incubaron durante toda la noche para realizar el procedimiento quirúrgico de implantación en las calvarias de rata al siguiente día, previa preparación del defecto de tamaño crítico.

Procedimiento Quirúrgico

Se utilizaron 48 ratas macho, cepa Wistar de 12 semanas y peso 250-300 gramos. Las ratas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos siguiendo el parámetro de la Norma Oficial Mexicana, NOM-052-ZOO1999 la cual describe las especificaciones técnicas, cuidados y uso de animales de laboratorio. Se siguieron, además, los procedimientos establecidos por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la UNAM, por el cuál fue aprobado este proyecto.

Las ratas fueron sedadas y tranquilizadas con Zolazepam (20-40 mg/kg) y Maleato de acepromacina (0.5-1 mg/kg), ambas por vía intramuscular. Se rasuró la zona

quirúrgica y se realizó antisepsia de rutina con yodopovidona. Se aplicó anestésico en la zona quirúrgica (mepivacaína con epinefrina), y a continuación se realizó una incisión lineal de 3 cm a través de la piel y el periostio de la calvaria hasta exponer el vértice craneal. Para la creación el defecto de tamaño crítico, se utilizó una trefina de 9 mm de diámetro (tamaño del defecto), montada en un motor para implantes a 1,800 rpm. El defecto se delimitó con dicha trefina en el hueso parietal derecho, evitando la línea media de la calvaria para no dañar el seno cavernoso, irrigando con una solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS). Posteriormente, con un cincel se realizó el clivaje del fragmento óseo, teniendo especial precaución de no dañar la duramadre. Finalmente, se lavó la zona con PBS estéril para remover detritos. Los animales fueron asignados a cada una de las diferentes condiciones de los cuatro grupos con dos tiempos distintos. Se colocó satín hemostático S-100 sobre el defecto. El sitio quirúrgico fue suturado con puntos aislados de ácido poliglicólico 4-0. Las ratas fueron alimentadas con Rodent Diet 5001 *ad libitum*.

Grupos:

1. Grupo Control. Se le realizó el defecto de tamaño crítico y no recibió ningún tratamiento. 12 ratas Wistar (eutanasia a los 30 y 120 días)
2. Grupo Control. Se le realizó el defecto de tamaño crítico y el éste se cubrió con el andamio consistente de Gelfoam (gelatina). 12 ratas Wistar (eutanasia a los 30 y 120 días)
3. Grupo Control. Se le realizó el defecto de tamaño crítico y el éste se cubrió con el andamio consistente de Gelfoam (gelatina) al cual se le adicionó células (HDF) a una densidad de 2×10^6 . 12 ratas Wistar (eutanasia a los 30 y 120 días).
4. Grupo Experimental. Se le realizó el defecto de tamaño crítico y el éste se cubrió con el andamio consistente de Gelfoam (gelatina) al cual se le adicionó células (hOMSC) a una densidad de 2×10^6 . 12 ratas Wistar (eutanasia a los 30 y 120 días).

Eutanasia

Se llevó a cabo al término de cada periodo, utilizando monóxido de carbono para evitar dolor y sufrimiento a los animales de experimentación y de acuerdo a lo establecido en el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Histología e Histomorfometría

El tejido proveniente de las calvarias se fijó en formaldehído al 10% por 24h, y después se descalcificó en formaldehído al 10% con ácido nítrico al 5% por 60h, y finalmente se embebió en parafina. Se realizaron cortes secuenciales que fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para el análisis histológico, con Tricrómica de Masson (TM), para la histomorfometría; o dejadas en blanco para inmunofluorescencia (IF). El análisis histomorfométrico se realizó en vistas panorámicas del tejido utilizando el software Zen Lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). El fragmento óseo que se obtuvo durante la cirugía fue utilizado como control.

μCT

Se tomaron microtomografías en μPET, μSPECT, μCT (Albira) en el Instituto Nacional de Cancerología, a los 30 y 120 días en 3 ratas, seleccionadas al azar. Se utilizó una fuente de rayos X de 35 micras (tamaño nominal de punto), 50kVp, 1 mA máx, CT-Good HD-LV, con un offset 158mm. La reconstrucción 3D se realizó a máxima intensidad de proyecciones con el software del aparato.

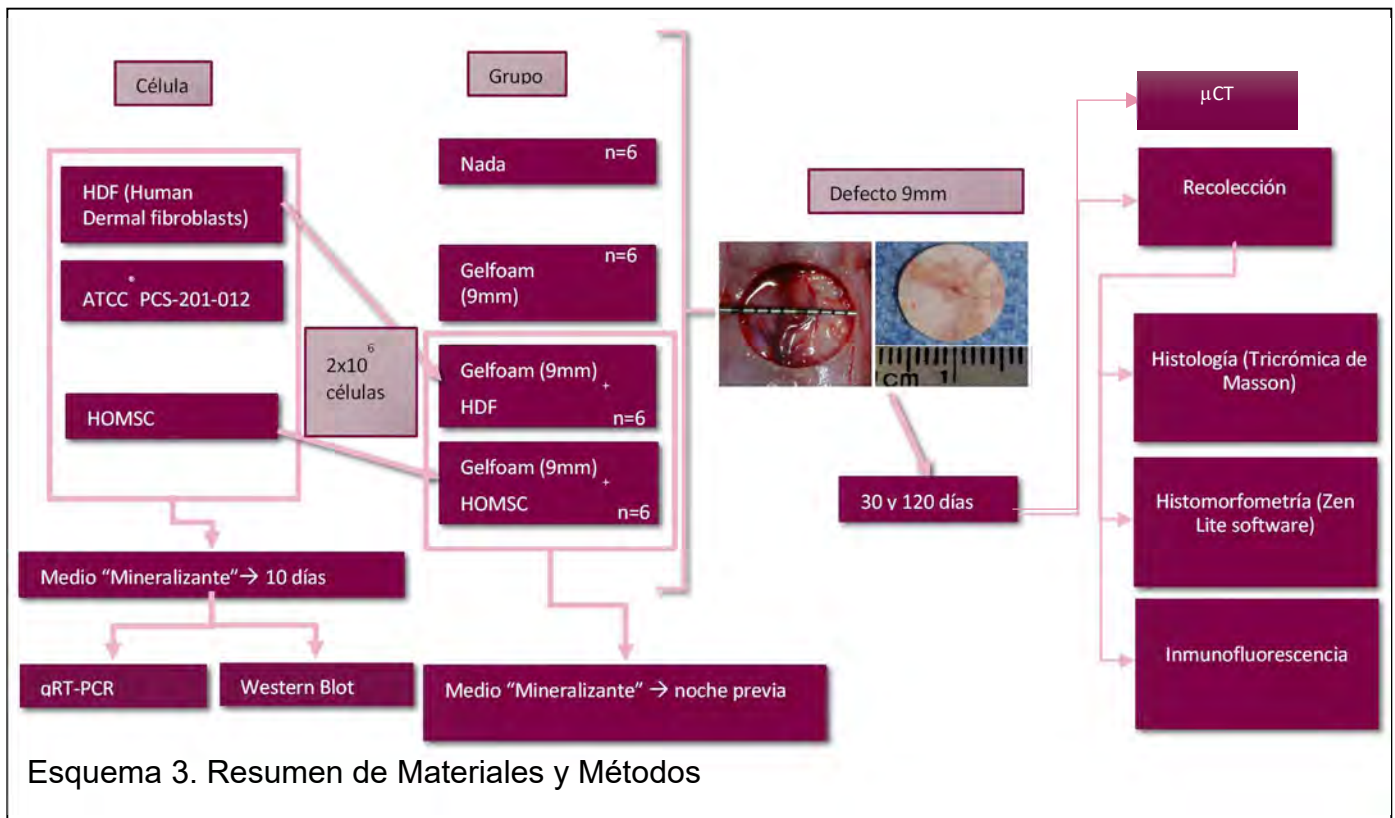
Expresión de marcadores de células troncales, hueso y humanos

Se utilizaron los cortes en blanco. Se realizó doble tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales de conejo y cabra contra CD90, CD105, CD34, CD45, OCN, BSP y TNSALP humanos (que no cruzan con rata) y monoclonales contra BSP, HLA-DR, STRO-1 y CD73 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA). También se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón específico contra el antígeno nuclear humano (HNA) (Abcam, Cambridge, UK). Los cortes fueron tratados con BSA al 2% en PBS por una hora a temperatura ambiente e incubados con diluciones 1:50 de los anticuerpos monoclonales y policlonales por 12h a 4 C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS con

Tween 20 al 0.1% dos veces y un lavado con PBS por 5min cada uno. Al terminar, los cortes fueron incubados con los anticuerpos secundarios conjugados FITC- anti-ratón IgG (Molecular Probes; Eugene, OR) Alexa-Fluor-594-anti-conejo IgG (Molecular Probes) o Texas Red-anti-cabra IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA), diluidos 1:400 durante 2hrs a temperatura ambiente. Las muestras fueron evaluadas utilizando un microscopio para fluorescencia (Axioskope 2, Carl Zeiss, Germany) con la combinación de filtros apropiados. Los controles negativos se obtuvieron al omitir el anticuerpo primario. Se utilizó el hueso obtenido de la calvaria como segundo control.

