



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
SUPERIORES UNIDAD LEÓN

TÍTULO:

*“Aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación  
de células madre mesenquimales de la pulpa dental  
humana de terceros molares”*

FORMA DE TITULACIÓN:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A

María de Jesús Guerrero Gutiérrez

TUTOR:

Dr. René García Contreras





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.

## ÍNDICE

1 RECONOCIMIENTO.....	3
2 DEDICATORIA .....	4
3 AGRADECIMIENTOS .....	5
4 LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
5 RESUMEN .....	9
6 PALABRAS CLAVE.....	9
7 INTRODUCCIÓN .....	10
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>12</b>
8 MARCO TEÓRICO .....	13
9 ANTECEDENTES .....	31
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>36</b>
10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	37
11 JUSTIFICACIÓN .....	38
12 OBJETIVO GENERAL .....	39
13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
11 HIPÓTESIS .....	40
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>41</b>
14 MARCO METODOLÓGICO.....	42
<b>14.1 Variables de estudio .....</b>	<b>43</b>
<b>14.2 Diseño experimental .....</b>	<b>45</b>
15 MATERIALES Y MÉTODO .....	47
16 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA .....	48
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>56</b>
17 RESULTADOS.....	57
18 DISCUSIÓN.....	64
19 CONCLUSIONES.....	68
20 BIBLIOGRAFÍAS.....	69
21 ANEXO.....	79

## **1 RECONOCIMIENTO**

La realización de la tesis es posible en primer lugar a la Escuela de Estudios Superiores Unidad León de la UNAM por el apoyo brindado por los profesores, alumnos y personal de salud que labora en la institución, por el apoyo para el uso de las instalaciones de la clínica del área de profundización de cirugía y el Laboratorio de Investigación Interdisciplinario (LII) área de Nanoestructuras y Biomateriales fundamentales para este trabajo. Reconocer la colaboración de Dr. René García Contreras, Dra. Laura Susana Acosta Torres, Dra. Ma Concepción Arenas Arrocena, Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita, LO. Ángel Paulino González, C. Nathalia Calleja López y el financiamiento recibido para la elaboración del Manual a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) por parte de los proyectos PAPIME PE201617, PE208518 y PAPIIT IA204516, IA205518 y el apoyo de la red de Farmoquímicos-CONACyT para que se llevara a cabo.

## 2 DEDICATORIA

Dedico este manuscrito a todas las mujeres y todos los hombres que aman, lloran, ríen, luchan, disfrutan, aprenden y enseñan el verdadero significado de la vida. A todas las personas que han partido dejando un gran vacío y aquellas que aún estamos por conocer.

Te lo dedico a ti.

### 3 AGRADECIMIENTOS

#### **A Dios**

*Agradezco por todo lo que soy y lo que tengo, por acompañarme en todo momento y ser pilar fundamental en mi vida.*

#### **A mis padres**

*Mis más grandes amores, agradezco su esfuerzo, su apoyo, su amor y sus consejos, sin ustedes no sería la persona que soy hoy en día, son la fuente de motivación en todo lo que hago, agradezco tenerlos con cada latido de mi corazón.*

#### **A mis hermanos**

*Mis compañeros de vida, gracias por compartir sus vidas conmigo y ser la alegría de mi vida los amo.*

#### **A mis tíos y primos**

*Agradezco su amor y compañía, sobre todo agradezco el apoyo incondicional durante los cuatro años de la licenciatura, en especial a mi tío Javier que, aunque tu partida fue temprana nunca dejaste de creer en mí, marcaste nuestras vidas, a mi tía Adriana por ser mi ejemplo que seguir.*

#### **A mi universidad**

*Siempre soñé en ser parte de algo grande pero nunca imaginé ser parte de algo maravilloso, gracias a mi universidad por darme las herramientas y forjar el camino para el futuro, gracias por formarme no solo como profesional sino como persona.*

#### **A mis profesores**

*Agradezco a todos mis profesores que han dedicado su vida a transmitir conocimiento y pasión por todo lo que hacen.*

*Gracias doctora Marcela que con unas simples palabras y un abrazo me motivo a continuar.*

*Gracias doctor Abraham por mostrarme que si hago lo que amo nunca voy a tener que trabajar.*

*Gracias doctor Castillo, aunque fue corto el tiempo, me enseñó a dar lo mejor de mí.*

*Gracias doctora Ana Lilia por ser una profesora con gran vocación.*

*Gracias doctor Danovan por su particular personalidad, por su ayuda y por ser más que un profesor por ser un amigo.*

*Gracias doctora Trilce por mostrarnos su gran talento y amor por la odontología, se convirtió en mi ejemplo a seguir.*

*Gracias doctor Mares por ser un gran profesor y transmitirme sus conocimientos.*

*Gracias doctora María Antonieta por ser una maravillosa profesora y amiga.*

*Gracias doctor Nahoshi por enseñarme la belleza de lo roto con prótesis maxilo facial.*

*Gracias doctor Dugarte por todos sus conocimientos y enseñarme a ver siempre primero por el bien de los demás.*

*Agradezco infinitamente a cada uno de mis profesores que son parte fundamental de mi formación: Dra. Laura, Dra. Fátima, Dra. Regina, Dra. Paola, Dr. Tenorio, Dra. María, Dra. Andreína, Dr. Ayala, Dra. Ángeles, Dra. Gaby, Dr. Octavio, Dr. Federico, Dr. Sergio, Dr. Adrián, Dr. René, Dra. Mireya, Dra. Dennise, Dra Noemi, Dra. Concepción ¡Gracias!*

*Gracias doctor René García Contreras por ser mi maestro Jedi durante todo el camino, por brindarme siempre palabras reconfortantes y ser parte fundamental de mi formación como profesional, le agradezco infinitamente por creer, confiar y nunca dejar de apoyarme, por toda la paciencia, por todas las risas en el laboratorio y mostrarnos amablemente nuestros errores y proporcionándonos las herramientas para mejorar, de usted me llevó grandes enseñanzas no solo como profesional sino como persona. No tengo palabras para agradecer lo excelente maestro que es.*

### **A mis pacientes**

*Les agradezco a cada uno de ustedes por permitirme formarme no solo como profesional sino como persona, por depositar su confianza en mí y mis profesores, estoy muy agradecida con ustedes por compartirme sus historias de vida y ser parte de ella, de todo corazón les agradezco su tiempo, gracias porque me permitieron poner en práctica todo lo aprendido y así poder mejorar.*

### **A mis amigos**

*Si bien la familia no la elegimos, tenemos la gran oportunidad de elegir a nuestros amigos.*

*Gracias Nath por ser mi mejor amiga desde el segundo uno, sin ti todo esto no tendría sentido, gracias por tu apoyo incondicional, por tu sonrisa que ilumina todo lugar en el que estas, gracias por tu increíble capacidad de transmitir tu valor.*

*Gracias Charly por ser mi alma gemela en amigo, por compartir el camino conmigo y darme las dos manos siempre que necesitaba una.*

*Gracias Dani por ser mi compañera de aventuras, por compartir tu familia conmigo, enseñarme que no se necesitan alas para volar y estar para mí en uno de los momentos más difíciles de mi vida.*

*Gracias Francia, me enseñaste a amarme a mí misma y no tomar nada personal, gracias por compartir tu vida conmigo.*

*Gracias Leslie porque nunca es tarde para encontrar a una persona maravillosa como tú.*

*Gracias a todos mis compañeros y amigos por permitirme conocerlos y compartir mi vida con ellos, gracias por formar parte del camino.*

## 4 LISTA DE ABREVIATURAS

— *a* —

**α-MEM:** *Alpha Modification Minimum Essential medium*

— *b* —

**BMPs-4:** *Proteína morfogenética ósea tipo 4*

**BMSC:** *(Bone Marrow Stem Cells) Células madre mesenquimales de la médula ósea*

— *c* —

**CMM:** *Células madres mesenquimales adultas*

**CM:** *Célula madre*

**CFU-F:** *unidades formadoras de colonias fibroblásticas*

— *d* —

**DAPI:** *Marcador fluorescente (4',6-diamino-2-fenilindol)*

**D-MEM:** *Dulbecco's modified Eagle's medium*

**DMSO:** *Dimetil sulfóxido*

**DSCs:** *Células madre dentales*

— *e* —

**EDTA:** *Ácido etilendiaminotetraacético*

**ESC:** *(Embryonary Stem Cells) Células madre embrionarias*

— *g* —

**g:** *Gramo*

— *h* —

**hDPSC:** *(Human Dental Pulp Stem Cells) Células madre de la pulpa dental humana*



**hESC:** (*Human Embryonary Stem Cells*) *Células madre embrionarias humanas*

**HGF:** *Factor de crecimiento de hepatocitos*

— *i* —

**IDO:** *indolamina 2,3-dioxigenasa IFN- $\gamma$ : Interferón gamma*

**iPS:** *Células madre pluripotentes inducidas*

— *m* —

**MHC:** *Complejo mayor de histocompatibilidad*

**$\mu$ g:** *Microgramo*

**ml:** *Mililitro*

**$\mu$ l:** *Microlitro*

**$\mu$ m:** *Microméetro*

— *n* —

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** *Dihidrógeno fosfato monosódico*

— *p* —

**PDL:** (*population doubling level*) *Nivel doble de población*

**pH:** *Potencial de hidrógeno PBS: Solución buffer de fosfatos*

— *s* —

**SCAP:** *Células madre de la papila apical SFB: Suero fetal bovino*

— *t* —

**TGF- $\beta$ :** *Factores de crecimiento transformantes-beta*

— *u* —

**UCSC:** (*Umbilical Cord Stem Cells*) *Células madre del cordón umbilical*

## 5 RESUMEN

**Introducción:** Las células madre mesenquimales adultas (CMM) existen en todo el cuerpo en diferentes tejidos como médula ósea, cerebro, vasos sanguíneos, hígado, piel, retina, páncreas, sangre periférica, músculos, tejido adiposo y tejidos dentales. El aislamiento de este tipo de células dependiendo de la fuente es de difícil acceso, dada la localización anatómica de los dientes, obtener células madre de la pulpa dental humana (hDPSC), resulta relativamente accesible, sencillo y menos invasivo.

Las CMM son células multilíneas cuya capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en una variedad de tipos de células como osteocitos, condrocitos y adipocitos entre otros, le confiere excelentes características, que juegan un papel clave en la ingeniería tisular y medicina regenerativa.

**Objetivo:** Aislar, cultivar, caracterizar células madre mesenquimales de la pulpa dental humana (hDPSC) de terceros molares y estandarizar los diferentes protocolos para la realización de un manual de prácticas de laboratorio.

**Metodología:** Se aislaron hDPSC de terceros molares, la población se cultivó *in vitro* y se sometieron a varios protocolos de diferenciación, utilizando medios de cultivo específicos para células inmaduras enriquecidos con suero fetal bovino, glutamina y antibióticos, las cuales fueron analizadas por medio de Citometría de flujo e Inmunofluorescencia.

**Resultados:** Se dieron lecturas positivas a los marcadores de células madre mesenquimales obteniendo células con características cartilaginosas, adiposas y óseas, siendo almacenadas por medio de un protocolo de criopreservación.

**Conclusión:** Las hDPSC de terceros molares pueden ser capaces de generar linajes celulares diferentes al tejido del cual se aislaron, al ser criopreservadas, poseen una mayor tasa de proliferación y supervivencia tras su descongelamiento, siendo óptimas para la utilización en ingeniería tisular y medicina regenerativa.

## 6 PALABRAS CLAVE

Células madre mesenquimales, pulpa dental humana, tercer molar, cultivo celular, diferenciación celular.

## 7 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades degenerativas son la principal causa de muerte en todo el mundo y, debido a la falta de fármacos innovadores y varios límites para el trasplante de órganos, las nuevas soluciones rentables para tratar los órganos dañados son necesidades primordiales.<sup>(1)</sup> A este respecto, la potencialidad de las células madre para reparar los tejidos dañados por los trastornos degenerativos ha creado un interés universal. Teniendo como principal limitante el avance tecnológico que no ha generado aún la revolución clínica tan anunciada y esperada.<sup>(2)</sup>

Las células madre (CM) fueron descritas por primera vez en la médula ósea posnatal, las cuales pueden ser embrionarias o adultas, constituyen una población rara de células de origen no hematopoyético que se identificaron por su adherencia al plato de cultivo y su morfología fibroblástica.<sup>(3)</sup> Las células madre mesenquimales adultas (CMM) existen en todo el cuerpo en diferentes tejidos como médula ósea, cerebro, vasos sanguíneos, hígado, piel, retina, páncreas, sangre periférica, músculos, tejido adiposo y tejidos dentales.<sup>(4)</sup>

Las CMM tienen la capacidad de autorrenovación y multilinaje, así como potencial de diferenciación, y se consideran una población celular prometedora para la terapia basada en células y regeneración de tejidos.<sup>(5)</sup>

El aislamiento de este tipo de células dependiendo de la fuente es de difícil acceso, dada la localización anatómica de los dientes, obtener células madre de la pulpa dental humana (hDPSC), son más atractivas como fuentes de células para la medicina regenerativa que otras poblaciones similares a CMM debido a su fácil acceso y mínima invasión.<sup>(6)</sup>

La pulpa dental es un tejido conectivo no mineralizado que se compone de células madre y células fibroblásticas, vasos sanguíneos capilares, nervios periféricos, elementos linfáticos, matrices extracelulares y odontoblastos en la periferia del tejido pulpar, que se origina del ectomesénquima derivado de la cresta neural craneal.<sup>(7)</sup>

Debido a sus características como la alta capacidad de crecimiento, multipotencia, expresión de marcadores relacionados con CMM, se sugiere que son una fuente celular importante para la regeneración de tejidos.<sup>(8)</sup>

El Comité Internacional de Células Madre Mesenquimales y Tisulares (*Society for Cellular Therapy*) propone criterios mínimos para definir las CMM humana.

1. Adherente al plástico de cultivo.<sup>(9)</sup>
2. Expresar marcadores de células madre .<sup>(10,11,12)</sup>
3. Capacidad para la diferenciación mesenquimatoso trilineaje: osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*.<sup>(13)</sup>

Este conjunto mínimo de criterios estándar fomenta una caracterización más uniforme de CMM y facilita el intercambio de datos entre investigadores.<sup>(11)</sup> Las CMM al ser criopreservadas, poseen una mayor tasa de proliferación y supervivencia tras su descongelamiento.<sup>(14)</sup>

La factibilidad de esta propuesta se fundamenta en estudios previos y consideramos que los resultados que se obtengan de este proyecto pueden proponer la estandarización de diferentes protocolos siendo una herramienta complementaria para el desarrollo y entrenamiento de la correlación entre las ciencias básica y clínicas del ámbito odontológico. Si bien esta propuesta es viable; el objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un manual de laboratorio que cuente con un método estandarizado y eficaz para aislar, cultivar, caracterizar y criopreservar hDPSCs de terceros molares, para sentar precedentes en la ENES Unidad León de la UNAM en investigaciones futuras.

# CAPÍTULO 1

## 8 MARCO TEÓRICO

### Generalidades

En los últimos años el objetivo de la medicina regenerativa y la ingeniería tisular es reemplazar o regenerar células, tejidos u órganos humanos para restaurar o establecer una función normal. Los elementos para la ingeniería tisular son: 1) Células madre, 2) Andamios y 3) Factores de crecimiento. Las terapias basadas en células madre son componentes integrales de la medicina regenerativa que explotan la capacidad inherente de las células madre para diferenciarse en linajes celulares específicos. Actualmente la ciencia básica de células madre pone en práctica terapias traslacionales bien establecidas para el uso en terapias de piel artificial, llevándolas a cabo con éxito. Investigaciones apuntan a terapias basadas con células madre para otras enfermedades, incluida diabetes, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas.<sup>(1,15,16,17)</sup>

En ocasiones el término de medicina regenerativa se utiliza como sinónimo de ingeniería tisular, aunque la medicina regenerativa a menudo implica el uso de células madre como fuente celular. La ingeniería tisular utiliza células vivas, por lo que el suministro de células debe ser suficiente, lo que lo convierte en un factor crítico e importante. Las células se obtienen propiamente del tejido donante, lo que limita el suministro, o de células madre (CM).<sup>(2)</sup>

Las CM poseen dos propiedades fundamentales: 1) autorrenovación o capacidad de división celular manteniendo su estado indiferenciado y 2) plasticidad o capacidad para diferenciarse en células de múltiples linajes adquiriendo características de una célula especializada no sólo morfológicamente sino también en lo funcional, haciéndolas atractivas para derivar grandes cantidades de células.<sup>(18,19,20)</sup> **Tabla 1**

En virtud de su capacidad única de autorrenovarse y diferenciarse en células de órganos especializados, proporcionan a los tejidos la capacidad de regenerarse y sobrevivir a la mayoría de las lesiones.<sup>(15,21)</sup> Las CM pueden ser embrionarias o adultas (postnatales); descritas por primera vez en la médula ósea posnatal<sup>(3)</sup>, constituyen una población rara de células de origen no hematopoyético que se identificaron por su adherencia al plato de cultivo y su morfología fibroblástica. Hoy en día continúan las preocupaciones éticas sobre el uso de las células madre embrionarias humanas (hESC) que es un impedimento significativo para la utilización industrial, pero los avances recientes en el uso de células madre mesenquimales adultas (CMM), células madre pluripotentes inducidas (células iPS) y células madre de fuentes placentarias y umbilicales han permitido que estos otros tipos de células madre reemplacen a las células madre embrionarias como fuentes viables; estos cuatro tipos de células se definen según su potencial de diferenciación.<sup>(1,22,23)</sup> **Tabla 2**

**Tabla 1.** Propiedades fundamentales de las células madre.

Propiedades fundamentales de las células madre	
<b>Indiferenciación</b>	No se han convertido en un tipo de célula especializada
<b>Autorrenovación a largo plazo</b>	Capacidad de atravesar numerosos ciclos de división celular mientras permanece el estado indiferenciado
<b>Plasticidad</b>	Capacidad de diferenciarse en tipos de células especializadas (odontoblastos, adipocitos, condrocitos, osteocitos)

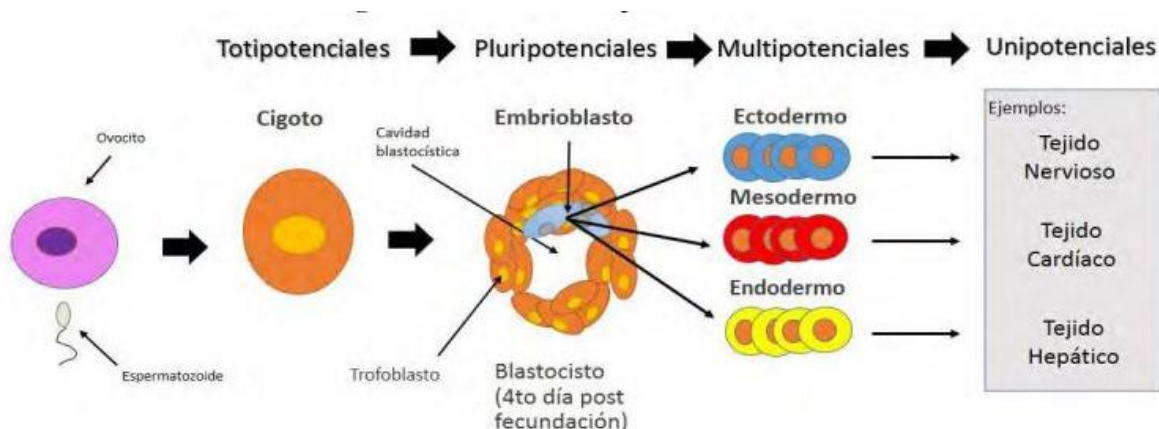
*Fuente:* Christine M. Sedgley, Tatiana M. Botero. (2012). *Dental Stem Cells and Their Sources*.<sup>(18)</sup>

**Tabla 2.** Potencial de diferenciación de las células madre.

Potencial de diferenciación de las células madre		
<b>hESC de la masa celular interna del embrión de 3-5 días (Blastocisto)</b>	Totipotentes	Puede dar lugar a todos los tipos de células del cuerpo, incluyendo aquellas células que hacen el tejidos extraembrionarios (p. ej., placenta) Capacidad ilimitada para dividirse.
<b>ESC iPS</b>	Pluripotentes	Puede formar derivados de todo el germen embrionario (ectodermo, mesodermo y endodermo) de una sola célula. Puede dar lugar a todos los diversos tipos de células del cuerpo.
<b>CMM</b>	Multipotentes	Puede dar lugar a más de un tipo celular del cuerpo.
<b>iPS</b>	Pluripotentes	Derivado de células somáticas.

*Fuente:* Christine M. Sedgley, Tatiana M. Botero. (2012). *Dental Stem Cells and Their Sources*.<sup>(18)</sup>

Debido a las capacidades ilimitadas de las células cigóticas totipotentes dan lugar a las primeras etapas de la ontogénesis, con el transcurso del tiempo son reemplazadas por células embrionarias pluripotentes que se diferencian en células que dan lugar a las tres capas germinales, sin la capacidad de diferenciarse en células placentarias.<sup>(24)</sup> Posteriormente, las células pluripotentes que se asemejan a las células madre embrionarias pueden obtenerse por diferenciación de fibroblastos o células epiteliales *in vitro* SC iPS.<sup>(25)</sup> **Figura 1**



**Figura 1** Esquema grado de potencialidad celular. *Fuente:* Herman Rozengway Viji.<sup>(26)</sup>

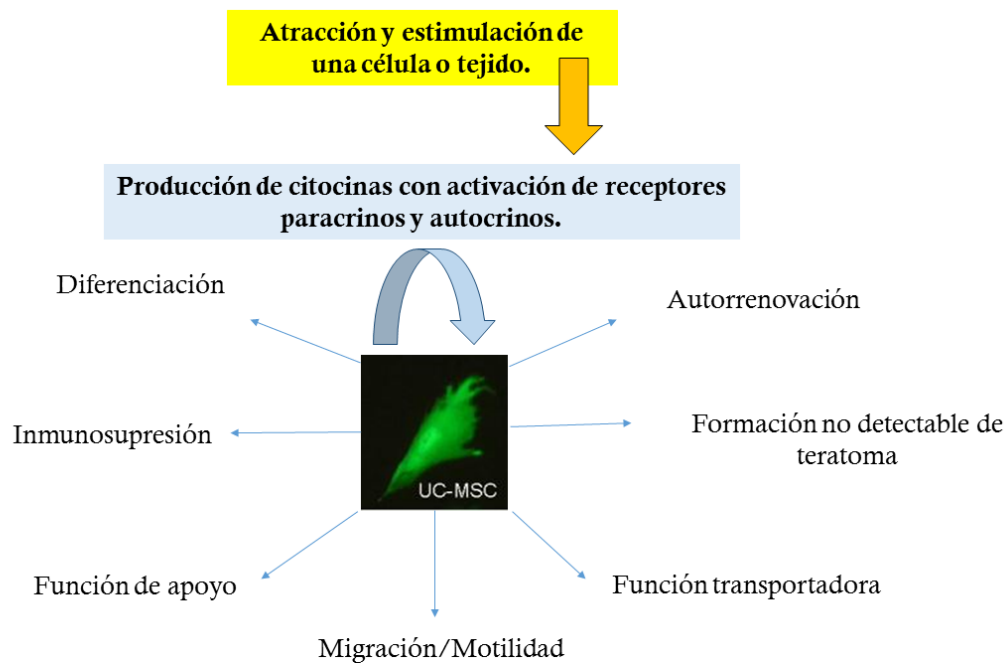
### ***Células madre mesenquimales (CMM)***

El dogma que supone que las CMM provienen únicamente de la médula ósea (BMSC) se descartó cuando se encontraron CMM en casi todos los tejidos del cuerpo humano<sup>(4)</sup> que se localizan principalmente en nichos perivasculares; incluida la médula ósea, cerebro, vasos sanguíneos, hígado, piel, retina, páncreas, sangre periférica, músculo, tejido adiposo y tejidos dentales, donde se produce la regularización de proliferación, supervivencia, migración, destino y envejecimiento de las células madre y actúan como matriz primaria para la regeneración de tejidos durante la inflamación, lesiones tisulares y ciertos cánceres.<sup>(5,18,19,21,27)</sup>

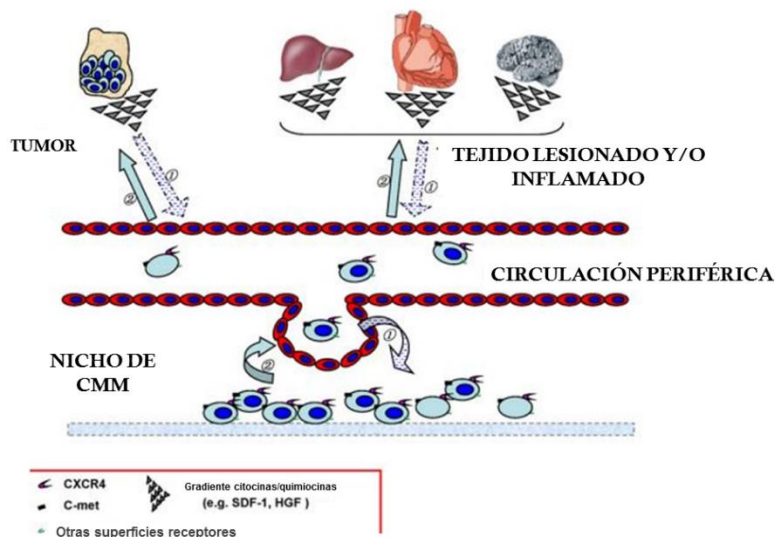
**Figura 2** Las CMM presentan propiedades multipotentes *in vitro*, cuando se caracterizan apropiadamente tienen la capacidad de diferenciarse en todas las células de linaje mesodérmico, como fibroblastos, osteocitos, condrocitos, adipocitos o miocitos.<sup>(28)</sup> Existen estudios que indican que se pueden transformar en células de origen endodérmico o ectodérmico sin embargo son pocos.<sup>(29)</sup>

El principal potencial terapéutico de estas células se asocia con su capacidad de inhibir la inflamación e iniciar la regeneración tisular.<sup>(30)</sup> Gracias a la capacidad de búsqueda, las CMM migran a sitios lesionados para diferenciarse en componentes locales y secretar quimocinas, citocinas y factores de crecimiento que ayudan a la regeneración tisular.<sup>(20,31)</sup> **Figura 3**





**Figura 2.** Principales características de las CMM y sus funciones *in vitro* e *in vivo*. Las CMM están involucradas en importantes vías de renovación celular por mediar en la regeneración de células dañadas o envejecidas, apoyar la reparación de tejidos en los sitios de las heridas y modular las funciones inmunes. Debido a las capacidades migratorias, CMM puede interactuar y apoyar las células de tejido normal dañadas en la vecindad local proporcionando un adecuado microambiente **Fuente:** Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). MSC. *Cell communication and signaling* : CCS, 9, 12.<sup>(31)</sup>



**Figura 3.** Modelo que muestra las CMM que migran selectivamente a áreas de lesión / inflamación y tumores, donde contribuyen a la reparación y formación de tejido de estroma asociado a tumor. (1) La secreción de quimiocinas / citocinas de tumores y tejidos lesionados aumenta la supervivencia, la proliferación y la migración de CMM. (2) Las CMM activadas migran a los sitios de lesión, inflamación y tumores. **Fuente:**(modificado de Menon et al., 2007; Wojakowski et al., En prensa).<sup>(32)</sup>

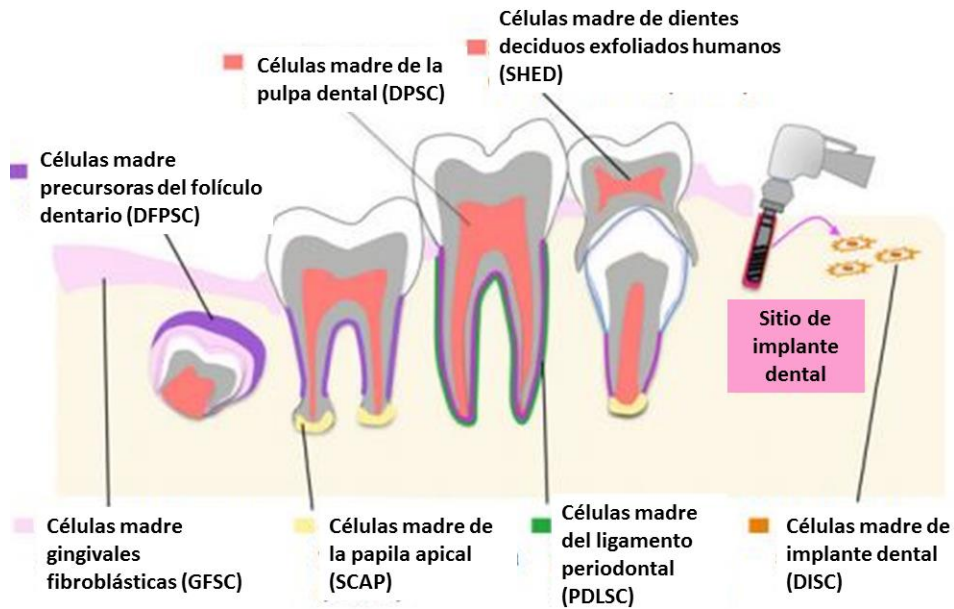
La capacidad de modular la respuesta inmune es otra de las características de las CMM, además de su potencial regenerativo, los exosomas de las CMM son inmunológicamente activos lo que significa que a través de la inducción de antiinflamatorios, citocinas y células T reguladoras tienen el potencial de atenuar el sistema inmunológico, esto implica que la infusión de las células madre alogénicas no induce una respuesta inmunitaria clínicamente significativa.<sup>(33,34)</sup>

### ***Células madre dentales humanas (hDSCs)***

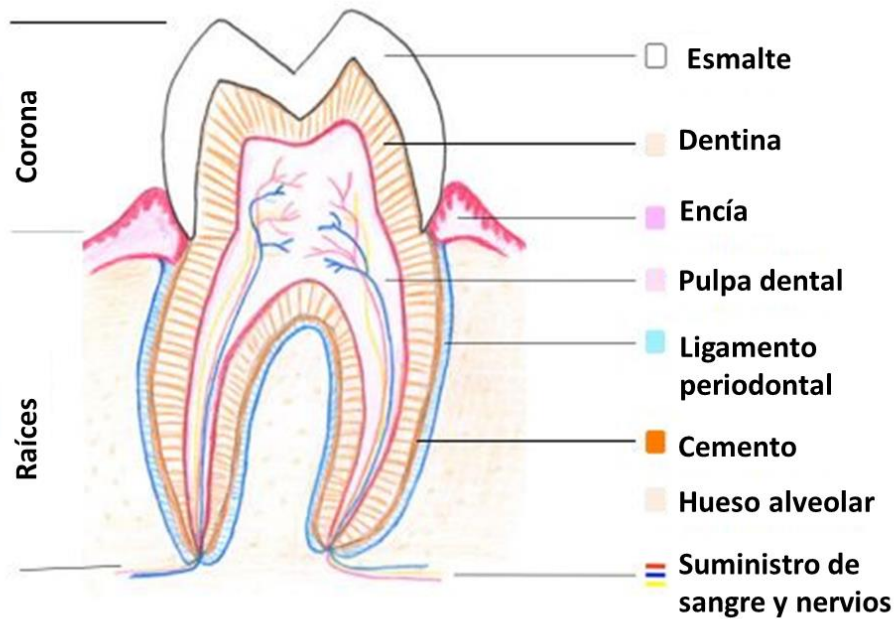
La búsqueda de CMM más accesibles que las que se encuentran en la médula ósea (BMSC) y cordón umbilical (UCSC) ha impulsado el interés en los tejidos dentales que son ricos en células madre. Las hDSC pueden diferenciarse en óseas, odontogénicas, adiposas, tejidos endoteliales y neurales por lo que se clasifican en CMM multipotentes.<sup>(6,35)</sup> Las hDSC son células mesenquimales derivadas de la cresta neural (ectodermo) que se encuentran en la pulpa dental de dientes permanentes (DPSC), células del germen dental,<sup>(36)</sup> dientes deciduos exfoliados humanos (SHED),<sup>(37)</sup> papila apical de la raíz (SCAP),<sup>(38)</sup> hueso alveolar,<sup>(39)</sup> células precursoras del folículo dentario (DFPC),<sup>(40)</sup> sitio de implante dental (DISC), células gingivales fibroblásticas (GFSC) y ligamento periodontal (PDLSC).<sup>(41)</sup> **Figura 4** Las hDSC desempeñan un papel importante en la homeostasis y reparación dental, estas células permanecen activas durante la vida y generan odontoblastos, que funcionan para reparar daños de dentina.<sup>(6)</sup>

Existen poblaciones diferentes de células madre que han sido descritas en dientes y soporte periodontal, muchas de las cuales comparten propiedades *in vitro* con las hBMSC ya que ambas son capaces de diferenciarse en la célula que genera el mineral que las rodea, osteoblastos en BMSC y odontoblastos en hDSC por esta razón, estas poblaciones de células madre se denominan colectivamente “*células madre dentales humanas*” aunque no todas son iguales en términos de sus propiedades fenotípicas y funcionales.<sup>(42)</sup>