Análisis Estadístico

La determinación de la expresión en el análisis por qRT-PCR se realizó por el software Rotor Gene 6000 (Qiagen, USA), mediante el estudio $\Delta\Delta ct$, y cada par de genes se analizó utilizando T de Student. La cantidad de tejido óseo se midió utilizando el software ZEN Lite (Carl Zeiss, Germany) en reconstrucciones de los cortes histológicos y analizados, utilizando T de Student a dos colas. La p se estableció <0.05 . Ambos análisis se realizaron en el software GraphPad (GraphPad Software Inc., USA).



Resultados

qRT-PCR

Se utilizó el análisis $\Delta\Delta ct$ para obtener la expresión relativa de cada gen comparado contra el GAPDH y su tiempo 0. Se analizaron a 5 y 10 días. En el análisis a los 5 días, BMP2 se encontraba más expresado en los HDF, sin embargo, no se encontró diferencia significativa con la expresión obtenida por hOMSC ($p=0.4444$). A los 10 días, en cambio, se encontraba expresada en mayor cantidad en hOMSC y de manera significativa comparada con los HDF ($p=0.0175$). Runx2 se encontraba más expresada en HDF a los 5 días que en hOMSC de manera significativa ($p=0.0009$), pero se perdió a los 10 días, para los cuales ya no había diferencia significativa entre las dos líneas ($p=0.3500$). Osx se encontraba sobreexpresado en hOMSC, tanto a los 5 como a los 10 días; en cambio, no se observaba en HDF en ninguno de los periodos de tiempo ($p=0.0010$ y $p=0.029$, respectivamente). BSP fue incrementando su expresión gradualmente en los periodos de tiempo; se encontraba más expresada a los 5 días en hOMSC que en HDF ($p=0.0012$), pero HDF incrementaba su expresión a los 10 días, aunque no de manera significativa ($p=0.4304$). MGP se encontraba sobreexpresada en hOMSC tanto a 5 como a 10 días y en HDF no se observaba expresión ($p=0.0001$ y $p<0.001$, respectivamente) (Figura 2).

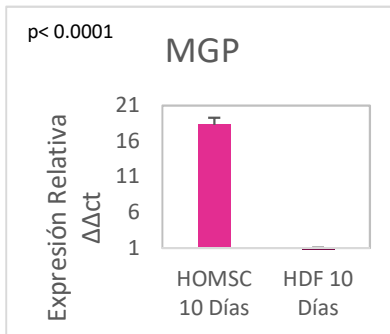
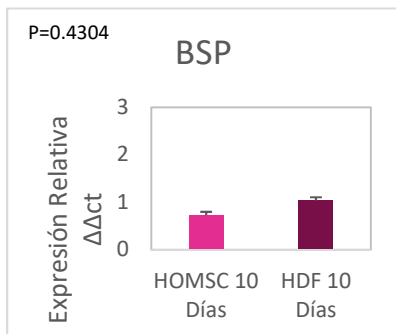
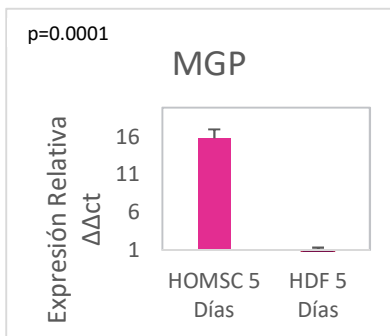
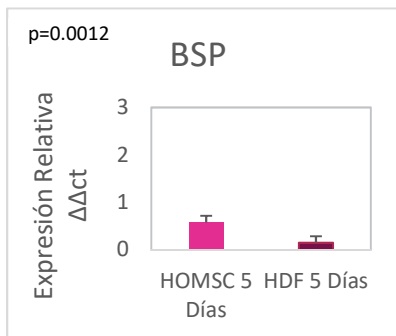
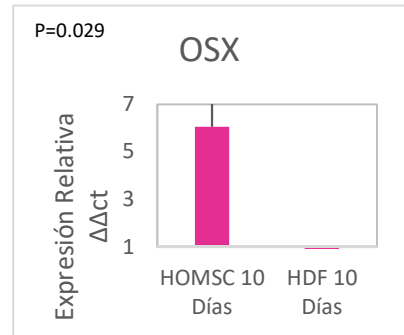
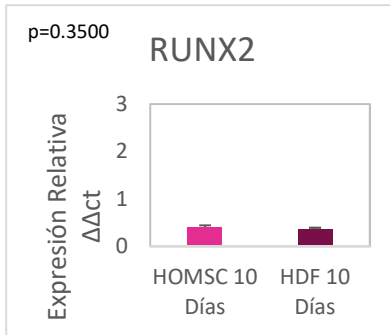
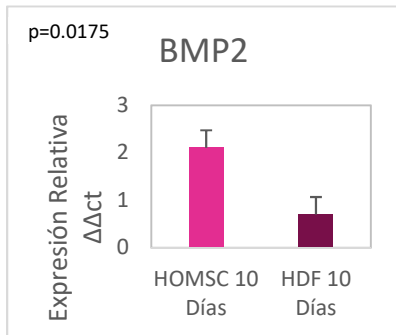
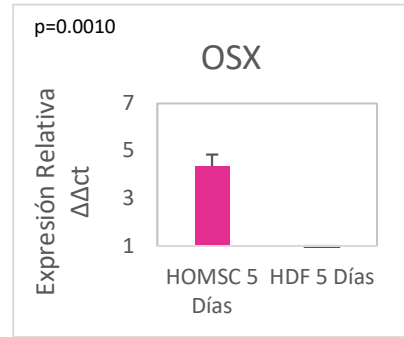
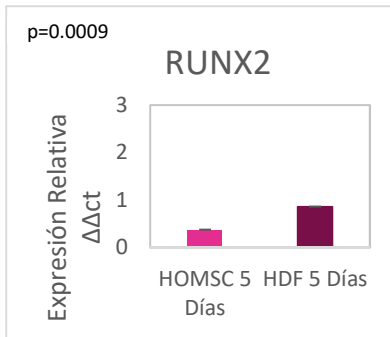
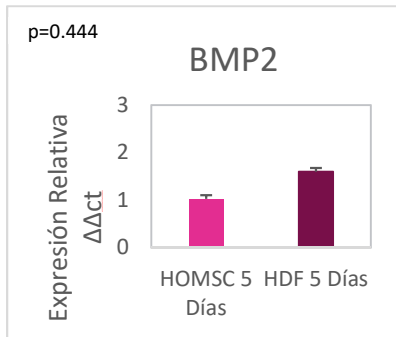
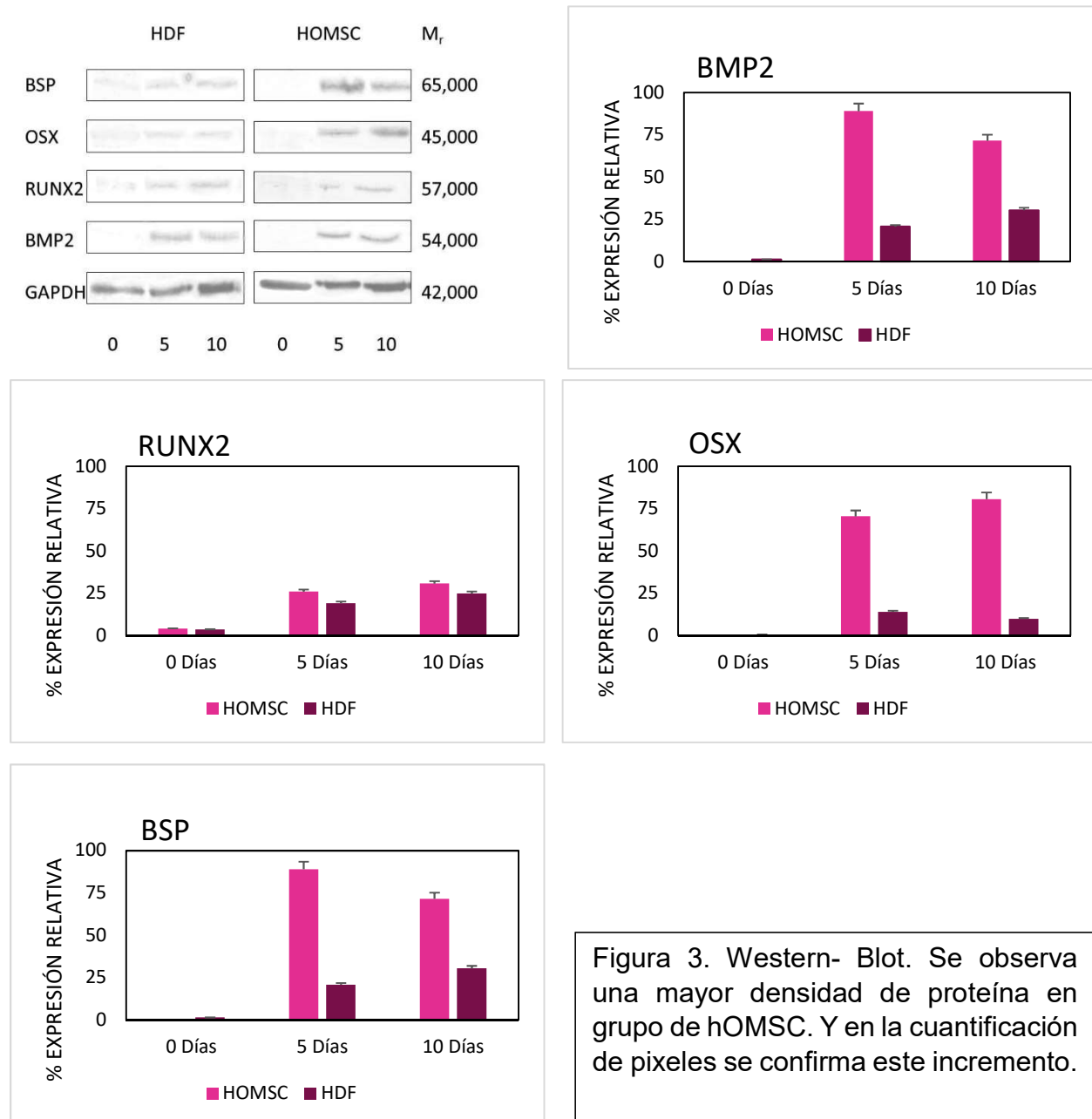