Además, las células madre dentales humanas se han utilizado para la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico.<sup>(43)</sup> promoviendo la oseointegración de implantes dentales<sup>(44)</sup>, tratamiento espinal<sup>(45)</sup>, aceleración de la cicatrización de heridas en la piel<sup>(46)</sup>, aumento angiogénesis en la extremidad trasera isquémica<sup>(47)</sup>, mejorando la función cardíaca y reduciendo el tamaño del infarto en el infarto de miocardio.<sup>(48)</sup>



**Figura 4.** Células madre mesenquimales dentales. *Fuente:* Sharpe P. T. *Dental mesenchymal stem cells.*<sup>(7)</sup>



**Figura 5.** Componentes estructurales del diente. *Fuente:* Sharpe P. T. *Dental mesenchymal stem cells.*<sup>(7)</sup>

### ***Células madre mesenquimales de la pulpa dental humana (hDPSC)***

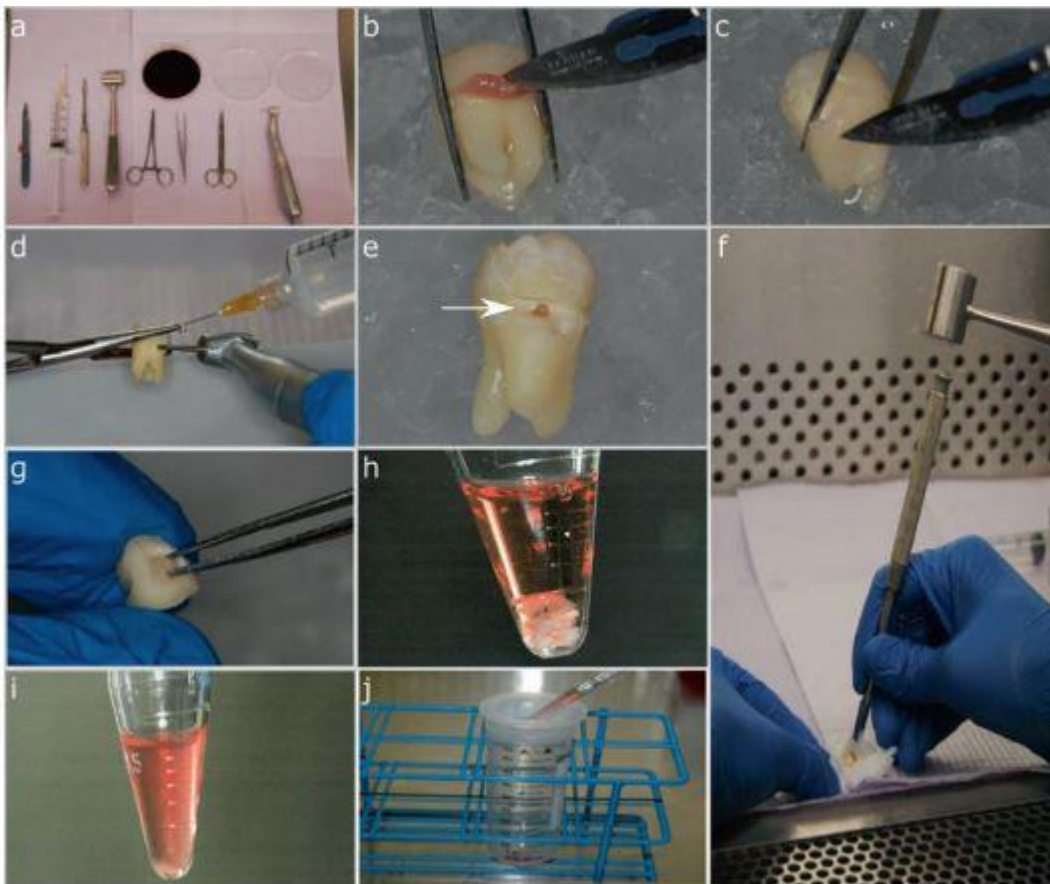
La pulpa dental compuesto por fibroblastos se encuentra rodeado de tejidos mineralizados que están compuestos por la capa más externa de esmalte y una capa de dentina.<sup>(7,8)</sup> **Figura 5** En la formación dental las interacciones entre el epitelio y las células de la papila fomentan la morfogénesis dental, al estimular una subpoblación de células mesenquimales para diferenciarse en odontoblastos que a su vez forman dentina primaria. Morfológicamente son células columnares polarizadas con núcleos excéntricos y procesos celulares largos alineados en los bordes externos de la dentina. Una vez erupcionado el diente, la dentina reparadora está formada por odontoblastos en respuesta a la erosión mecánica general o rotura, y a través de la degradación dentinaria causada por bacterias. Se cree que estos odontoblastos surgen de la proliferación y diferenciación de una población de precursores, que residen en algún lugar dentro del tejido pulpar.<sup>(35)</sup>

A pesar que las hDPSC tienen una diferenciación más restringida que las hBMSC *in vivo* son de fácil acceso lo que incrementa su interés en ingeniería tisular y medicina regenerativa.<sup>(1,6,42)</sup> La pulpa dental contiene células clonogénicas altamente proliferativas capaces de regenerar un tejido, propiedades que en definitiva las convierte en CM.<sup>(35)</sup> En comparación con poblaciones, como hBMSC, las hDPSC muestran una frecuencia más alta de formación de colonias y mayor potencial de proliferación, que es mantenido a lo largo del cultivo celular.<sup>(49)</sup>

Las células madre de la pulpa dental también pueden expresar marcadores de linaje neural, proponiendo una nueva alternativa prometedora para el tratamiento del accidente cerebrovascular y enfermedades neurológicas que en la actualidad no cuentan con agente farmacéutico o biológico clínicamente probado para mejorar la discapacidad neurológica.<sup>(50)</sup>

### ***Aislamiento celular***

El procedimiento de recolección es un aspecto decisivo que debe considerarse en cualquier esfuerzo hacia la estandarización de cultivo celular. Este paso inicial de la recuperación de CMM del tejido donante define la población celular que se propagará *in vitro*. Las CMM se aíslan generalmente como población de células adherentes al plástico utilizando procedimientos que implican explantes de tejido, digestión enzimática y crecimiento celular en una superficie de plástico. Mohammed Bakkar y colaboradores recomiendan una técnica suave para recuperar la pulpa dental con trauma reducido por irrigación continua, reducción de calor de fricción de la rotación de la fresa y reducción del tiempo de contacto de la fresa con la dentina.<sup>(51)</sup> **Figura 6**



**Figura 6** Pasos para aislar las hDPSC y las células madre del ligamento periodontal PDLSC de un solo diente. a) Instrumental básico para el aislamiento de células madre dental. (b) La cuchilla quirúrgica n. ° 11 se utiliza para extirpar la encía del diente dentro de un plato de cultivo colocándolo en la parte superior de un recipiente lleno de hielo. (c) la hoja n. ° 11 se usa para raspar suavemente el tejido periodontal desde el tercio medio de la raíz hacia el ápice de la raíz. (d) Se sujeta el diente con una pinza hemostática y se crea un surco horizontal en la unión cemento-esmalte (CEJ) con una fresa de carburo de fisura recta mientras se riega con PBS estéril. (e) Se crea una ranura horizontal a la profundidad de la cámara pulpar (la flecha blanca muestra la cámara y el tejido pulpares expuestos). (f) Diente dividido usando un cincel y un mazo. (g) Tejido de la pulpa dental extraído con micro pinzas. (h) Tejido de pulpa dental digerido con dispasa II, collagenasa tipo 1 y antibiótico / antimicótico al 1% en PBS. (i) Tejido de pulpa dental después de 1 h incubación a 37 ° C. (j) Solución que contiene hDPSC vertida a través de un colador de células de 70 µm para eliminar cualquier resto de tejido o grupos de células. **Fuente:** A Simplified and Systematic Method to Isolate, Culture, and Characterize Multiple Types of Human Dental Stem Cells from a Single Tooth. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1553 .<sup>(51)</sup>

### ***Cultivo celular***

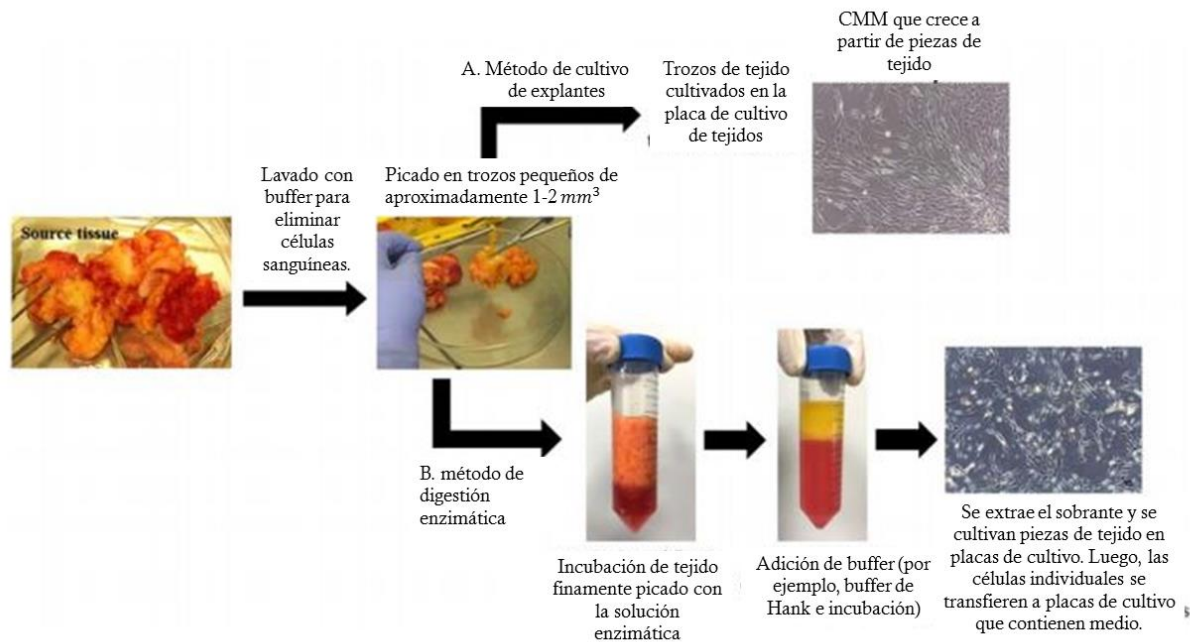
Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica actual, ya que permiten establecer modelos de estudio acerca de los componentes estructurales, así como los fenómenos biológicos, moleculares y el comportamiento celular.<sup>(52)</sup> Los procedimientos generalmente se pueden dividir en enzimáticos y de explantes.<sup>(53)</sup>

El cultivo de explantes es una de las primeras técnicas de aislamiento y cultivo celulares *in vitro*. La fuente del tejido se enjuaga para eliminar las células sanguíneas y luego mecánicamente dividir (por ejemplo, cortar o picar) en pequeños trozos de no más de unos pocos milímetros de longitud, reducir el tamaño del tejido en piezas pequeñas permite la difusión de gases y nutrientes hacia las células.<sup>(54)</sup>

Sin embargo, un picado excesivo puede provocar la destrucción mecánica de las células, posteriormente se colocan los trozos de tejido sobre la superficie de los platos con medio de cultivo. Después de varios días, se pueden extraer los trozos de tejido. El éxito en el cultivo de explantes primario depende de la capacidad migratoria del tipo de células.<sup>(55)</sup>

El método de cultivo enzimático comprende pasos adicionales donde el tejido cortado en trozos grandes se incuba con una solución enzimática que degrada la matriz extracelular de las células individuales donde los pequeños agregados celulares se liberan del tejido y se transfieren a platos de cultivo que contienen medio.<sup>(53,61)</sup> **Figura 7**

El método de explante ha sido informado que recolectan poblaciones de células menos heterogéneas que exhiben mayores tasas de proliferación y viabilidad celular en comparación con el método enzimático.<sup>(60,65)</sup>



**Figura 7** Esquema que demuestra los pasos de aislamiento de CMM por (A) método de cultivo de explante y (B) método enzimático. *Fuente:* [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].<sup>(53)</sup>

El tipo de enzima empleada tiene un efecto sobre el resultado de la digestión en términos de eficiencia, rendimiento, viabilidad y toxicidad.<sup>(56)</sup> La tripsina, con o sin ácido etileno tetra acético (EDTA), es cada vez más utilizado como una enzima disociativa común.<sup>(57)</sup> La duración del tratamiento enzimático es de vital importancia, ya que puede degradar la matriz extracelular y la membrana celular, evitando que las células se adhieran al plato de cultivo después del aislamiento.<sup>(58)</sup> Para evitar la muerte celular por sobrepoblación es necesario realizar subcultivos o pasajes celulares. El crecimiento celular será utilizado como cultivo primario con un nivel doble de población (PDL) cero que puede entenderse como el número de veces que se realiza un subcultivo a partir del cultivo primario. Dependiendo de la confluencia celular se determina la viabilidad de realizar subcultivos en relación 1:3 o 1:2 platos. Algunos tipos celulares tienen un tiempo de vida *in vitro* (número acumulado de PDL) de entre 30- 40 PDL.<sup>(51)</sup>

### ***Medios de cultivo***

El medio de cultivo en cultivo *in vitro* representa un microambiente en condiciones *in vivo* y puede determinar el destino celular y por tanto la secreción celular.<sup>(59)</sup> Por tanto, el mismo tipo de células pueden secretar diferentes niveles de factores de crecimiento cuando fueron cultivados en diferentes medios.<sup>(60)</sup> **Tabla 3**

**Tabla 3** Característica de los medios de cultivo celulares más utilizados en cultivos para CMM.

Medio de cultivo	Características
<b>DMEM</b>	El medio de Eagle modificado de Dulbecco, contienen un aumento cuádruple en la concentración de aminoácidos y vitaminas encontrados en el medio MEM. Sus modificaciones son ampliamente utilizadas para apoyar el crecimiento de un espectro amplio de células mamíferas.
<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	Se recomienda la modificación alfa (Alpha MEM) sin nucleósidos para una amplia variedad de cultivos celulares. La selección de un medio nutritivo adecuado depende del tipo de célula, las condiciones de cultivo y el grado de definición química. la suplementación adicional a Alpha MEM han aumentado las aplicaciones para este medio.
<b>McCoy</b>	Se formuló para satisfacer los requerimientos de cultivo de células de hepatoma Novikoff, actualmente se ha encontrado que permite la proliferación indefinida de células de carcinoma Walker 256 junto con una amplia variedad de células de humanos y de rata normales y transformadas. Esta versión de McCoy 5A incluye los niveles aumentados de inositol y glucosa.

Fuente: directa.<sup>(59,60,61)</sup>

Las células aisladas se cultivan en un medio celular para que de ese modo comience a emanciparse ciertos factores solubles en el medio durante el período de cultivo que se denomina medio acondicionado. Estos factores que se secretan promueven antioxidantes, inmunosupresores y efecto proliferativo. El medio acondicionado tiene capacidad de diferenciación y función terapéutica. Por lo tanto, puede diferenciar las células en diferentes linajes.<sup>(60,61)</sup> El medio se suplementa con suero bovino fetal al 10% y el rendimiento del crecimiento se evalúa utilizando líneas celulares apropiadas.<sup>(62)</sup>

***L-glutamina*** Se recomienda la L-Glutamina (200 mM) como suplemento de cultivo celular. Los reactivos y suplementos de Sigma se evalúan por su capacidad para promover o mantener el crecimiento celular sin demostrar efectos citotóxicos.<sup>(63)</sup>

### ***Suero Fetal Bovino (SFB)***

Se utiliza en una amplia gama de cultivos celulares, proporcionando propiedades no definidas promoviendo el crecimiento y supervivencia, es un factor potenciador de las células en cultivo,



compuesto por: Hemoglobina  $\leq 20$  mg / dL, calentar suero a  $56^{\circ}$  C durante 30 minutos inactiva el sistema del complemento para inmunoensayos activados por calor.<sup>(63)</sup> El SFB contiene una alta concentración de crecimiento celular y factores de unión junto con compuestos nutricionales y fisicoquímicos necesarios para el mantenimiento celular.<sup>(64)</sup>

### *Antibióticos*

El uso de antibióticos en cultivo celular no está destinado a un sustituto de la técnica aséptica adecuada. Además, se ha descubierto que muchos antibióticos son citotóxicos en algunos casos, incluso en concentraciones acercándose a sus niveles efectivos. La citotoxicidad depende de las células y se debe tener cuidado al seleccionar la concentración de antibiótico adecuada. Los antibióticos son para controlar la contaminación microbiana en cultivo celular o envasados especialmente para conveniencia de uso en aplicaciones de biología molecular.<sup>(65)</sup>

### *Pen-Strep*

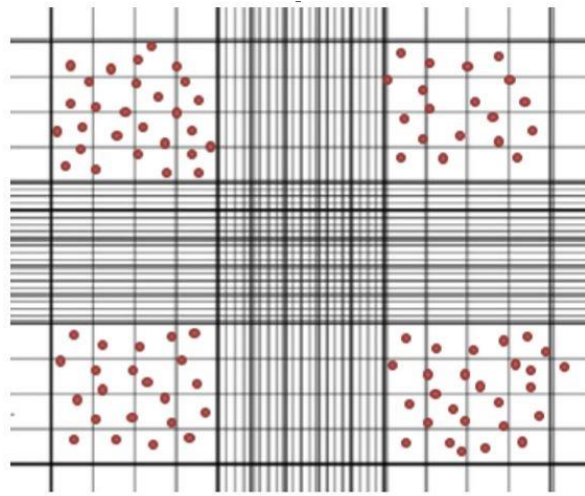
La penicilina-estreptomina se usa para complementar los medios de cultivo celular para controlar contaminación bacteriana. Recomendado para su uso en aplicaciones de cultivo celular en 10 ml / L.<sup>(63)</sup>

### *Proliferación celular*

Existen diversos medios de cultivo que propician el mantenimiento celular *in vitro*; sin embargo, algunos cuentan con ciertas características específicas en requerimientos nutricionales que favorecen la proliferación celular, esto es importante en aspectos de investigación ya que también es un indicativo del potencial de viabilidad celular y específicamente de las hDPSC del potencial inductor y de diferenciación.<sup>(66)</sup>

Los ensayos para medir la proliferación, la viabilidad y la citotoxicidad se utilizan comúnmente para controlar la respuesta y la salud de las células en cultivo después del tratamiento con varios estímulos.<sup>(63)</sup> Se debe realizar un conteo celular al desprender las células, el método recomendado para la evaluación del número total de células presentes en los líquidos es el recuento manual en hemocitómetro (cámara de Neubauer) que es el más utilizado de rutina tanto en los laboratorios de citología como en los generales y de guardia .<sup>(67,68)</sup>

**Hemocitómetro (Cámara de Neubauer)** Para realizar un conteo celular en el hemocitómetro se desprenden las células con 0.1 ml de Tripsina- EDTA durante 5 minutos. Se toman 10  $\mu$ L de la muestra y se coloca en la cámara de Neubauer y observar en el microscopio, se enciende la luz y se procede a enfocar. **Figura 8**



**Figura 8** Imagen representativa del conteo celular en el hematocitómetro

Una vez que las células ya estén enfocadas, esto es, que se vean nítidas, se procede a realizar el conteo en cada uno de los cuadros que son en total: L1, L2, L3, y L4.

Cuando ya se tiene la cantidad de células contabilizadas en los cuatro cuadros se utiliza la siguiente fórmula para determinar la concentración celular:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volúmen en ml}}$$

### ***Caracterización: Diferenciación a linajes celulares***

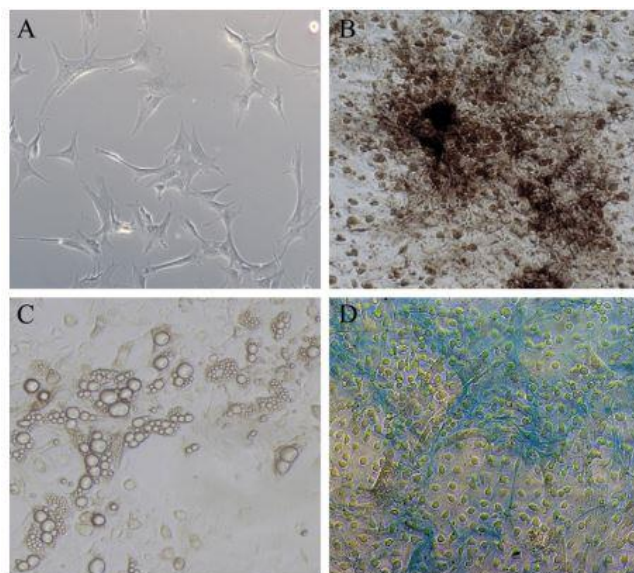
El Comité Internacional de Células Madre Mesenquimales y Tisulares (*Society for Cellular Therapy*) propone criterios mínimos para definir las CMM humana.

En primer lugar, debe ser adherente al plástico cuando se mantiene en condiciones de cultivo estándar, la adherencia al plástico es una capacidad de expansión rápida las CMM humanas en el cultivo.<sup>(9)</sup> Estudios han demostrado que las CMM puede mantenerse, y posiblemente expandirse, sin adherencia, estos protocolos suelen requerir un cultivo en condiciones muy específicas (cultivo en suspensión), si se mantienen bajo las mismas condiciones estándar, se espera que demuestren adherencia por sí mismas y así considerarlas una población de CMM.<sup>(12)</sup>

En segundo, lugar debe expresar CD105 (conocido como endoglina y originalmente reconocida por el MAb SH2), CD73 (conocido como ecto 5' nucleotidasa y originalmente reconocido por el MAb SH3 y SH4) y CD90 (también conocido como Thy-1). Para asegurar que los estudios de poblaciones heterogéneas de CMM no sean confundidos por otras células, se recomienda que la falta de expresión de Ag hematopoyético sea utilizada como criterio adicional. La CMM carecen de expresión de CD45 es un marcador de pan-leucocitos; CD34 marca los progenitores hematopoyéticos primitivos y células endoteliales; CD14 o moléculas de superficie CD11b ocupan un lugar destacado expresado en monocitos y macrófagos, el más probable células hematopoyéticas que se encuentran en un cultivo de CMM, CD79a o CD19 son marcadores de células B que también pueden adherirse a CMM en el cultivo y seguir siendo vital a través de interacciones estromales; y HLA-DR no son expresado en CMM a menos que se estimule, p. ej. por IFN- $\gamma$ . Solo uno de los dos marcadores de macrófagos y células B necesita ser probado. Cada grupo de investigadores debe seleccionar los marcadores que sean más fiables en su laboratorio.<sup>(10,11,12)</sup>

En tercer lugar, debe tener la propiedad biológica que más singularmente identifica a las CMM la cual es su capacidad para la diferenciación mesenquimatosa trilineal: osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*. La diferenciación de los osteoblastos se puede demostrar mediante tinción con rojo de alizarina o tinción de von Kossa.<sup>(13)</sup> La diferenciación de adipocitos se demuestra más fácilmente por tinción con Oil Red O. La diferenciación de condroblastos es demostrada mediante tinción con Safranina O /azul alcian o tinción inmunológica para el colágeno tipo II.<sup>(11)</sup> **Figura 9**

Este conjunto mínimo de criterios estándar fomenta una caracterización más uniforme de CMM y facilita el intercambio de datos entre investigadores. **Tabla 4**

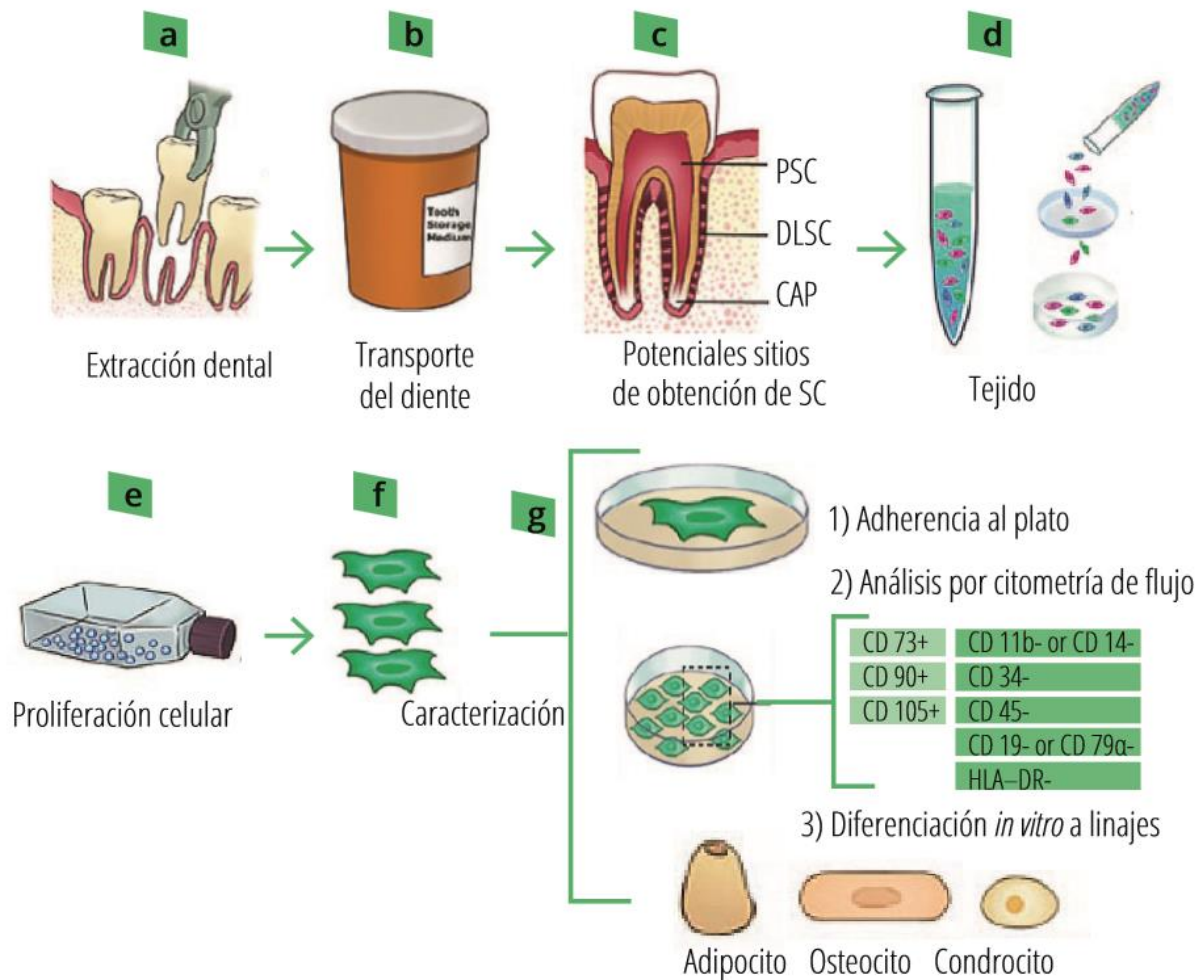


**Figura 9** Células madre mesenquimales (CMM) y su diferenciación. (A) CMM indiferenciadas cultivadas en cultivo monocapa y fueron expuestas a agentes adipogénicos, osteogénicos y osteogénicos específicos, respectivamente. (B) Las células expresaron fosfatasa alcalina en el día 21 en medio osteogénico. (C) Se detectaron gotas de lípidos después de 2 semanas de inducción. (D) Condrocitos que fueron detectados por tinción con azul alcian, que tiñe la matriz secretada por estas células. **Fuente:** Int J Biochem Cell Biol 40:815–820.<sup>(69)</sup>

**Tabla 4** Criterios de identificación de CMM.

<b>Criterios de identificación de CMM</b>		
<b>1. Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar</b>		
<b>2. Fenotipo</b>	<b>Positivo</b> ( $\geq 95\%+9$ )	<b>Negativo</b> ( $\leq 2\%+$ )
	CD105 CD73 CD90	CD45 CD34 CD14 o CD11b CD79 $\alpha$ o CD19 HLA-DR
<b>3. Diferenciación <i>in vitro</i>: osteoblastos, condroblastos y adipocitos. (demostrado por tinción de cultivo celular <i>in vitro</i>)</b>		

**Fuente:** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy (Taylor & Francis Ltd), 8(4), 315–317.<sup>(11)</sup>



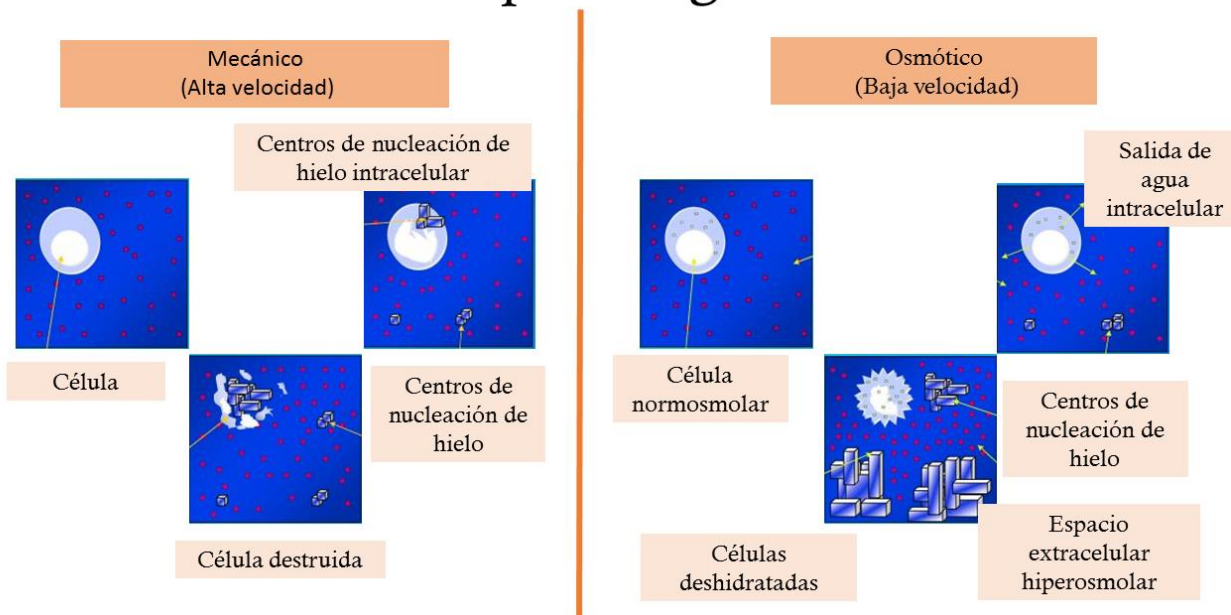
**Figura 10** Representación esquemática de los pasos de obtención, aislamiento, Subcultivo y caracterización de hDPSC. (a, b) Extracción dental de dientes sanos del paciente se transfieren a un recipiente con una solución de almacenamiento. (c) En el laboratorio se realiza el aislamiento de células madre de papila apical (SCAP), células madre de ligamentos periodontales (PDLSC) y se realizan células madre pulpares (DPSC). (d) Se obtiene una suspensión de una sola célula después de la digestión enzimática del tejido y luego se filtró a través de un colador de células de 70 µm para eliminar grandes grupos de células y restos de tejido. (e, f) Las DSC se expanden en un cultivo de tejido celular o en un matraz para generar suficientes células. (g) Las principales características de las CMM son su: (1) Adherencia plástica; (2) Expresión de CD 73, CD 90, y CD 105, y falta de expresión de CD 45, CD 34, CD 14 o CD 11b, CD 19 o CD 79α y HLA-DR; (3) Diferenciación *in vitro* en condiciones específicas de cultivo en adipocitos, condrocitos y osteocitos. **Fuente:** A Simplified and Systematic Method to Isolate, Culture, and Characterize Multiple Types of Human Dental Stem Cells from a Single Tooth. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1553. <sup>(51)</sup>

### ***Criopreservación celular***

Las extracciones de dientes o las exfoliaciones espontáneas suelen ocurrir en un período de vida en el que normalmente no hay necesidad de una terapia con células madre. Por esta razón es necesario aislar, cultivar y almacenar las células madre hasta el momento en que se requieran.<sup>(70)</sup>

La criopreservación es un proceso que permite mantener la viabilidad celular al congelarlos y almacenarlos a temperaturas bajo cero, cuando no ocurren reacciones bioquímicas.<sup>(71)</sup> Las hDSC pueden sufrir daños irreversibles durante el proceso de congelación o descongelación, conocido como lesión por congelación.<sup>(72)</sup> Se conoce poco sobre el mecanismo que explica los daños irreversibles en los hDSC por formación extracelular e intracelular de cristales de hielo. El primer mecanismo ocurre, cuando las hDSC se enfrían lentamente y la formación de cristales de hielo extracelular provoca una salida osmótica de agua de las células, este mecanismo aumenta la concentración de solutos intracelulares, lo que puede provocar un daño osmótico provocando toxicidad del soluto. El otro sucede, cuando los hDSC se enfrían rápidamente, por eso, no hay suficiente tiempo para que el agua salga de las células y la formación intracelular de cristales de hielo provoca daños a las células.<sup>(73)</sup> **Figura 11**

## Lesión por congelación



**Figura 11** Lesión por congelación, mecánico y osmótico *Fuente:* THEI. Diego H. Santamarina

Para evitar eso, existe un agente crioprotector que se incorpora en el medio de congelación para proteger las hDSC durante el proceso de congelación y descongelación. Ayuda a optimizar la velocidad de enfriamiento y bloquear la formación de cristales de hielo al unirse a los núcleos y ralentizar el crecimiento de los cristales de hielo .<sup>(74)</sup>

Los agentes crioprotectores utilizados actualmente se dividen en dos grupos: a) Sustancias de bajo peso molecular (glicerol, etilen (propilen) glicol, dimetil sulfóxido) que puede penetrar en una célula citoplasmática membrana, prevenir la formación de núcleos de cristales de hielo y ralentizar el crecimiento de los cristales de hielo dentro de las células.<sup>(75)</sup> b) Sustancias con alto peso molecular (dextrano, hidroxietil, almidón, polivinilpirrolidona y alcohol polivinílico) permanecen en el espacio extracelular y permiten la deshidratación celular y la minimización del cristal de hielo intracelular formación y estabilizar la membrana celular.<sup>(74)</sup>

### **Terapia celular con CMM**

En la actualidad la superioridad en el uso terapia de CMM en comparación con otros tratamientos es monumental ya que presentan las siguientes características:

- a) Son fácilmente accesibles y pueden aislarse de diversos tejidos como la médula ósea y los tejidos adiposos, incluso en cordón umbilical, pulpa dental, sangre menstrual, almohadilla de grasa bucal, hígado fetal, etc.
- b) Son células con tallo multipotente.
- c) Las CMM pueden expandirse fácilmente al volumen clínico en un período de tiempo adecuado.
- d) Las CMM se pueden almacenar para uso terapéutico (criopreservación).
- e) Los ensayos clínicos de CMM hasta ahora no han mostró reacciones adversas a las CMM alogénicas.
- f) Su uso es seguro.