Figura 2. Expresión Relativa por $\Delta\Delta ct$ del qRT-PCR. Se observa diferencia significativa en la cantidad de transcrito para los marcadores BMP2 a 10 días, Runx2 a 5 días, Osx a 5 y 10 días, BSP a 5 días y MGP a 5 y 10 días.

Western Blot

La cuantificación relativa del Western Blot, se realizó para confirmar la presencia de las proteínas aparentemente presentes en el qRT-PCR. Se observaba una mayor densidad de proteínas relacionadas con el fenotipo osteoblástico en la línea de hOMSC que en los HDF. Las densidades se obtuvieron comparando contra la densidad de GAPDH, la cual representa el 100% (Figura 3).



Histología e Histomorfometría

Se estudiaron cortes histológicos con diversas condiciones experimentales: andamio solo, andamio con hOMSC y andamio con HDF, y con el propósito de determinar que efectivamente el defecto era de tamaño crítico (asegurando así, éste no cerraría sin intervención) se realizó un grupo sin tratamiento. Los defectos se analizaron a los 30 y 120 días.

A los 30 días, el grupo sin tratamiento sólo presentaba una capa de tejido conjuntivo fibroso que unía a los dos bordes del defecto, en el cual no se observaba reacción inmune o formación de hueso. El grupo tratado solamente con el andamio de gelfoam, presentaba una capa gruesa de tejido conjuntivo fibroso. El grupo que contenía HDF demostró formación ósea, que se extendía desde el borde del defecto, aunque el defecto como tal seguía unido por una capa de tejido conjuntivo fibroso muy vascularizado. De manera relevante se observaba reacción inmune tipo cuerpo extraño e infiltrado inflamatorio crónico severo, compuesto por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos en varios sitios de los cortes examinados. Por último, en el grupo que contenía hOMSC demostraba islas delgadas de tejido óseo en el centro del defecto, las cuales estaban conectadas al borde del mismo por tejido conjuntivo fibroso muy vascularizado. En observaciones a más detalle, se encontraron múltiples centros de osificación que se fusionaban en trabéculas rodeando vasos sanguíneos, que semejabán espacios medulares. Considerando el origen de las células (humano) y de la especie del huésped (rata), es importante resaltar que no se observó reacción inmune en los cortes examinados.

A 120 Días, el grupo sin tratamiento presentaba las mismas características que a los 30 días; los bordes del defecto estaban unidos por una capa delgada de tejido conjuntivo fibroso. El grupo que sólo contenía gelfoam, de igual manera, sólo presentaba una capa gruesa de tejido conjuntivo fibroso denso. El grupo HDF, seguía presentando crecimiento desde los bordes del defecto y estos se encontraban unidos por una capa delgada de tejido conjuntivo fibroso denso. Al examinar a mayor detalle, se observaba que el infiltrado inflamatorio había disminuido o desaparecido en su totalidad. En el grupo de hOMSC se observaba que las islas de tejido óseo se habían engrosado y ya no sólo presentaban hueso esponjoso; alrededor del hueso esponjoso se había depositado

hueso lamelar que demostraba que ya había maduración y remodelación ósea. Las islas llenaban casi en su totalidad el defecto, pero todavía se encontraban unidas a los bordes por tejido conjuntivo fibroso denso muy vascularizado.

En la histomorfometría se demostró que el grupo de HDF había formado hueso en un $24\% \pm 3.3\%$ y $30\% \pm 2.4\%$ a 30 y 120 días, respectivamente. El grupo de hOMSC había formado hueso en un $52\% \pm 2.3\%$ y $86.1\% \pm 1.2\%$ a 30 y 120 días, respectivamente.

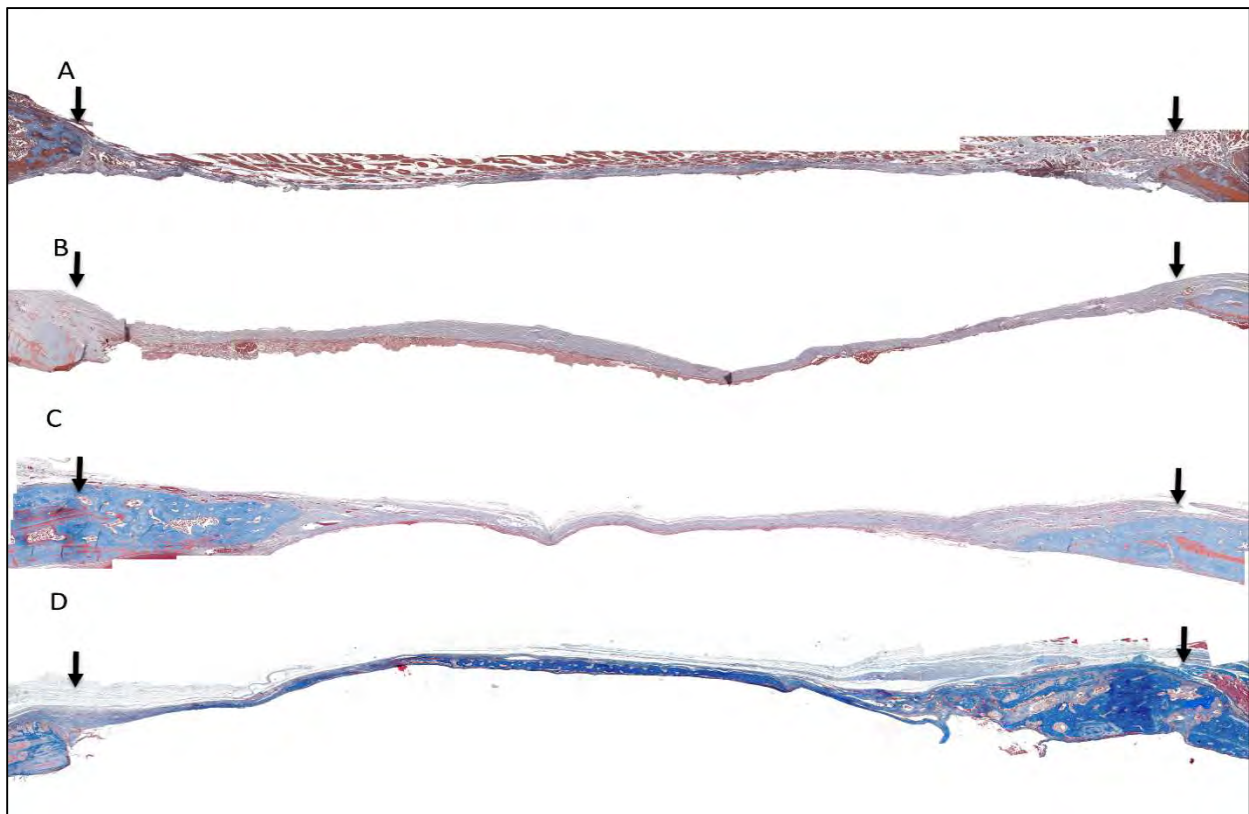


Figura 4. Reconstrucción panorámica de las calvarias de rata a 30 días. A. Grupo sin tratamiento. B. Grupo con Gelfoam. C. Grupo con Gelfoam y HDF. D. Grupo con Gelfoam y hOMSC. Las flechas indican los bordes del defecto. Teñidas con Tricrómica de Masson.

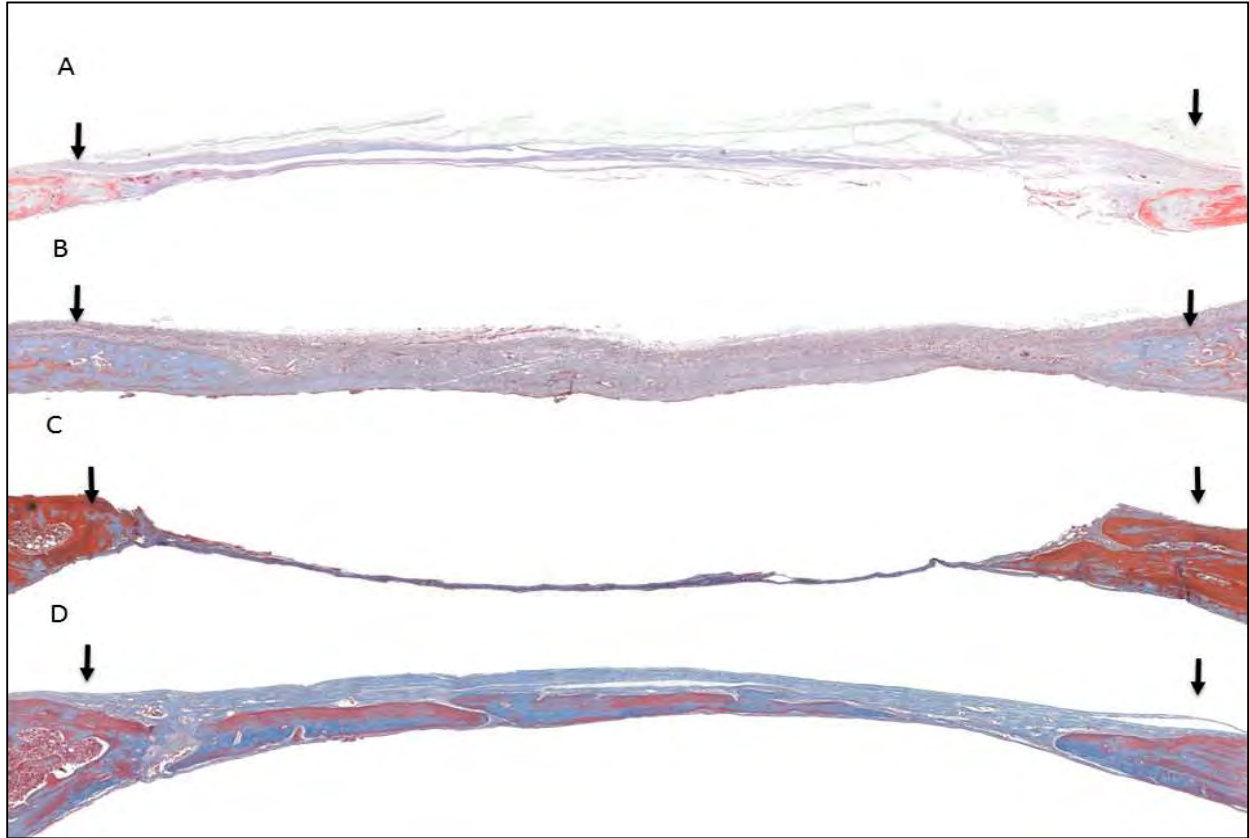
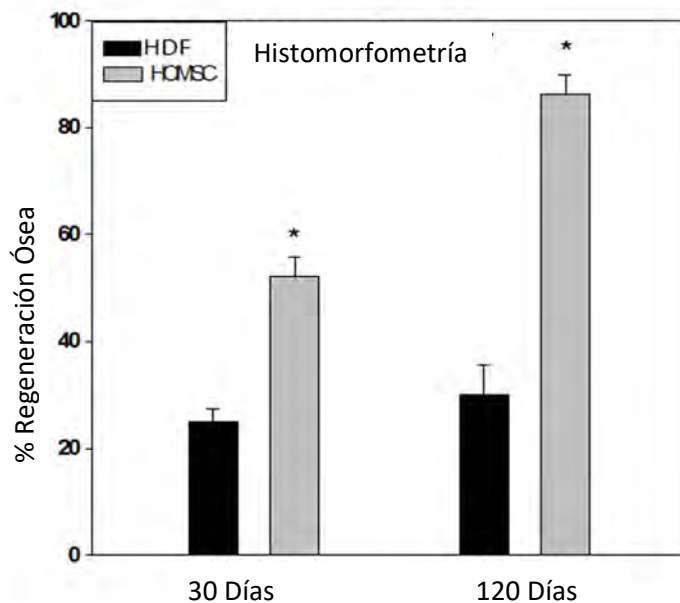


Figura 5. Reconstrucción panorámica de las calvarias de rata a 120 días. A. Grupo sin tratamiento. B. Grupo con Gelfoam. C. Grupo con Gelfoam y HDF. D. Grupo con Gelfoam y hOMSC. Las flechas indican los bordes del defecto. Teñidas con Tricrómica de Masson.



Gráfica 1. Histomorfometría. En la gráfica se observa la cantidad de hueso formado tanto por el grupo con HDF (Negro), como por el grupo con hOMSC (Gris). El asterisco representa un dato estadísticamente significativo.

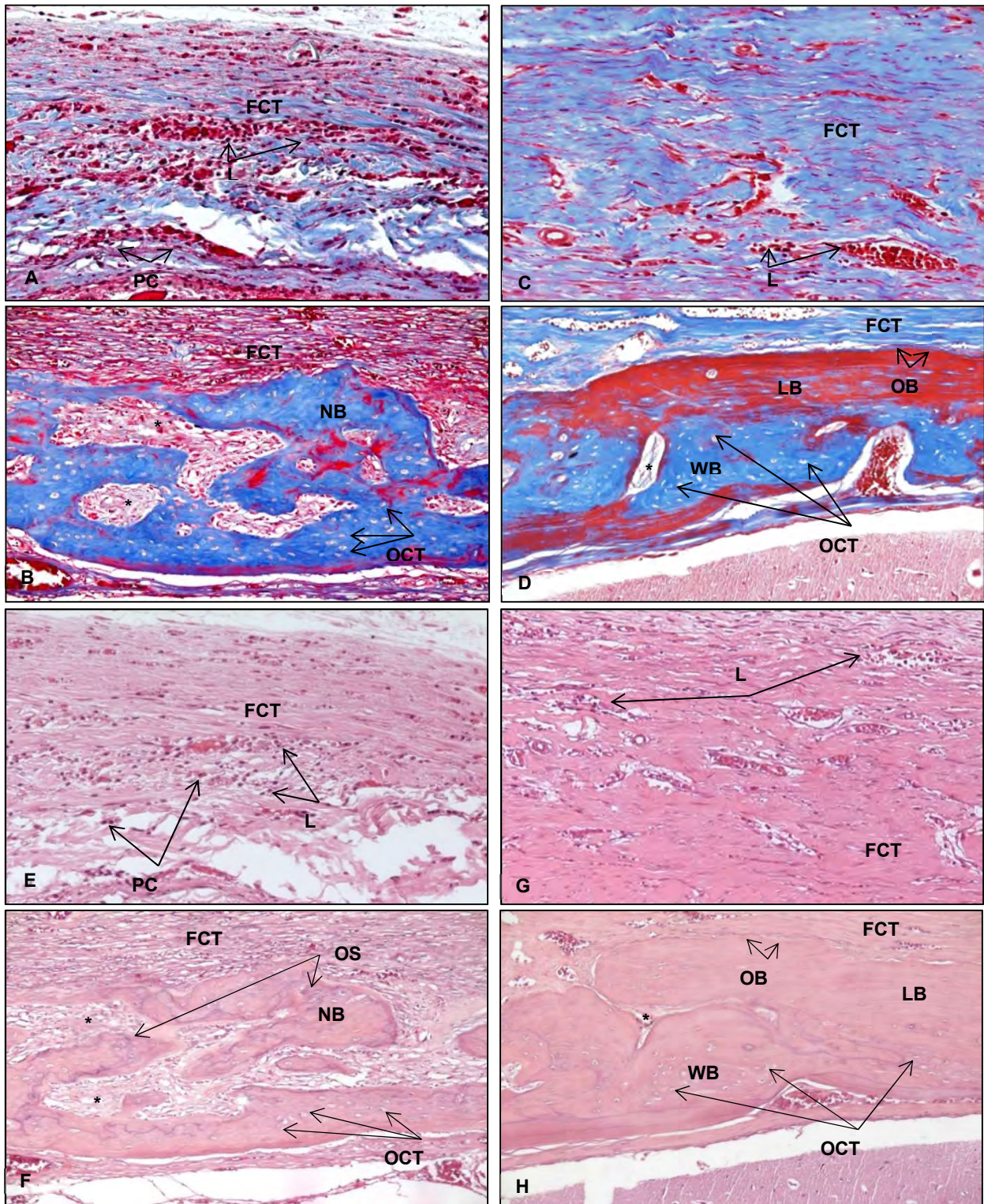


Figura 6. Hallazgos histológicos. A, E. HDF a 30 días. Infiltrado Inflamatorio crónico moderado, conformado por células plasmáticas (PC) y linfocitos (L). B, F. hOMSC a 30 días. Trabéculas de hueso recién formado (NB), osteocitos (OCT) embebidos en la matriz ósea y futuros espacios vasculares o medulares (*). C, G. HDF a 120 días. Resolución del infiltrado inflamatorio. D, H. hOMSC a 120 días. Maduración del hueso esponjoso en hueso compacto. Se observa hueso reticular (WB) con osteocitos, rodeado de hueso lamelar (LB). En la superficie se observan osteoblastos (OB) depositando osteoide. A, B, C, y D teñidos con Tricrómica de Masson; E, F, G y H con Hematoxilina y Eosina. FCT: Tejido conjuntivo fibroso.