La eficacia de las CMM se ha documentado en varios ensayos clínicos a través del tiempo para su uso en tratamientos.<sup>(76)</sup>

## 9 ANTECEDENTES

El concepto de célula madre no es nuevo, a través de la historia ha sido utilizado con términos diferentes, pero de una manera parecida. Aristóteles (384-322 a.C.) sembró las primeras interrogantes del desarrollo embriológico, en el siglo XIII-XIV Leonardo Da Vinci (1452-1519), basándose en sus dibujos de embriones explica de una forma más clara y concisa lo que es la naturaleza de un nuevo ser.

En el año 1655, el científico inglés Robert Hooke hizo una observación que cambió el estudio de la biología para siempre. Mientras examinaba una sección seca fina de alcornoque (árbol de corcho) con un microscopio crudo de luz, Hooke observó que el corcho consistía en pequeños espacios rodeados de paredes, tal como un panal, pero que los espacios eran irregulares y no profundos, a los que nombró células. Theodor Schwann y Matthias J. Schleiden, a principios de la década de 1830, postulan que todos los seres vivos están formados por células. En 1855 Rudolph Virchow afirmó que las células se derivan de una célula precursora gracias al proceso de división celular.<sup>(75)</sup>

En 1882, Sydney Ringer desarrolló la solución de Ringer, una solución salina equilibrada de una composición cercana a la de los fluidos corporales, y logró mantener latiendo con éxito los corazones de las ranas después de la disección y extracción del cuerpo,<sup>(78)</sup> esta solución permitió a Roux en 1885, mantener durante días células de embrión de pollo, iniciando el desarrollo del cultivo celular.<sup>(79)</sup>

Harrison en 1907, realizó un cultivo de médula espinal embrionaria de anfibios. Se originaron una serie de complicaciones en los primeros cultivos, limitados por no lograr establecer un medio nutritivo adecuado, lo cual fue logrado en 1910 por Burrowsel, el cual utilizó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo, fue uno de los primeros medios que permitió la observación y el crecimiento de tejidos.<sup>(80)</sup>

Burrows y Carrel, realizaron los primeros cultivos celulares de mamífero, los explantes obtenidos de perros, gatos y conejo se lograron conservar y obtener de esta manera, crecimiento de tumores sólidos. Determinando así que la vida en los diferentes cultivos se puede prolongar por medio de subcultivos al emplear en los medios plasma suplementado con extractos de embrión.

El uso de extractos enriquecidos de Tripicina por Roux y Jones en 1916, rompió las células de embriones de pollo, creando de esta manera el primer cultivo celular, conocido y funcional. La contaminación de los cultivos celulares fue durante todo ese tiempo un problema fundamental, y para resolver esta problemática, se desarrolló numerosos métodos de manipulación en pro de conseguir medios libres de contaminación.



Gracias al uso de la Tripsina, Carrel en 1913 demostró cómo mantener un medio de cultivo de células extraídas de embrión de pollo, durante 34 años, periodo de tiempo superior al de la vida de este. Entre 1920 y 1940 se implementaron diversas estrategias de obtención de cultivo y de mantenimiento de las en condiciones estériles, pero no hubo avances.<sup>(81)</sup>

Las investigaciones de las CM inician en la década de 1950 cuando un grupo de investigadores descubre que la médula ósea contiene al menos dos tipos de células madre: a) células madre hematopoyéticas, que se encuentran en todos los tipos de células sanguíneas del cuerpo y b) células madre mesenquimales, descubiertas años más tarde. Estas células madre al no ser células hematopoyéticas forman parte de una pequeña población de células del estroma de la médula ósea y pueden generar hueso, cartílago y grasa. Hacia la década de 1960, los científicos que estudiaban ratas descubrieron dos regiones del cerebro que contiene células en división que pasaban a formar las células nerviosas, pero por la escasa evidencia los científicos creyeron que el cerebro adulto no podía generar nuevas células nerviosas.<sup>(78)</sup>

En 1966, Friedenstein y colaboradores informaron CMM en la médula ósea,<sup>(3)</sup> posteriormente, las CMM se encontraron amplia y gradualmente en muchos tejidos.<sup>(82,83)</sup> Las CMM fueron reconocidas a lo largo del tiempo como células progenitoras adultas multipotentes con el potencial de autorrenovación y diferenciación en linajes mesodérmicos y no mesodérmicos, pero no existía un marcador de definición para las CMM.<sup>(10)</sup>

La propagación in vitro de CMM, definida como unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), se identificó originalmente en médula ósea de cobayo por Friedenstein, Chailakhjan y Lalykina en 1970.<sup>(69)</sup>

En 1976 Friedenstein y colaboradores describieron por primera vez células madre derivadas de la médula ósea siendo el tipo de célula más investigado y, mejor conocido como el estándar de oro.<sup>(84)</sup>

Ya en la década de 1990 los científicos encontraron que el cerebro adulto contiene células madre capaces de generar los tres principales tipos de células del cerebro: astrocitos, oligodendrocitos y neurona. Durante esta década, la ingeniería tisular llevo a cabo con éxito productos de comercialización de tratamientos de medicina regenerativa de tejidos de piel y cartílago provocando mucho interés en los inversores hacia laboratorios de investigación en la aplicación de la ingeniería tisular.<sup>(85)</sup> La estrategia de combinar células y matriz funcionó para piel y cartílago ya que estos tejidos no requieren vascularización extensa y otros procesos tisulares importantes; sin embargo seguían existiendo obstáculos importantes a superar, como proporcionar un suministro vascular funcional, controlar la compleja disposición de diferentes tipos de células en un tejido 3D, y la identificación de células cualitativa y cuantitativamente fiables para la realización de esos tejidos.<sup>(16)</sup>

En 1998 Thomson y colaboradores informaron por primera vez líneas de hESC, obtenidas del blastocisto durante el desarrollo embrionario que dan lugar a las tres capas germinales principales: ectodermo, endodermo y mesodermo. Estas células son totipotentes o pluripotentes, lo que significa que poseen la capacidad ilimitada para diferenciarse y caracterizarse en cada uno de los más de 200 tipos de células del cuerpo adulto.<sup>(18,23)</sup>

A inicios de la década de los 2000, inversores dejaron de financiar empresas de ingeniería tisular por el auge de la alta tecnología y los argumentos éticos y morales en el uso de hESC, provocando un declive en la industria.<sup>(86)</sup> No fue hasta que, en el año 2000, Gronthos y colaboradores aislaron por primera vez hDPSC en el que exhibieron una mayor tasa de proliferación en comparación con hBMSC *in vitro* abriendo un nuevo panorama de investigación de las CMM pulpares.<sup>(35)</sup>

En el año 2002, Jiang y colaboradores sugieren que las CMM son capaces de sufrir una diferenciación poco ortodoxa, dando lugar a células con mesodermo visceral, neuroectodermo y endodermo características en condiciones específicas condiciones experimentales *in vitro*.<sup>(87)</sup>

Muchas investigaciones también indicaron que las CMM podrían injertarse en huesos, músculos, cerebro, pulmón, corazón, hígado, tracto gastrointestinal y sistema hematopoyético cuando se trasplanta (Anjos-Afonso, Siapati y Bonnet, 2004).<sup>(88)</sup> En el año 2004 Baksh y colaboradores consideran a las CMM como fuente apropiada de células para el tratamiento de una serie de enfermedades congénitas y degenerativas.<sup>(89)</sup> Históricamente, el primero centro de criopreservación de CMM se construyó en Japón en Universidad de Hiroshima en 2005.<sup>(90)</sup>

He, Wan y Li, 2007, mencionan que la médula ósea es la más rica y confiable reservorio de CMM, pero la exploración de la existencia de las CMM en otras fuentes también es importante para comprender la biología de las CMM.<sup>(91)</sup> Da Silvia Meirelles, Chagastelles y Nardi, 2006 y Baksh Yao y Tuan, 2007, prueban que las CMM ahora se han aislado de ambas médulas óseas y muchas otras fuentes de tejido, incluido el tejido adiposo, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical humano, pulmón, pulpa dental, líquido amniótico, hígado fetal e incluso sangre periférica, lo que concluyen que las CMM se distribuyen de manera diversa *in vivo*.<sup>(92,93)</sup>

Uccelli, Moretta y Pistoia, 2006, demostraron que CMM expresa una restricción patrón de receptores de quimiocinas que les permite migrar a los tejidos sobre desencadenantes quimiotácticos específicos, demostrando que migran a varios lugares *in vivo* como los sitios de lesión, de inflamación y tumores).<sup>(32)</sup>

En 2006, la International Society for Cellular Therapy (ISCT) definió los criterios mínimos para las CMM según sus características biológicas: adherente al plástico, crecimiento,

expresión positiva de CD105, CD73 y CD90, expresión negativa de CD14, CD34 y CD45, y diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos in vitro. <sup>(10,11)</sup>

Sin embargo, las CMM no poseen un marcador único que se pueda utilizar de forma confiable para aislamiento y purificación. Koide y colaboradores en 2007, refieren que el fenotipo exacto de los cultivos de CMM, así como el fenotipo antes del cultivo celular se encuentra aún en discusión. <sup>(94)</sup>

Para el 2008 las BMSC eran la principal fuente tradicional de CMM a pesar de esto la recolección de BMSC es un procedimiento invasivo y doloroso y el número de células disminuye significativamente con la edad y enfermedad, existiendo el riesgo de contaminación durante el aislamiento, todos estos factores limitan el uso de la médula ósea como fuente adecuada de CMM para terapia celular. Por lo tanto, la atención debe centrarse en los tejidos que contienen células con una mayor potencia proliferativa y de diferenciación y menor riesgo de contaminación viral. <sup>(95)</sup>

En el año 2008 la ingeniería tisular fue parcialmente compensada por un aumento en las empresas de células madre. <sup>(96)</sup> En este sentido las llamadas células de la matriz del cordón umbilical (UCMC), tienen características similares y propiedades inmunes lo que demuestran ser una fuente adecuada de CMM con ventajas prácticas. <sup>(95)</sup>

Ana María Balic y colaboradores en el 2010, proponen que la pulpa dental de los terceros molares erupcionados contiene una pequeña población de células multipotentes, mientras que la pulpa dental de los terceros molares no erupcionados no contiene células multipotentes, pero está enriquecida en progenitores osteodentinogénicos que participan en la formación de odontoblastos coronales y radiculares. <sup>(97)</sup>

Las células que dominan las investigaciones más extensas en biología y medicina experimental son las CMM. <sup>(30)</sup> Los estudios de CMM han progresado rápidamente desde el informe inicial del aislamiento de las CMM humanas. Estas células exhiben considerable promesa de aplicación en la reconstrucción de tejidos mesenquimales descritas por Chen y colaboradores en el 2008; Parekkadan y Milwid en el 2010 y Savkovic y colaboradores en el 2014. <sup>(69)</sup> Hasta ahora, la mayoría de los estudios de CMM se han centrado en la actividad del genoma nuclear; características de las actividades mitocondriales se han retrasado en gran medida detrás. Las mitocondrias son orgánulos esenciales en el interior de las células eucariotas que son responsables de la producción de ATP. Curiosamente, varios estudios han demostrado variaciones en la abundancia, morfología y funciones de mitocondrias en diferentes tipos de células que se adaptan a señales ambientales y celulares (Collu-Marchese et al., 2015; Forni et al., 2016; Zhang et al., 2013).

En el 2019 Gancheva, M. R. y colaboradores, postulan una alternativa prometedora para el tratamiento del accidente cerebrovascular y enfermedades neurológicas que en la actualidad no cuentan con agente farmacéutico o biológico clínicamente probado para mejorar la discapacidad neurológica, esta alternativa se basa en terapia celular utilizando hDPSC, que actúan a través de mecanismos celulares y moleculares, lo que los hacen candidatos prometedores por su origen más cercano al linaje neuronal, para la reprogramación y modificación hacia un tallo neural o célula progenitora.<sup>(50)</sup>

Los mecanismos y funciones moleculares del proceso de diferenciación de los hDPSC se ven afectadas por los factores de crecimiento y andamios. En 2020, Takeo W Tsutsui, realizó un análisis del metabolismo de DPSC en presencia de los factores de crecimiento y los andamios. Tal análisis concluye que el metabolismo es importante porque las mitocondrias son los principales orgánulos que producen la energía no solo para el mantenimiento de la homeostasis, sino también durante la diferenciación.<sup>(98)</sup>

# CAPÍTULO 2

## 10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades degenerativas son la principal causa de muerte en todo el mundo y, debido a la falta de fármacos innovadores y varios límites para el trasplante de órganos, las nuevas soluciones rentables para tratar los órganos dañados son una necesidad primordial. Las terapias basadas en células madre para regenerar células, tejidos u órganos humanos restableciendo la función normal del cuerpo, han provocado el interés de los investigadores, para su uso deben contar con el suministro suficiente de células madre, convirtiéndose en un factor crítico e importante. La localización anatómica de las fuentes tradicionales de CM deriva problemáticas en costo y accesibilidad limitando su obtención. Por otra parte, el avance tecnológico se ha visto limitado por la falta de protocolos estandarizados para aislar, cultivar, caracterizar y criopreservar las células madre. La ENES Unidad León de la UNAM, realiza varios estudios de investigación con células madre; pese a ello no cuenta con un manual para la obtención, aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de hDPSCs. El problema a solucionar radica en la realización de un manual de laboratorio que cuente con un método estandarizado y eficaz para aislar, cultivar, caracterizar y criopreservar hDPSCs de terceros molares, para sentar precedentes en la ENES Unidad León de la UNAM en investigaciones futuras.

Como respuesta a la problemática prevalente es posible generar la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible estandarizar los protocolos de aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de hDPSCs de terceros molares, que sirva como base para establecer líneas de investigación en la ENES Unidad León de la UNAM, de terapias regenerativas e ingeniería tisular?

## 11 JUSTIFICACIÓN

Las hDPSCs tienen gran potencial clínico debido a su capacidad de diferenciación, gracias a su localización anatómica son de fácil acceso y de bajo costo, además pueden ser criopreservadas conservando su capacidad proliferativa y potencial de desarrollo *in vitro* y lo que es más importante su capacidad multipotente. Por otra parte, es beneficioso estandarizar protocolos para la obtención, aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de las hDPSCs de terceros molares, que pueden ser aplicables a otras regiones orales y replicables para su uso en el desarrollo e investigación de nuevos tratamientos clínicos regenerativos, permitiendo realizar cultivos celulares que abrirán el panorama a nuevas investigaciones en la ENES Unidad León de la UNAM.

## 12 OBJETIVO GENERAL

Aislar, cultivar, caracterizar y criopreservar hDPSCs derivadas de terceros molares y estandarizar los diferentes protocolos para la realización de un manual de prácticas de laboratorio.

## 13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtención de la muestra de terceros molares humanos
- Aislar hDPSCs de terceros molares, estableciendo cultivo primario con método de disgregación enzimática y técnica de explantes
- Realizar un cultivo secundario (subcultivo) de hDPSC
- Proliferación celular identificando el medio de cultivo que propicia mejores condiciones para hDPSCs
- Identificar la capacidad de diferenciación a linajes células (Osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis) de las hDPSCs
- Caracterizar por Inmunotipificación las hDPSC mediante Inmunofluorescencia y Citometría de flujo.
- Almacenar en stock las hDPSC aisladas para su futuro uso en proyectos de investigación o terapias celulares



## 11 HIPÓTESIS

Es posible estandarizar protocolos de aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de hDPSCs de terceros molares para su uso e investigación en el área de ingeniería tisular y medicina regenerativa en la ENES Unidad León de la UNAM.

# CAPÍTULO 3

## 14 MARCO METODOLÓGICO

### **Tipo de estudio**

Experimental *in vitro*

### **Diseño de estudio**

Experimental puro, prospectivo y comparativo

### **Universo de estudio**

Terceros molares de humanos adultos jóvenes (18-30 años), extraídos en la clínica de la ENES Unidad León

### **Método de muestreo**

No probabilístico

### **Tamaño de muestra**

Terceros molares humanos

### **Criterios de inclusión**

- Paciente de 18-30 años de edad que acuda a clínica de odontología de la ENES Unidad León de la UNAM
- Pacientes con terceros molares permanente retenidos o erupcionados indicados para odontectomía
- Dientes sin evidencia clínica o radiográfica de presencia de infección
- Pacientes sin enfermedades sistémicas
- Pacientes sin toxicomanías

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes con patología pulpar y periapical
- Dientes impactados
- Dientes con reabsorción

### **Criterios de eliminación**

- Dientes que entren en contacto con otra superficie antes de ser depositadas en la solución transportadora

## 14.1 Variables de estudio

### Variables dependientes

**Tabla 5** Variantes dependientes del muestreo

Variable	Definición	Definición operacional	Tipo	Escala y unidad de medición
Viabilidad celular	Mide la proporción de células vivas luego del procedimiento. <sup>(66)</sup>	Número de células adheridas vivas resultantes del cultivo celular junto con los andamios. Se determinaron por conteo con hematócrito.	Cuantitativa	De razón 0-n células/ml
Morfología celular	Disciplina encargada del estudio de la forma y estructura de una célula. <sup>(99)</sup>	El fibroblasto sintetiza colágeno y glucosaminoglucanos de la matriz extracelular (MEC). Migran y proliferan durante la cicatrización de heridas.	Cualitativa	a)Fibroblastoide b)Otra característica

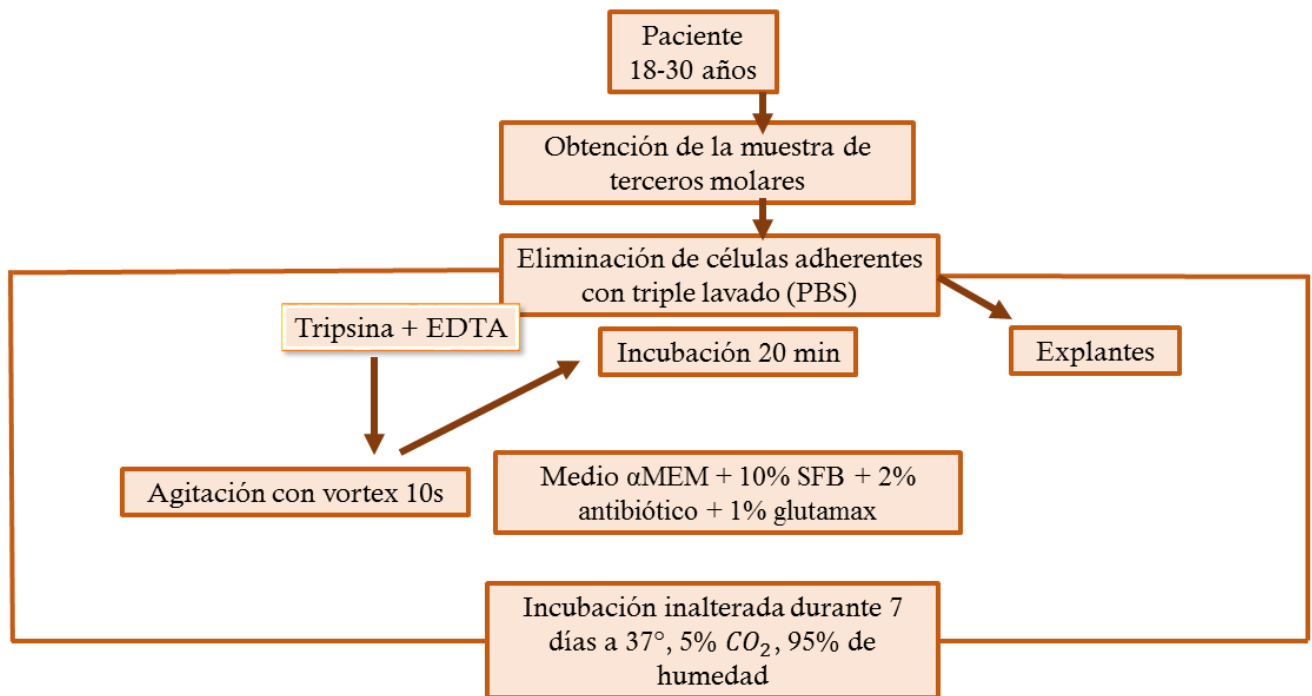
### Variables independientes

**Tabla 6** Variantes independientes del muestreo.

Variable	Definición	Definición operacional	Tipo de variable	Escala y unidad de medición
Tiempo de incubación	Magnitud física que permite ordenar la secuencia de los sucesos. <sup>(99)</sup>	Las células madre fueron subcultivadas en platos de 24 pocillos junto con los andamios durante 24 horas para conocer su efecto citotóxico, mientras que la proliferación celular fue determinada a las 24, 48, 72 y 96 hrs	Cuantitativa	De razón 0-96 hrs
Tipo de medio de cultivo	Mezcla de nutrientes, en concentraciones adecuadas y condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. <sup>(75)</sup>	Identificar el medio que permita el mejor crecimiento de las células:  1. Alpha MEM 2. DMEM 3. 5A McCoy	Cualitativa nominal	1- Alpha MEM 2- DMEM 3- 5A McCoy

<p><b>Plasticidad celular</b></p>	<p>Capacidad que poseen las células madre de un tejido para producir tipos celulares diferenciados de otro órgano o tejido.<sup>(69)</sup></p>	<p>Capacidad de células madre de la pulpa dental humana de diferenciarse en los siguientes linajes celulares:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Osteocitos: Son células planas en forma de almendra con núcleos densos, pequeño RER y AG, con prolongaciones citoplasmáticas con uniones comunicantes (gaps) que permiten el flujo de hormonas y de iones entre sí.</li> <li>• Condrocitos: Son las células más abundantes del cartílago. Suelen mostrar varias formas. Las más jóvenes son elípticas u ovaladas; esféricas o poligonales.</li> <li>• Adipocitos: forma esférica, pero se vuelven poliédricas cuando constituyen los lobulillos. La gran gota de grasa ocupa la mayor parte del volumen de la célula. Su presencia desplaza a todos los componentes del citoplasma hacia la periferia, incluido el núcleo.</li> </ul>	<p>Cualitativa nominal</p>	<p>1- Positivo 2- Negativo</p>
<p><b>Inmuno-tipificación</b></p>	<p>Proceso en el que se usan anticuerpos para identificar células según el tipo de antígenos o marcadores en su superficie.<sup>(10,11)</sup></p>	<p>Se utilizarán los anticuerpos positivos: (<math>\geq 95\%</math>): CD105, 73,90</p> <p>Anticuerpos negativos:(<math>\leq 2\%</math>): CD45, 34, 14 o 11b, 19 y HLA-DR</p>	<p>Mixta</p>	<p>cualitativa: positivo/negativo a cada uno de los antígenos</p> <p>Cuantitativa: número de células positivas/negativas</p>

## 14.2 Diseño experimental



**Figura 12** Metodología resumida para el establecimiento de cultivos primarios. *Fuente:* Directa

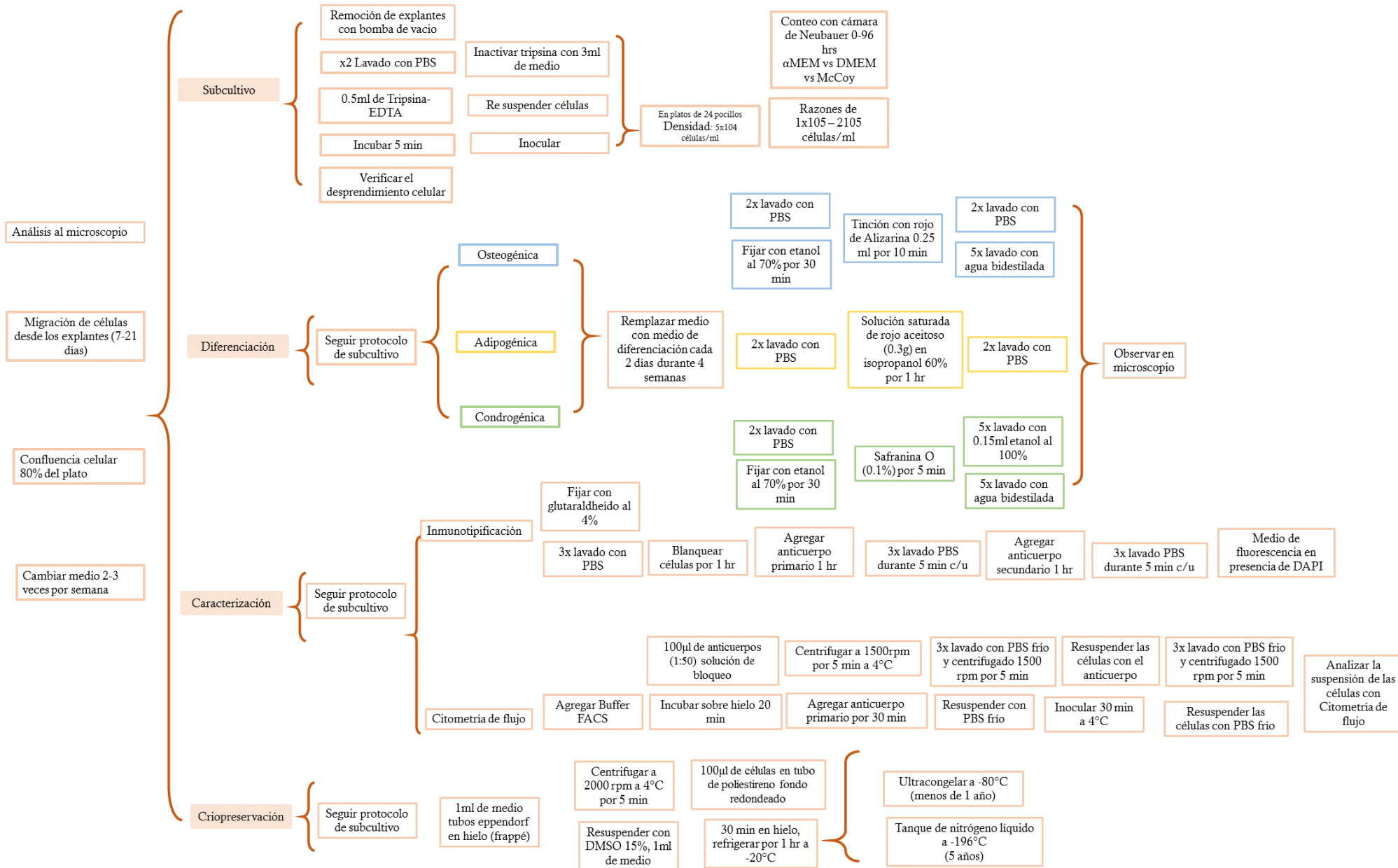


Figura 13 Metodología para subcultivo, diferenciación, caracterización y criopreservación Fuente: Directa

## 15 MATERIALES Y MÉTODO

### **Materiales**

#### **Equipo**

Campana de flujo laminar horizontal (Lumistell MR LH-120, Celaya, Guanajuato, México), Microscopio de contraste de fases (Leica Axio Camp MRc, Wetzlar, Alemania), Centrifugadora (Beckman®, J2-MC, Indianápolis, EUA), Incubadora (Binder®, Tuttlingen, Alemania), Ultracongelador (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), Cámara de Neubauer (Bioeco®, Alemania), citómetro de flujo.

#### **Instrumental**

Micro pipetas (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), cajas de cultivo de 10 cm y 6 cm (Thermo Scientific Rochester, NY, EUA), placas de cultivo de 96  $\mu$ pocillos (Thermo Scientific Rochester, NY, EUA), filtradores celulares Falcon® (40 $\mu$ m) (Corning, NY, USA), Pipetas serológicas, Micromotro, Bomba al vacio, Tanque para Nitrógeno líquido, Tanque de CO<sub>2</sub>, Baño María, Hoja de bisturí no. 20, Pinzas de disección, Portaobjetos de vidrio, Mango de bisturí, Disco de diamante, Espátula 7A o elevador recto, Pipetas volumétricas de 10 ml descartables estériles, Puntas para micropipeta, Tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, Cajas Petri de 10-cm y 6-cm, tubos de prolipropileno.

#### **Insumos**

Buffer de fosfato (PBS, pH 7.4), Suero fetal bovino (SFB) (Gibco® by Life Technologies Corporation, Gran Island, NY, EUA) al 10%, Tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco® by Life Technologies Corporation, Gran Island, NY, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® by Life Technologies Corporation, Gran Island, NY, EUA),  $\alpha$ MEM, McCoy, Penicilina/Estreptomina 10,000 UI/ml y 10,000 $\mu$ g/ml Antimicótico Anfotericina B (Gibco® by Life Technologies Corporation, Gran Island, NY, EUA), Glutamax (Gibco® by Life Technologies Corporation, Gran Island, NY, EUA), Dexametasona, B-Glicerolfosfato, Ascorbato-2fosfato, isopropanol al 60%, Agua destilada, Rojo aceitoso O, Rojo de Alizarina, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato monosódico), Etanol 70% v/v, Anticuerpos positivos (CD105, CD73, CD90, STRO-1), Anticuerpos negativos (CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, HLA clase II), Insulina, Agua bidestilada, Proteína morfognpetica ósea (BMP-1 o 4), Safranina O, solución de bloqueo (Albumina, bovina al 1% o SFB al 5% en PBS), Buffer de tinción.



## 16 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

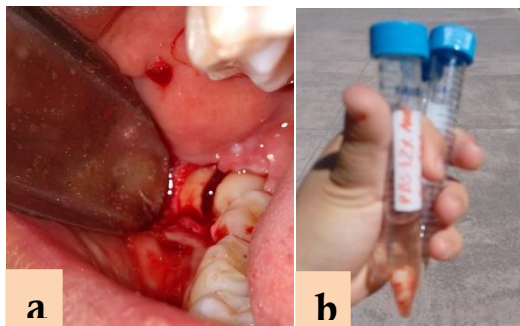
### Obtención, aislamiento y cultivo primario de hDPSC

#### Preparación del medio de transporte:

Se tomó del almacenamiento a 4°C solución PBS con pH 7.3 y se colocó en tubos falcon de 15 ml más 1% de antibiótico y se almaceno a 4°C hasta el día de la obtención de la muestra.

#### Obtención de terceros molares:

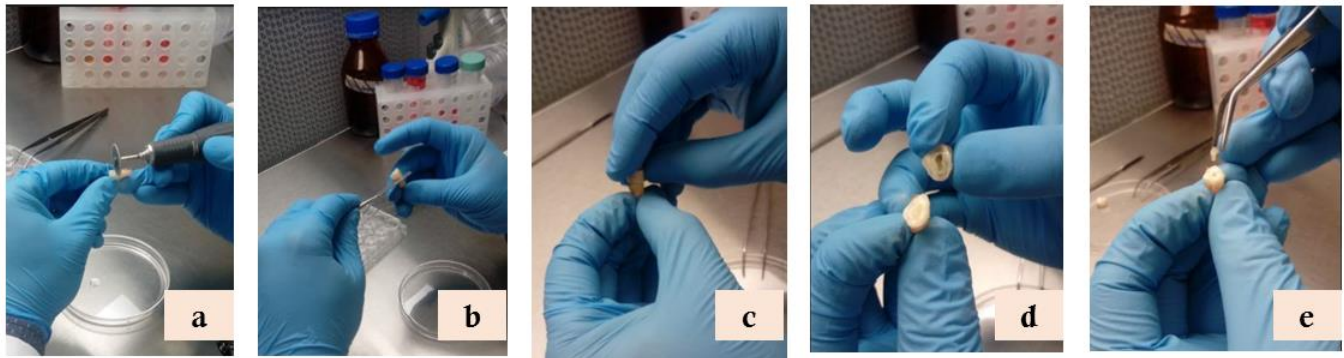
1. Bajo previo consentimiento del paciente y bajo anestesia local, se realiza odontectomía quirúrgica de los terceros molares, en casos necesarios se utilizó incisiones y osteotomías conservadoras para facilitar la extracción del diente. Se recomienda utilizar solución desinfectante en la zona de la extracción como puede ser: Clorhexidina al 0.06% o yodopovidona.
2. El tercer molar recientemente extraído se colocó inmediatamente en la solución de transporte y se llevó al laboratorio.