μ CT

En las reconstrucciones de las microtomografías computarizadas, se observaba al tiempo cero, el diámetro total del defecto. A 30 días en los controles sin tratamiento, se observaba pérdida ósea, en lugar de reparación lo que indicaba que era un defecto de tamaño crítico; este defecto se mantuvo del mismo tamaño a los 120 días. En el grupo con HDF, a 30 días, se observaba formación ósea, principalmente, a partir de los bordes del defecto, sin embargo, a los 120 días, no hubo un cambio importante. En el grupo con hOMSC, a 30 días, se observaba formación ósea a partir de los bordes y en el centro del defecto, rellenándolo casi la mitad del defecto; a los 120 días, el defecto se encontraba disminuido casi en su totalidad (figura 7).

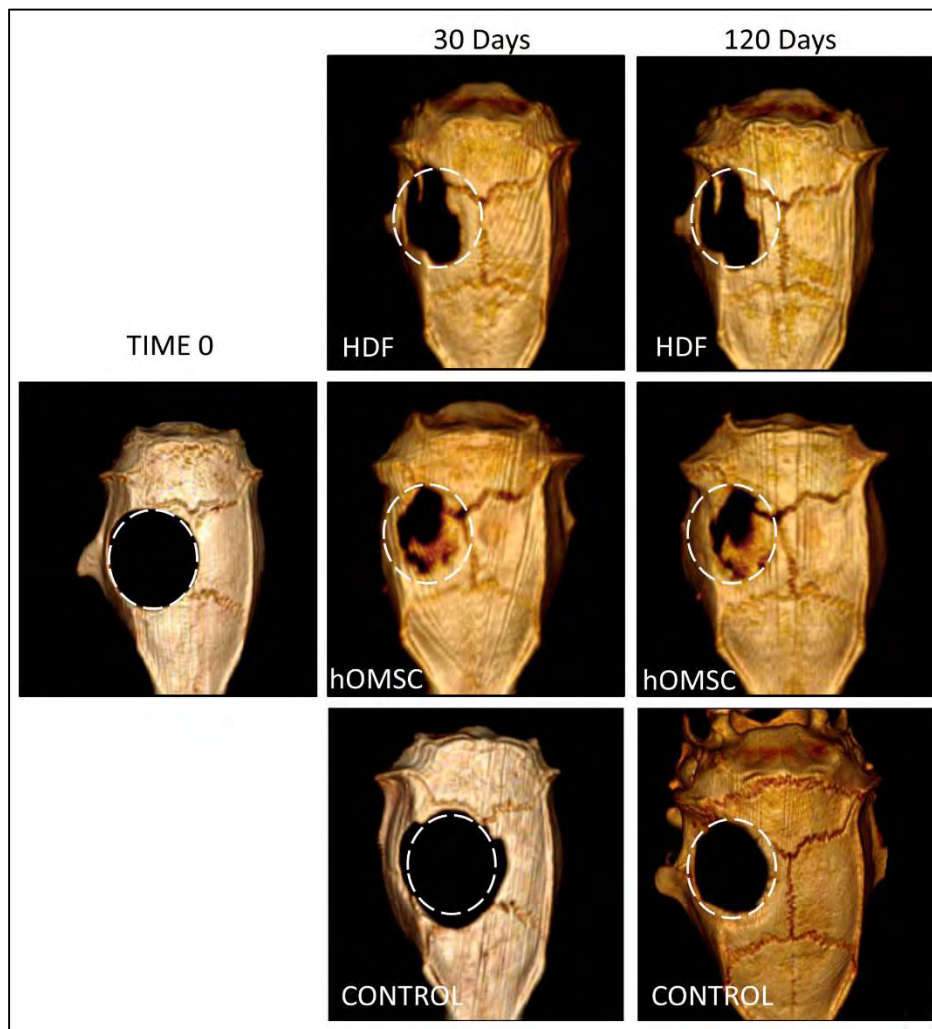


Figura 7. μ CT.

Expresión de marcadores de células troncales

La expresión se evaluó a 30 y 120 días para hOMSC a través de doble marcaje. A los 30 días, las células todavía eran positivas a CD90, pero principalmente en el frente de osificación (figura 8a, j), y a CD105 (figura 8n, o), pero sólo pocas células cercanas a vasos sanguíneos. CD73 era positivo principalmente en osteoblastos y osteocitos del hueso recién formado (figura 8q, s). La expresión de los tres marcadores se perdió a los 120 días (figura 9f, g, j, k). Los marcadores de linaje CD34 y CD45 estaban expresados principalmente en células localizadas en espacios vasculares (no mostrada). Su expresión permaneció igual a los 120 días (no mostrada). De manera relevante, el marcador de HLA-DR, a 30 días, estaba fuertemente expresado en células del frente de osificación y osteoblastos (figura 8i, k, m, o) y su expresión se mantuvo en osteoblastos incluso a los 120 días (figura 9e, g, i, k).

Para HDF se evaluó a 120 días, pero ningún marcador fue positivo en las zonas evaluadas (figura 10).

Expresión de marcadores osteogénicos

La expresión de marcadores osteogénicos se evaluó a 30 y 120 días para hOMSC. La osteocalcina estaba expresada en osteocitos y osteoblastos, principalmente, tanto a los 30 (figura 8b, c, v, w) como a los 120 días (figura 9b, c, r, s). La fosfatasa alcalina estaba expresada en osteocitos, y sitios de remodelación ósea, a 30 días (figura 8f, g, r, s), y en osteocitos y osteoblastos a los 120 (figura 9n, o).

Para HDF se evaluó a 120 días, pero ningún marcador fue positivo en las zonas evaluadas (figura 10).

Expresión del marcador HNA

Ambas líneas celulares eran positivas para el marcador HNA a los 30 días (figura 8a, c, e, g), pero éste se perdía a los 120 días en las HDF (figura 10). Se mantuvo en hOMSC durante los periodos de tiempo analizados (figura 9a, c).