**Figura 14** Secuencia de obtención de terceros molares. A) Obtención B) Traslado *Fuente:* Directa

#### Obtención del tejido pulpar:

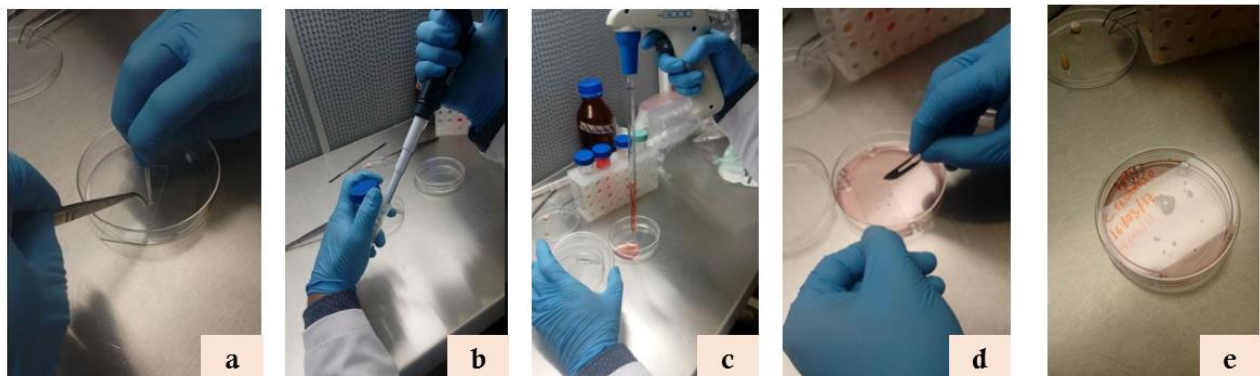
1. Se desinfectó la campana de flujo laminar con etanol al 70% y se expuso durante 10 minutos a irradiación ultravioleta (UV).
2. Se lavó el diente tres veces con PBS removiendo los restos de tejido hematopoyético en frascos de cultivo Falcon® 12.5 cm<sup>2</sup>
3. Se realizó un corte transversal a nivel de la corona anatómica o en la línea cervical con un disco de diamante a baja velocidad y con refrigeración para separar la corona de la raíz. El corte no debió tocar la cámara pulpar.
4. Procedimos a fracturar la corona de la raíz con una espátula 7A o un elevador recto.
5. Con mucho cuidado se retiró la pulpa cameral y radicular con las pinzas de disección.



**Figura 15** Secuencia de obtención de tejido pulpar *Fuente:* Directa

Disgregación enzimática:

1. Colocamos el tejido pulpar sobre un portaobjetos de vidrio, realizamos explantes de 1x1 mm aproximadamente, con la hoja de bisturí del No 20.
2. Depositamos los explantes en tubos Eppendorf de 1.5 ml.
3. Agregamos 1 ml de tripsina al 0.05% e incubamos a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante 60 minutos; durante dicho lapso agitamos en Vortex cada 20 minutos.
4. Se inoculo en medio de cultivo α-MEM suplementado con el 20% de SFB (Sin inactivación por calor), 1% de antibiótico y 1% de glutamina, incubar a 37°C con el 5% de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda del 95% sin mover el plato durante 7 días.
5. Posterior a este periodo, realizamos la visualización de la migración de células adherentes a partir del explante a lo largo de la caja de Petri y reemplazamos el medio inicial por un volumen igual de medio fresco, prestando especial cuidado en no desalojar los explantes.
6. Tras la semana inicial y el primer cambio del medio de cultivo, se reemplazó dos veces por semana hasta que las células proliferaron alcanzando una confluencia de aproximadamente el 80% (21 días aproximadamente) en la totalidad de la superficie de la placa, se consideró que ya estaba formada la monocapa de células y el cultivo primario se había establecido.

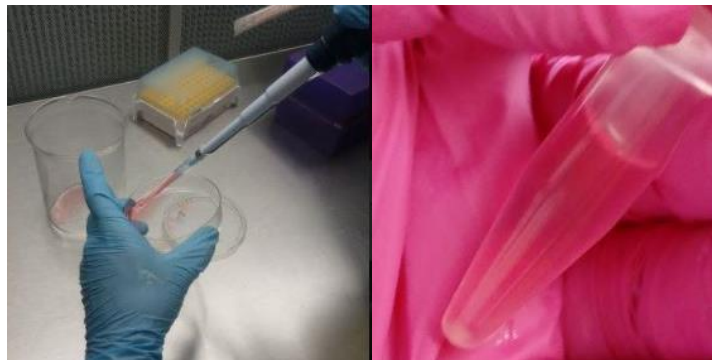


**Figura 16** Secuencia de disgregación enzimática *Fuente:* Directa

## Subcultivo y proliferación celular

### Subcultivo:

1. Retiramos el medio con bomba de vacío.
2. Se lavó dos veces con 4 ml de PBS.
3. Añadimos 0.5 ml de Tripsina-EDTA procurando que la solución cubriera todo el fondo del plato de cultivo.
4. Incubamos por un lapso de 5 minutos a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.
5. Observamos el desprendimiento bajo el microscopio, donde identificamos la presencia redondeada y altamente refractante de los cuerpos celulares flotando dispersas en grupo de células en la solución de Tripsina-EDTA.
6. Agregamos 3 ml de medio fresco para inactivar la tripsina.
7. Realizamos un pipeteado con la finalidad de conseguir la resuspensión completa de las células.
8. Se realizó el conteo celular en el hematocitómetro o cámara de Neubauer de la cantidad de células a inocular.
9. Con una micropipeta se tomó 10 µL de la muestra de las hDPSC y se pipeteó cuidadosamente en uno de los extremos del cubreobjetos evitando vaciar exceso de muestra ya que esto ocasionaría que éste quedara levantado. También evitamos la presencia de burbujas, de ser así se inició de nuevo el procedimiento.
10. Inoculamos 1 ml en razones de 1x10<sup>5</sup>-2x10<sup>5</sup> células/ml en función de los platos a subcultivar.
11. Se añadió 6-10 ml de medio de cultivo para completar el medio.
12. Colocamos los platos en la incubadora bajo las mismas condiciones iniciales que los cultivos primarios.



**Figura 17** Subcultivo de hDPSCs de terceros molares *Fuente:* Directa

### Proliferación celular:

1. Retiramos el medio de cultivo del plato.
2. Lavamos 2 veces con 4 ml de PBS
3. Añadimos 0.5 ml de Tripsina-EDTA procurando que la solución cubriera todo el fondo del plato de cultivo.
4. Incubamos por un lapso de 5 minutos a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.
5. Observamos el desprendimiento bajo el microscopio, donde identificamos presencia redondeada y altamente refractante de los cuerpos celulares flotando en la solución de Tripsina-EDTA.
6. Agregamos 3 ml de medio fresco para inactivar la tripsina.
7. Inoculamos en platos de 24 pocillos hDPSC a una densidad de 5x10<sup>4</sup> células/ml con hematocitómetro.
8. Incubamos las células por 24, 48, 72 y 96 horas.
9. A las 24 horas se realizó un conteo celular en el hematocitómetro al desprender las células con 0.1 ml de Tripsina- EDTA durante 5 minutos.
10. Tomamos 10 µL de la muestra y la colocamos en la cámara de Neubauer
11. Se observó en el microscopio.
12. Una vez enfocadas las células, esto es, se realizó el conteo en cada uno de los cuadros que son en total: L1, L2, L3, y L4.
13. Ya obtenida la cantidad de células contabilizadas en los cuatro cuadros se utilizó la siguiente fórmula para determinar la concentración celular:  $concentración = \frac{número\ de\ células}{volúmen\ en\ ml}$
14. Repetimos el procedimiento a los 48, 72 y 96 h



**Figura 18** Hematocitómetro utilizado para el conteo celular *Fuente:* Directa

## **Caracterización: Diferenciación a linajes celulares**

Los ensayos de diferenciación osteogénica, adipogénica, y condrogénica se realizaron con células con un pase celular de 4 o 5 divisiones y una confluencia del 80-100%.

1. Subcultivamos hDPSC en DMEM+10% FBS+antibióticos+l-glutamina a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml en platos de cultivo de placas de 6 pocillos e incubadas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> hasta observar una confluencia celular del 80-100%

### I) DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA:

2. Retiramos el medio de cultivo.
3. Lavamos dos veces con PBS.
4. Agregamos medio de diferenciación osteogénica con  $\alpha$ -MEM [SFB 10%, penicilina y estreptomycin (1%), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/ml)].
5. Reemplazamos el medio cada segundo día durante 4 semanas hasta que se observaron cúmulos de minerales y cristales birrefringentes al microscopio.
6. Interrumpimos la diferenciación con una tinción de rojo de Alizarina (40 mM) en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 M) y un pH de 4,3.
7. Se lavó las células dos veces con PBS.
8. Fijamos las células con etanol al 70% (v/v) por 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavamos dos veces con PBS.
10. Agregamos 0.25 ml de rojo de Alizarina por 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavamos dos veces con PBS
12. Finalmente lavamos cinco veces con agua bidestilada.
13. Observamos en microscopio e identificamos estructuras mineralizantes de apariencia rojiza

### II) DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

2. Retiramos el medio de cultivo.
3. Lavamos 2 veces con PBS.
4. Agregamos medio de diferenciación adipogénica con  $\alpha$ -MEM [SFB 10%, penicilina y estreptomycin (1%), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/ml)] adicionado con insulina y L-glutamina.
5. Reemplazamos el medio cada segundo día durante 4 semanas
6. Lavamos dos veces con PBS.
7. Agregamos medio de cultivo con una solución saturada de rojo aceitoso (0.3 g) en isopropanol 60% v/v (100ml) por 1 hora a temperatura ambiente.
8. Lavamos 2 veces con PBS.

9. Observamos bajo microscopia de contraste de fases la presencia de depósitos de lípidos en coloración rojo o naranja.

## II). DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA:

1. Subcultivamos células en platos de cultivo de placas de 6 pocillos en forma de microgota o micromasa con medio de diferenciación con  $\alpha$ -MEM [SFB 10%, penicilina y estreptomicina (1%), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2fosfato (50 mg/ml), proteína morfogenética ósea (BMP-1 o 4)] e incubamos.
2. Reemplazamos el medio cada segundo día durante 2 semanas.
3. Lavamos las células dos veces con PBS.
4. Fijamos con etanol al 70% v/v por 10 minutos.
5. Lavamos una vez con PBS
6. Agregamos 0.15 ml de safranina O (0.1%) por 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavamos cinco veces con 0.15 ml etanol al 100%.
8. Lavamos cinco veces con agua bidestilada.
9. Observamos bajo el microscopio de contraste de fases e identificar glucosaminoglicanos de apariencia azul.

## **Inmunotipificación por Inmunofluorescencia y Citometría de flujo**

1. Subcultivamos hDPSC en DMEM+10% FBS+antibióticos+l-glutamina a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml en platos de cultivo de placas de 6 pocillos e incubadas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> hasta que observamos una confluencia celular del 80-100%.

### Inmunofluorescencia:

2. Fijamos las células con glutaraldehído al 4% a temperatura ambiente.
3. Lavamos tres veces con PBS.
4. Bloqueamos las células con PBS+10% de SFB+10% de triton por una hora a temperatura ambiente.
5. Agregamos anticuerpos primarios disueltos en PBS e incubamos durante toda la noche.
6. Lavamos tres veces con PBS durante 5 minutos en cada lavado.
7. Colocamos el anticuerpo secundario disuelto en PBS por una hora a temperatura ambiente en un cuarto oscuro.
8. Lavamos tres veces con PBS durante 5 minutos en cada lavado en un cuarto oscuro.
9. Cubrimos la muestra con medio de fluorescencia en presencia de DAPI.
10. Observamos bajo microscopia de fluorescencia

### Citometría de flujo

2. Desprendimos del plato con tripsina y resuspendimos las células.
3. Agregamos Buffer FACS (PBS, 0.5–1% BSA or 5–10 % FCS, 0.1 % NaN<sub>3</sub>).
4. Agregamos 100 µl de células en tubos de poliestireno de fondo redondeado.
5. Agregamos 100 µl de anticuerpos (1:50) de bloqueo o solución de bloqueo.
6. Incubamos sobre hielo por 20 minutos.
7. Se centrifugó a 1,500 rpm por cinco minutos a 4°C.
8. Removimos el sobrenadante.
9. Agregamos 0.1–10 µg/ml del anticuerpo primario e incubar por lo menos 30 minutos a 4°C en cuarto oscuro.
10. Lavamos tres veces con PBS.
11. Se centrifugó a 1,500 rpm por cinco minutos.
12. Resuspendimos con 200 µl de PBS frío.
13. Diluimos el anticuerpo secundario siguiendo las indicaciones del fabricante.
14. Resuspendimos las células con el anticuerpo.
15. Incubamos durante 30 min a 4°C en un cuarto oscuro.
16. Lavamos tres veces con PBS.
17. Se centrifugó a 1,500 rpm por 5 minutos.
18. Resuspendimos con 200 µl de PBS frío.
19. Analizamos la suspensión de células en citometría de flujo lo antes posibles.

### **Criopreservación**

Una vez que el subcultivo se encuentre en una confluencia entre el 80-100% es indispensable criopreservar las células en stock.

1. Retiramos el medio de cultivo por aspiración con bomba de vacío.
2. Lavamos las células tres veces con PBS.
3. Agregamos 1 ml de tripsina 0.05%, 1ml de tripsina-0.025% EDTA e incubamos durante 5 min a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.
4. Comprobamos el desprendimiento celular con microscopio observando a las células circulando libremente en la caja de cultivo.
5. Retiramos el plato y resuspendimos el medio (La cantidad de medio de cultivo depende del número de cuitubos a preservar).
6. Transportamos 1 ml de DMEM que contenía las células a tubos Eppendorf en hielo frappé.
7. Centrifugamos durante 5 min a 2000 rpm a 4°C
8. Retiramos el medio por decantación o aspiración con bomba de vacío.
9. Agregamos 1 ml solución criopreservadora DMEM+10% de SFB +15% Dimetil sulfóxido o el total de soluciones criopreservantes (Freezing culture medium, Gibco).

10. Resuspendimos usando la micropipeta.
11. Contamos el número de células a criopreservar.
12. Etiquetamos los tubos con las siguientes características: Número de pasaje celular, y total de células, registramos la fecha e identificación del origen del cultivo en stock.
13. Colocamos los tubos en hielo frappé durante 30 min a 4°C.
14. Transportamos al refrigerador de -20°C durante 1 hora.
15. Ultracongelamos a -80°C, el tiempo de almacenamiento en stock es no mayor a 1 año.
16. Criopreservamos en tanque de nitrógeno líquido a -196°C, el stock en este tanque puede ser superior a 5 años.