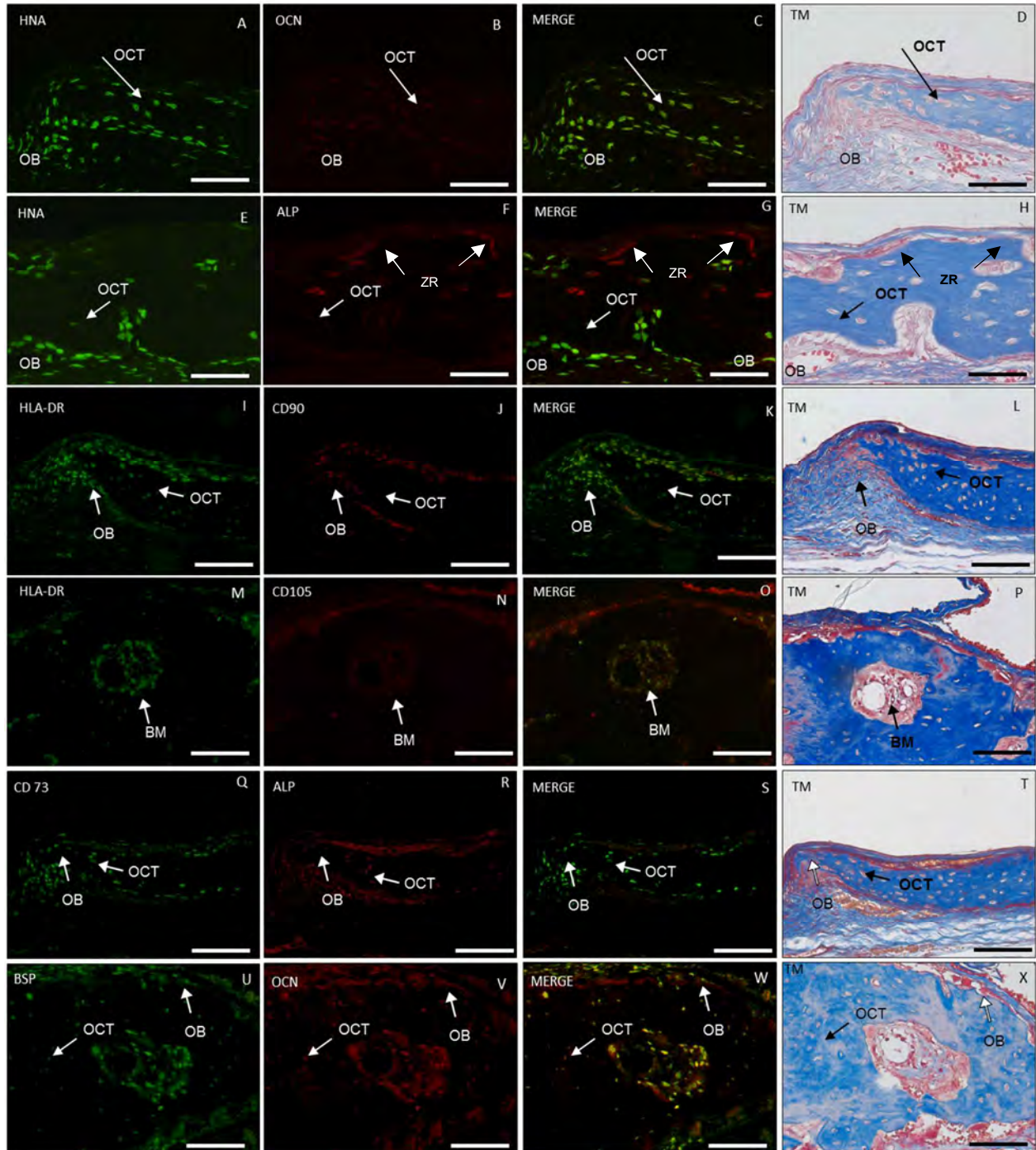


Figura 8. Inmunofluorescencia hOMSC a 30 días. OB: osteoblastos, OCT: osteocitos, ZR: zona de remodelación. (barra de escala= 50µm)

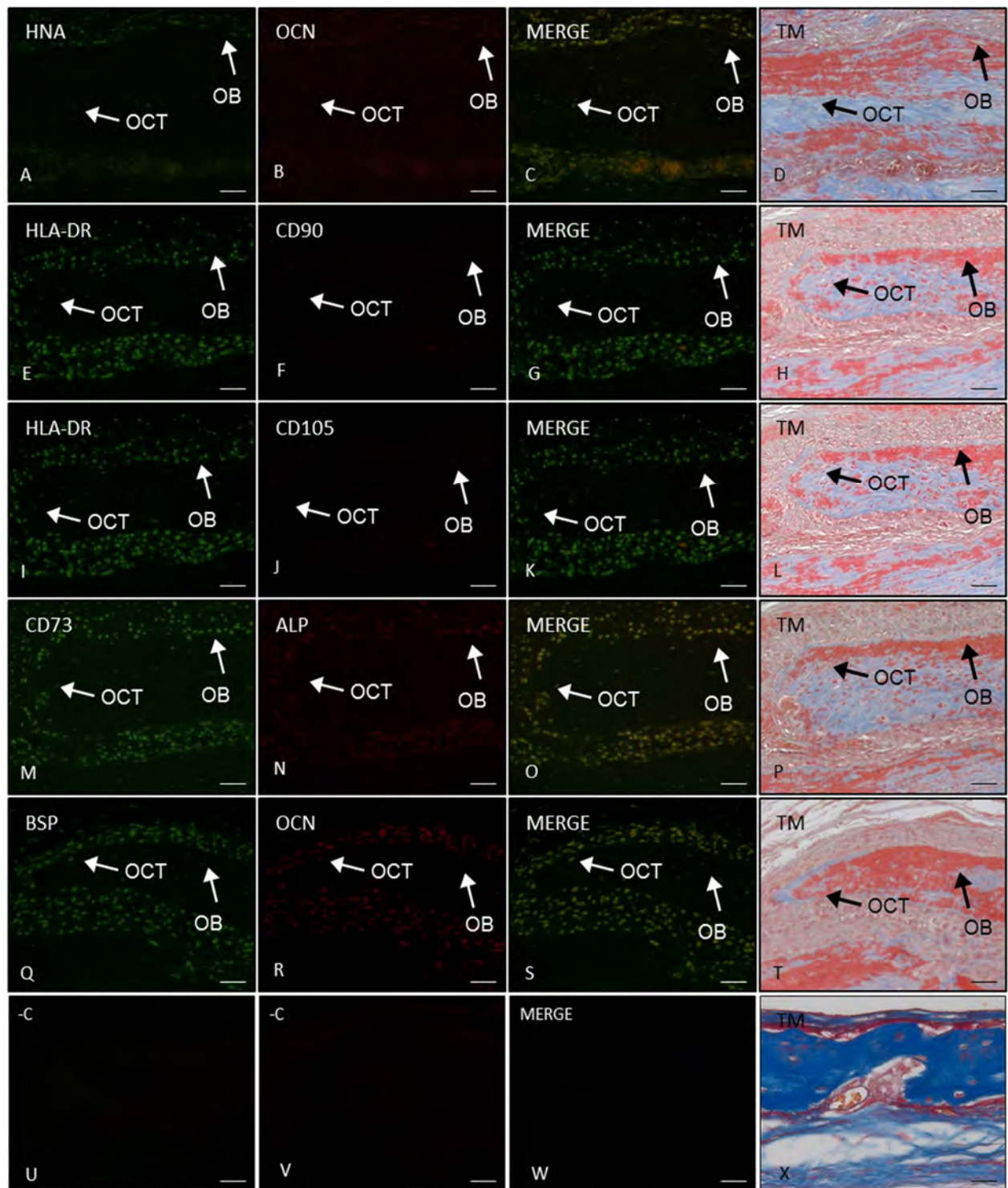


Figura 9. Inmunofluorescencia hOMSC a 120 días. OB: osteoblastos, OCT: osteocitos. U, V, W: Controles negativos. (barra de escala= 50μm)

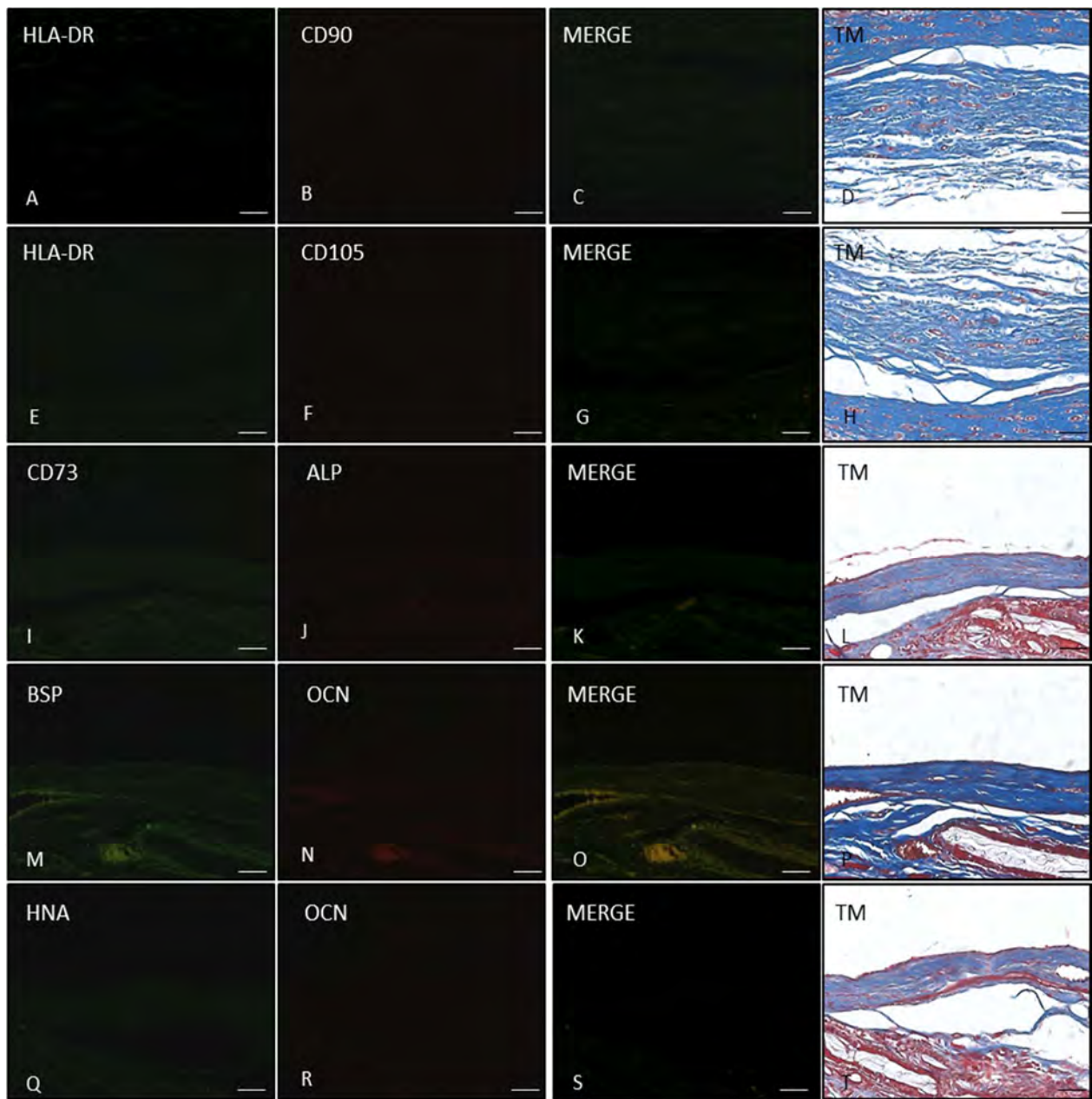


Figura 10. Inmunofluorescencia HDF a 120. Q, R, S: Controles negativos. (barra de escala= 50µm)

Discusión

En este trabajo se evaluó el potencial de las hOMSC para regenerar hueso en calvarias de rata Wistar. El defecto crítico en calvaria de rata Wistar, ofrece un modelo altamente reproducible para probar diversos materiales. Tiene ventajas sobre modelos más grandes, por ejemplo, no se requiere fijación del defecto para estabilizarlo. También es ideal para la valoración de estrategias que sirven de modelo para la osificación intramembranosa. En rata, se considera que un defecto es de tamaño crítico cuando mide 8mm, sin embargo, nosotros decidimos hacerlo de 9mm por dos razones. La primera es que, aunque el diámetro de la trefina en su parte interna es de 8mm, en su parte externa es de 9mm; y la segunda es que esto nos permite valorar mucho mejor los materiales que tienen un gran efecto en la formación de material mineralizado¹⁸.

La mucosa bucal es un sitio privilegiado en el organismo, tiene la capacidad de regenerarse sin dejar cicatriz, debido a que es un tejido en constante renovación. Esta habilidad se debe en parte a su contenido de células troncales y al parecido de su matriz extracelular al tejido conjuntivo fetal^{35,36,37}. Es un sitio de acceso sencillo y la obtención de células es poco invasiva, ya que se pueden obtener grandes cantidades de células de una biopsia pequeña (9mm²). Otra gran ventaja es que se pueden aislar a cualquier edad durante la vida del paciente, por lo que su costo es bajo comparado con células obtenidas de otros sitios (e.g pulpa dental, médula ósea)³⁵.

Fueron aisladas por primera vez en 2010³⁵ y su capacidad para generar tejidos mineralizados (hueso, cemento, dentina) ya fue demostrada¹⁷. Este estudio evaluó tanto *in vitro* como *in vivo* la capacidad que tienen de ser diferenciadas a un tejido específico: hueso, y su capacidad para regenerar un defecto específico: el defecto crítico de calvaria.

In vitro demostramos que es posible diferenciarlas a osteoblastos, confirmándolo tanto por qRT-PCR como por Western Blot. Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de BMP2 y Osx que participan en la diferenciación y maduración de osteoblastos y osteocitos, y las proteínas BSP y MGP que participan en la biomineralización. Dentro de la vía de señalización, las proteínas que participan en la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos son BMP2, Runx2 y Osx. BMP2, es un receptor en la membrana celular perteneciente a la familia de TGF- β . Al activarse

provocará la transcripción del factor de transcripción Runx2. Tanto BMP2 como Runx2 controlan la expresión de *Osx*, que es un factor de transcripción que es determinante tanto en la diferenciación de osteoblastos como en la maduración de éstos a osteocitos, de una manera más relevante que Runx2¹⁴. La necesidad de Runx2 y de *Osx* se ha analizado en diversos estudios; la ausencia de solo Runx2 provoca un periostio delgado y pérdida parcial de osteoblastos; mientras que, la ausencia de *Osx* provoca pérdida total de los osteoblastos y formación de cartílago ectópico.¹⁹ En nuestro estudio, el resultado indica que a los 10 días del cultivo con medio “mineralizante”, se lograron obtener osteoblastos, no sólo en su fenotipo, sino también funcionales.

In vivo es la mejor forma para observar la capacidad de estas células de generar tejido óseo y solamente éste, ya que esto significa que la diferenciación *in vitro* puede limitar su pluripotencia disminuyendo su riesgo de generar tumores, lo que las haría buenas candidatas para ser utilizadas en terapias de regeneración.

Uno de los objetivos específicos del proyecto era determinar el tipo de tejido óseo obtenido. A 30 días de implantación, el tejido obtenido con las hOMSC, simulaba la osificación intramembranosa, en donde los progenitores óseos se agregan en cúmulo (centros de osificación) y comienzan a secretar osteoide. Al aumentar de tamaño, se fusionan para formar trabéculas, formando hueso esponjoso y encerrando vasos sanguíneos que posteriormente forman las estructuras de Havers o espacios medulares. Este hueso esponjoso se remodela para poder depositar una matriz organizada (hueso lamelar) que indicará que el hueso esté madurando¹³. Ejemplificada en nuestro proyecto por la figura 11.

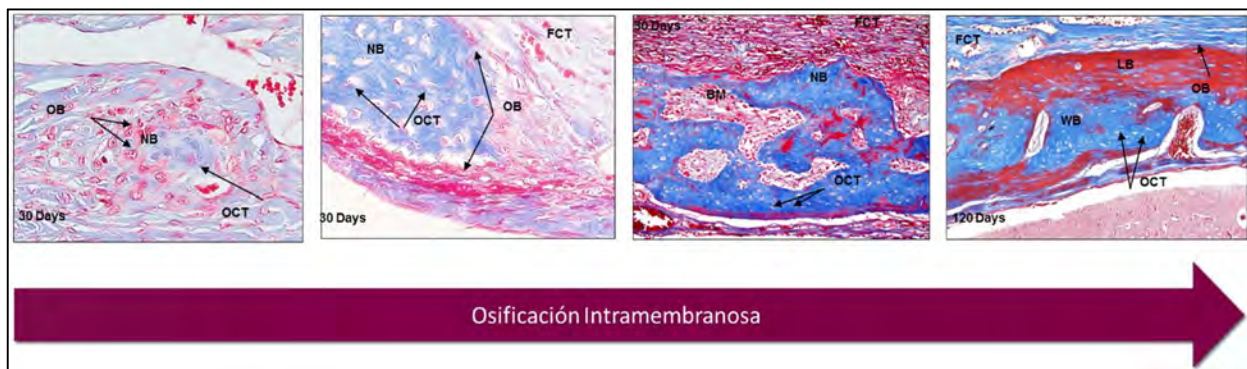


Figura 11. Osificación Intramembranosa. OB: osteoblastos, OCT: osteocitos, FCT: tejido conjuntivo fibroso, WB: Hueso reticular, LB: hueso lamelar, NB: hueso nuevo, BM: Médula ósea.

La capacidad de formar hueso para rellenar un defecto óseo fue analizada por histomorfometría a 30 y 120 días para los grupos de HDF y hOMSC. El grupo que más hueso obtuvo fue el de hOMSC que había formado hueso en un $52\% \pm 2.3\%$ a 30 días. Este hallazgo se comparó con otros estudios similares: uno que utilizó BMSC en defectos de 9mm y en el cual en 60 días habían obtenido tan solo 44% de regeneración del defecto^{20,21}; otro estudio utilizó iPSC, BMSC y UCSC, en éste se reportó que formaron 30%, 27% y 25% de regeneración a 90 días en defectos de 8mm, respectivamente. Por lo menos en nuestro estudio las hOSMC demostraron una mayor capacidad para generar tejido óseo que células aisladas de otros sitios²².

Otro aspecto importante en nuestro estudio es que el infiltrado inflamatorio en el grupo de las hOMSC era leve o se encontraba ausente; esto forma parte de una propiedad que recientemente se está estudiando específicamente de las MSC, quienes han demostrado la capacidad de inmunomodular su microambiente, para regular al sistema inmune y no ser atacadas por éste^{23,24}.

En el resultado de la inmunofluorescencia las hOMSC a los 30 días presentaban una mezcla de células que expresaban tanto marcadores de células troncales como osteoblásticos. Este resultado podría ser explicado por el proceso de osificación intramembranosa, en que las células progenitoras óseas se conglomeran y añaden a los centros de osificación donde madurarán en osteoblastos. En nuestro estudio, a los 120 días la expresión de marcadores de células troncales se perdía. Sin embargo, el marcador más controversial es la expresión por parte de osteoblastos del HLA-DR, y la ausencia de rechazó a los constructos. HLA-DR es parte del complejo principal de histocompatibilidad clase II, que es el encargado de presentar antígenos a los linfocitos y es una de las principales causas de rechazo en trasplantes de órganos. Diversos estudios han analizado la presencia de este marcador en osteoblastos y si éstos pueden o no ocasionar una respuesta inmune. En estudios realizados en 1989 y 1990, se analizó la presencia de HLA-DR y HLA-DQ en osteoblastos y su actividad; explican que los osteoblastos actúan como células presentadoras de antígenos cuando son expuestas a sangre periférica, aunque su función no es muy efectiva, y que la presencia de estos marcadores, más bien es importante para la activación de osteoclastos^{25,26,27}.

Una parte importante del uso de células en forma de injertos, es monitorear su destino dentro del organismo. Ya que las células del injerto y el huésped eran de distintas especies, se utilizó el anticuerpo HNA (el cual sólo reacciona contra humanos y primates no humanos, pero no rata). El marcador demostraba que había células positivas rodeando el hueso recién formado en el centro del defecto, lo que confirmaba el origen humano de estas células.

Conclusiones

Nuestro estudio demostró que las hOMSC representan una buena fuente celular para ser utilizadas en ingeniería de tejidos (cuyo objetivo es regenerar o reparar tejidos utilizando la fuente apropiada de células, con las condiciones de cultivo óptimas y en un andamio biodegradable que se adapte a las necesidades del tejido), sobre todo para la regeneración ósea. Se pueden obtener fácilmente de biopsias pequeñas y en cualquier momento sin importar la edad del paciente. Se pueden diferenciar *in vitro* y mantienen su fenotipo por un periodo largo de tiempo como demostraron las inmunofluorescencias a 120 días en nuestro estudio. Este estudio es sólo un ejemplo de su potencial de diferenciación, ya que también se han diferenciado a células astrocíticas, neuronas dopaminérgicas y cardiomiocitos^{28,29,30}. En estudios posteriores se podría intentar obtener otros fenotipos celulares. Su capacidad de inmunomodulación, debe ser estudiada a detalle, sin embargo, se ha demostrado que las células derivadas de encía y las derivadas de lámina propia de la mucosa median la respuesta inmune de linfocitos T. Se pueden investigar como una terapia en enfermedades autoinmunes y para disminuir la tasa de rechazo de trasplantes.

Referencias

1. Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem Cell Plasticity. *Blood Reviews* (2005) 19, 29–38
2. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the Origin of the Term “Stem Cell”. *Cell Stem Cell* (2007) 1, 35-38
3. Weissman I. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell* (2000) 100, 157–168
4. Roobrouck V, Ulloa-Montoya F, Verfaillie C. Self-Renewal and Differentiation Capacity of Young and Aged Stem Cells. *Experimental Cell Research* (2008) 314, 1937 – 1944
5. Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Buccal Mucosa. *J Biosci Bioeng* (2010) 110:3, 345–350
6. Glim J, Everts V, Niessen F, et al. Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of fetal skin. *Archives of oral biology*, 2014, 59:1048-1055
7. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wound. *J Dent Res*, 2003, 82(8):621-626
8. Filipczyk A, Marr C, Hastreiter S, et al. Network plasticity of pluripotency transcription factors in embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 2015, 17:1235-1246
9. Radziskeuskaya A, Le Bin Chia G, Dos Santos RL, et al. A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nature Cell Biology*, 2013, 15:579-590
10. Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I. *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. PUIS UNAM, México, 2011
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8(4):315-317
12. Boxal S, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotent stromal cells. *Stem Cells International*, 2012, 2012: pp12

-
13. Kierszenbaum A. *Histología y Biología Celular: Introducción a la anatomía patológica*. 2ª Ed., Elsevier, 2008. Pp124-164
 14. Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of Osterix in skeletal formation. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(5):975-984.
 15. Langenbach, Handschel: Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*
 16. Zuk P. Tissue Engineering Craniofacial Defects with Adult Stem Cells? Are We Ready Yet? *Pediatr Res* (2008) 63: 478–486
 17. Treves-Manusevitz S, Hoz L, Rachima H, et al. Stem Cells Of The Lamina Propria Of Human Buccal Mucosa And Gingiva Develop Into Mineralized Tissues In Vivo. *J Clin Periodontol* (2013) 40, 73–81
 18. Spicer P, Kretlow J, Young S, et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature Protocols* (2012), 7(10):1918-1929
 19. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2012), 13:27-38
 20. Tabatabaei FS, Motamedian SR, Gholipour F, Khosraviani K, Khojasteh A. Cranomaxillofacial Bone Engineering by Scaffolds Loaded with Stem Cells: A Systematic Review. *J Dent Sch* 2012;30(2):115-131
 21. Kawai T, Anada T, Masuda T, Honda Y, Sakai Y, Kato Y, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. The Effect of Synthetic Octacalcium Phosphate in a Collagen Scaffold on the Osteogenicity Of Mesenchymal Stem Cells. *European Cells and Materials*. 2011;(22)124-136
 22. Wang et al. Bone Tissue Engineering Via Human Induced Pluripotent, Umbilical Cord and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rat Cranium. *Acta Biomaterialia* 2015;(18)236–248
 23. Yi t, Song S. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Arch Pharm Res* Vol 35, No 2, 213-221, 2012
 24. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Osteogenesis: The Development of Bones. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10056/>

-
25. Skjodt H, Moller T, Freiesleben SF. Human osteoblast-like cells expressing MHC class II determinants stimulate allogenic and autologous peripheral blood mononuclear cells and function as antigen- presenting cells. *Immunology*. 1989;(68)416-420
 26. Skjodt H, Hughes D, Dobson PRM, Graham R, Russell G. Constitutive and Inducible Expression of HLA Class II Determinants by Human Osteoblast-like Cells *in vitro*. *J Clin Invest*. 1990 May;(85)1421-1426.
 27. Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C. Expression of Molecules Involved in Antigen Presentation and T Cell Activation (HLA-DR, CD80, CD86, CD44 and CD54) by Cultured Human Osteoblasts. *J Periodontol*. 2000; (71)614-617
 28. Ganz J, Arie I, Buch S, Zur TB, Barhum Y, et al. (2014) Dopaminergic-Like Neurons Derived from Oral Mucosa Stem Cells by Developmental Cues Improve Symptoms in the Hemi-Parkinsonian Rat Model. *PLoS ONE* 9(6): e100445.
 29. Ganz, J., Arie, I., Ben-Zur, T., Dadon-Nachum, M., Pour, S., Araidy, S., Pitaru, S. and Offen, D. (2014), Astrocyte-Like Cells Derived from Human Oral Mucosa Stem Cells Provide Neuroprotection In Vitro and In Vivo. *STEM CELLS Translational Medicine*, 3: 375–386.
 30. Gafni, Y., Rachima, H., Marynks-Kalmani, K., Blatt, A., Vered, Z., & Pitaru, S. (2011). A new in vivo/in vitro model for assessing the capacity of human derived oral mucosa stem cells to colonize the infarcted myocardium. *Stem Cell Studies*, 1(1), e6.
 31. Mokry J, Pital R. Chapter 17 - The Basic Principles of Stem Cells, In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, edited by Ajaykumar Vishwakarma, Paul Sharpe, Songtao Shi and Murugan Ramalingam, Academic Press, Boston, 2015, 237-248
 32. Bianco P, Gehron-Robey P, Smith P. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* 2, April 2008
 33. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell*, June 29, 2001, 105:829-841

-
34. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M. Stem Cells in Dentistry – Part I: Stem Cell Sources. *J Prosthodontic Research*, 2012, 56:151–165
 35. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, et al. The Lamina Propria Of Adult Human Buccal Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population. *Stem Cells*, 2010, 28:984–995
 36. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase *Nucleic Acids Res.* 45: D158-D169 (2017)

Abreviaciones

Oct 4: Octamer- binding transcription factor 4

Sox2: SRY-related HMG-box 2

HDF: Human dermal fibroblasts

hOMSC: human oral mucosa stem cells

ESC: embryonic stem cells

MSC: mesenchymal stem cells

HSC: hematopoietic stem cells

Stro-1: stromal cell surface marker 1

HLA-ABC: Human leucocyte antigen A, B, C

HLA-DR: Human leucocyte antigen DR

Dent: Dentina

Mes: Mesodermo

Ect: Ectodermo

End: Endodermo

Od: Odontoblasto

Os: Oseo

Ad: Adiposo

Cho: Cartílago

Myo: Musculo

Neu: Neural

Endo: Endodermo

Cem: Cemento

Hep: Hepático

POU: P- pituitary-specific, O- octamer binding, U- neural Unc-86 transcription factor

CD: cluster of differentiation

TGF- β : Tumor growth factor β

μ CT: Microtomografía computarizada

IFN- γ : Interferón γ

NK: Natural Killer

HNA: Human nuclear antigen
DAB: Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina
BMP2: Bone morphogenetic protein 2
TBST: Tris-buffered saline con Tween 20 al 0.1%
PVDF: polímero de polivinildenedifloride
GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
MGP: Matrix gla protein
qRT-PCR: (por sus siglas en ingles): quantitative retro transcription polymerase chain reaction)
DNA: ácido desoxiribonucleico
RNA: ácido ribonucleico
ATCC: American type culture collection
SFB: suero fetal bovino
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
MAPK: Mitogen-activated protein kinases
Osx: osterix
Runx2: Runt related factor 2
CAP: cement attachment protein
CEMP1: cement protein 1
BSP: bone sialoprotein
ALP: alkaline phosphatase protein
OCN: osteocalcin
AMEL: amelogenin
AMBN: ameloblastin
SSEA-1: stage-specific embryonic antigen 1
SSEA-2: stage-specific embryonic antigen 2
SSEA-3: stage-specific embryonic antigen 3
SSEA-4: stage-specific embryonic antigen 4
Tra2-49: transformer 2-49 protein
Tra2-54: transformer 2-54 protein