# CAPÍTULO 4

## 17 RESULTADOS

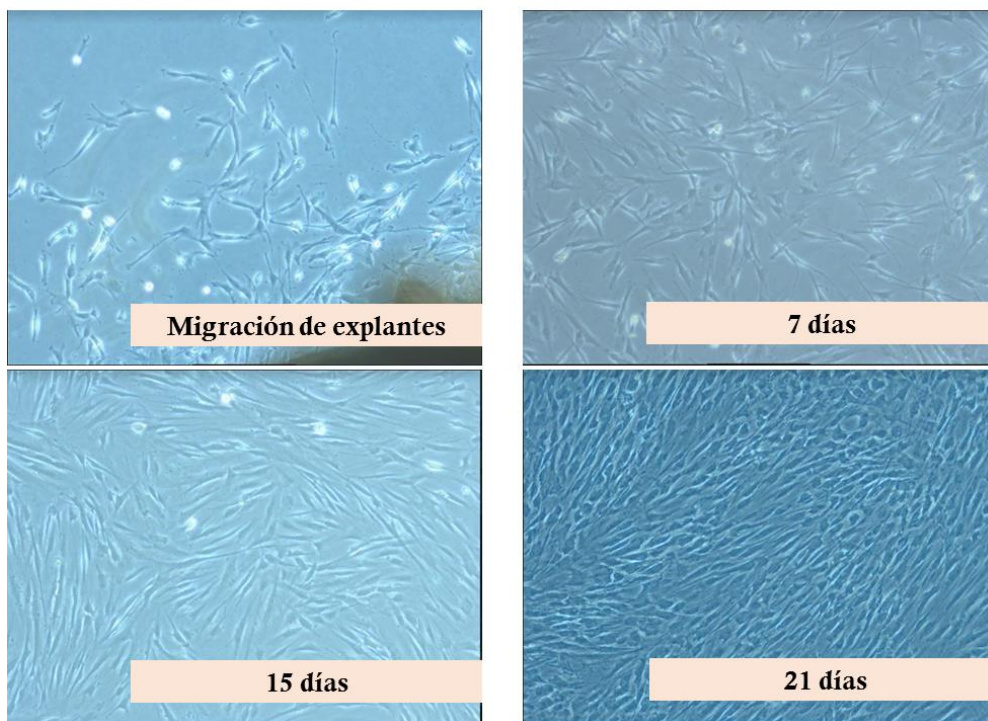
### Aislamiento y proliferación celular

Se puede observar que en las células obtenidas a partir de los explantes procedentes de la pulpa dental del tercer molar, la cantidad de células cultivadas aumenta a medida que aumenta el tiempo de incubación. Presentan un crecimiento activo con el método de disgregación enzimática en donde la densidad celular inicial es mayor. Bajo microscopía óptica, se observó, tal como se esperaba, que las células emigraron desde la superficie de los explantes.

A los 7 días posteriores observamos células dispersas adheridas al fondo del plato mostrando una morfología característica fibroblastoide con contorno fusiforme, con uno o dos núcleos centrales ovalados o elípticos y proyecciones fibroblásticas en toda la superficie de la célula.

A los 15 días, observamos conexiones a través de las prolongaciones fibroblásticas de la superficie celular.

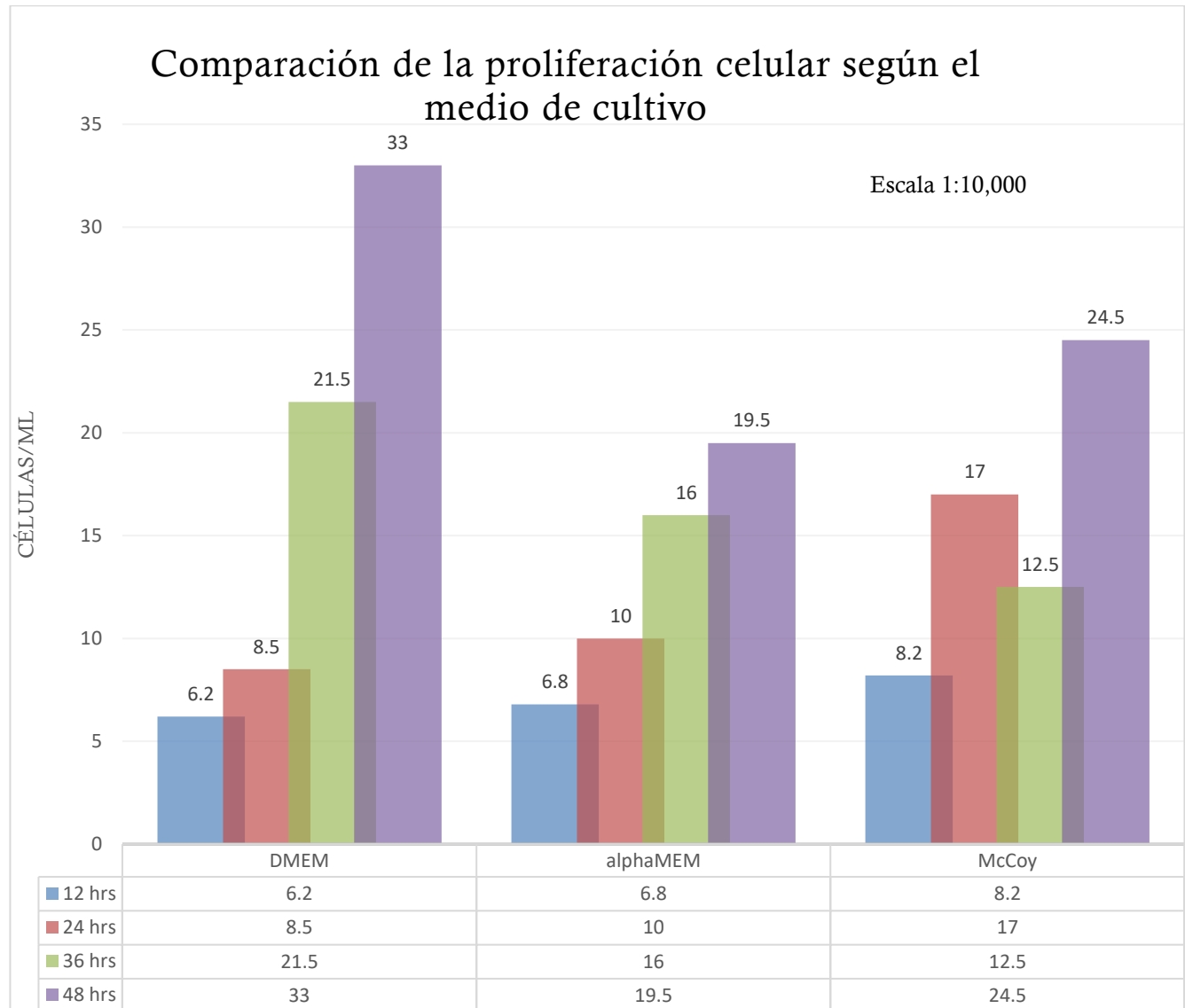
A los 21 días se observó una alta confluencia celular y un cambio en la morfología de dichas células, adquiriendo una forma más redondeada y con disminución de proyecciones fibroblásticas, debido a la confluencia observada del 80-90% del plato. En este periodo se pudo observar también una tendencia a mantener las conexiones entre ellas y seguir una orientación en una misma dirección.



**Figura 19** Microfotografías de tiempo de incubación *Fuente:* Directa

### Comparación de la proliferación celular según el medio de cultivo

Los datos de proliferación celular mostraron una distribución normal y un crecimiento exponencial con diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el tipo de medio de cultivo utilizado. El medio DMEM obtuvo la mayor proliferación celular al concluir las 48 hrs (p=33,000 células/ml) en comparación con el medio  $\alpha$ MEM (p=19,500 células/ml) y McCoy (p=24,500 células/ml).

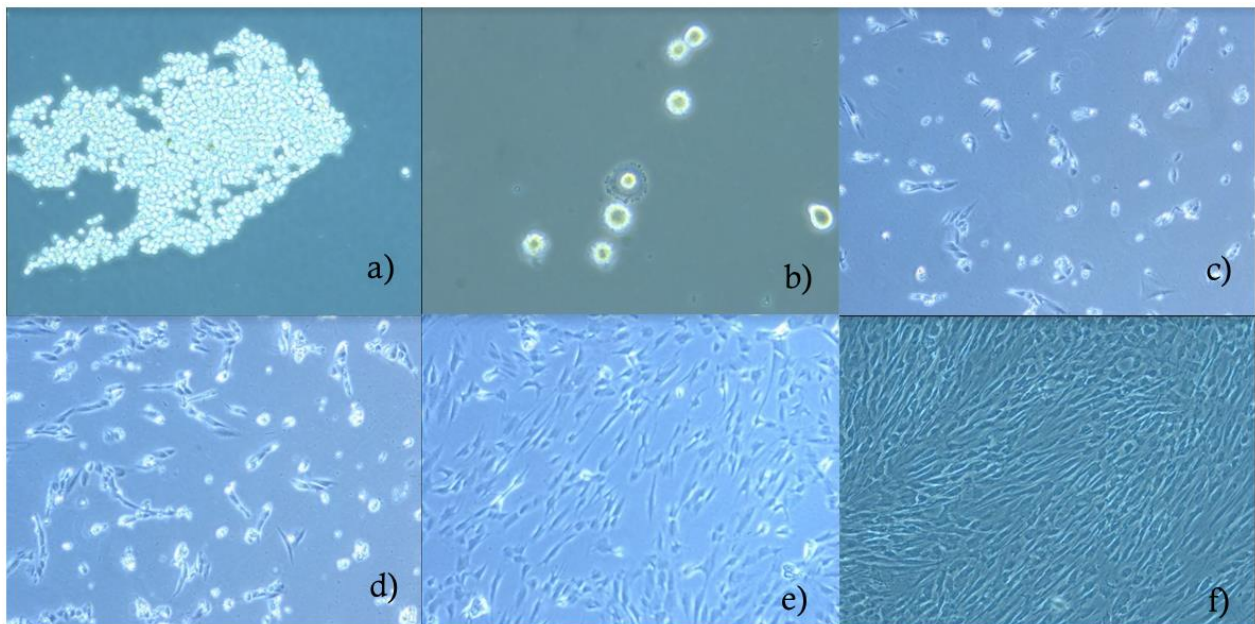


**Gráfico 1** Proliferación exponencial en conteo con hematocitómetro en medios DMEM,  $\alpha$ MEM y McCoy.  
*Fuente:* Directa

### Adhesión celular focal

Los explantes deben permanecer inalterados al menos durante 7 días para lograr el establecimiento de los cultivos, de no ser así al desplazar el plato repetidamente imposibilita la adhesión celular en el fondo del plato de cultivo.

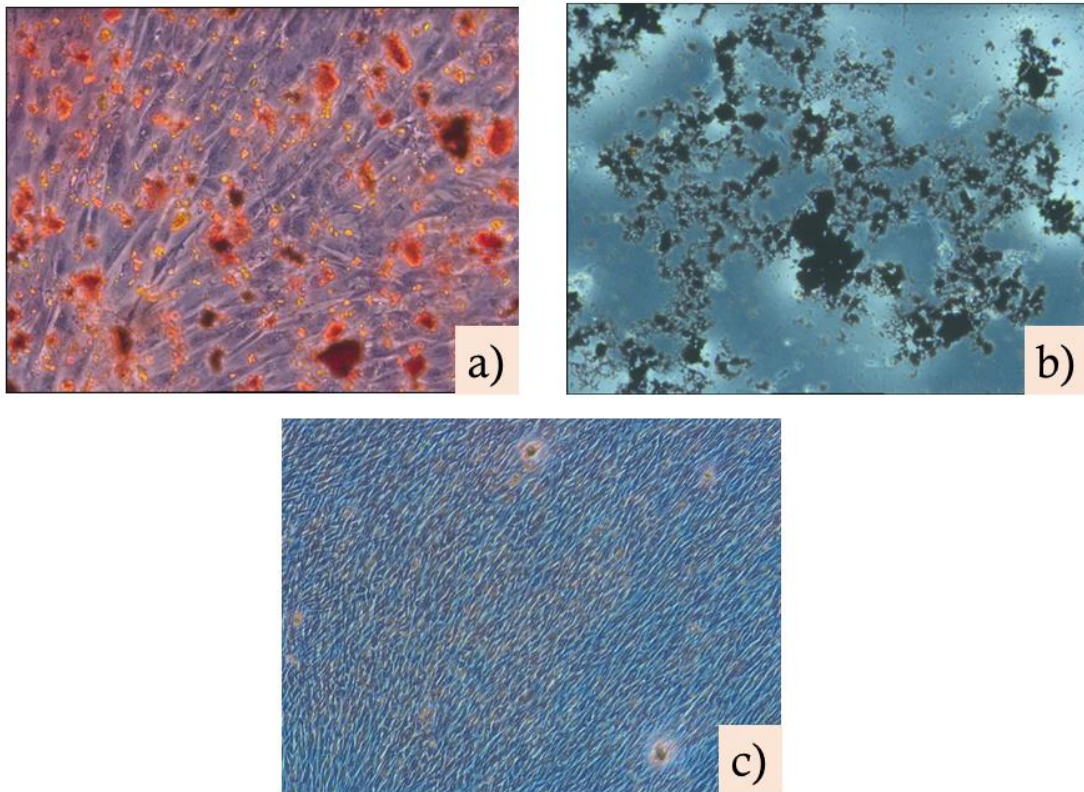
Al realizar los subcultivos celulares, se observó una adecuada adhesión al fondo del plato a las 24 horas del monitoreo, lo cual evidenció la respuesta favorable a las condiciones nutricionales implementadas, logrando una proliferación exponencial en un lapso de 2-3 días



**Figura 20** Seguimiento de adhesión celular focal del subcultivo a) Tepsinización b) aspecto a 1 hora c) 6 horas d) 8 horas e) 12 horas y f) 24 horas. **Fuente:** Directa

### Diferenciación celular: Osteogénica, Adipogénica y Condrogénica

Los explantes fueron expuestos a agentes adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos específicos, respectivamente. En la diferenciación Osteogénica las células expresaron fosfatasa alcalina en medio osteogénico y observamos bajo microscopia de contraste de fases la presencia de estructuras mineralizantes de apariencia rojiza, debido a la tinción de rojo de Alizarina. Para la diferenciación Adipogénica se detectaron gotas de lípidos gracias a la solución saturada de rojo aceitoso. Finalmente, en la diferenciación Condrogénica los condrocitos fueron detectados por tinción con Safranina O, que tiñe la matriz secretada por estas células.



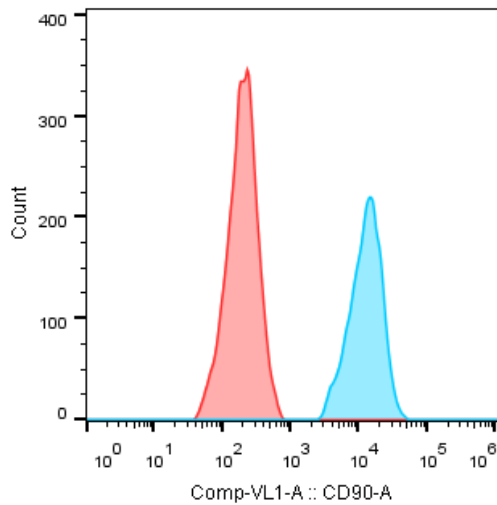
**Figura 21** Diferenciación celular a) Osteogénica, b) Adipogénica y c) Condrogénica *Fuente:* Directa



### Inmunotipificación por Inmunofluorescencia y Citometría de flujo

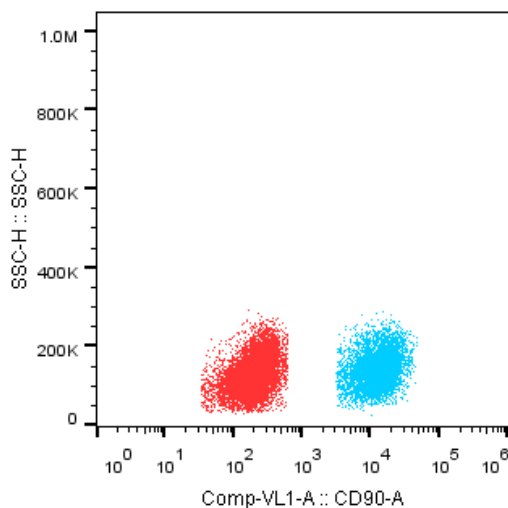
Las hDPSCs cultivadas procedentes de terceros molares en el linaje 3, expresaron: 58.1 % de células CD90+/CD105+ (doblemente positivas para estos anticuerpos), con 0.38% de células CD105+ que expresan la molécula CD90- (CD105+/CD90-) y hasta el 11.5% de células CD105-/CD90- (doblemente negativas para ambos anticuerpos) y 30.1% de células CD105- que expresan la molécula CD90+ (CD105-/ CD90+).

**A**



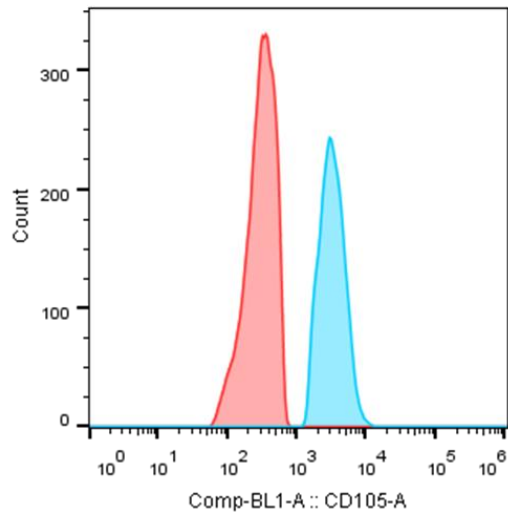
	Nombre de la muestra	Nombre del subconjunto	Conteo
<span style="color: blue;">■</span>	Grupo_HPC3-1++,fos	CD90+	5266
<span style="color: red;">■</span>	Grupo_autofluor.fos	CD90-	7884

**B**



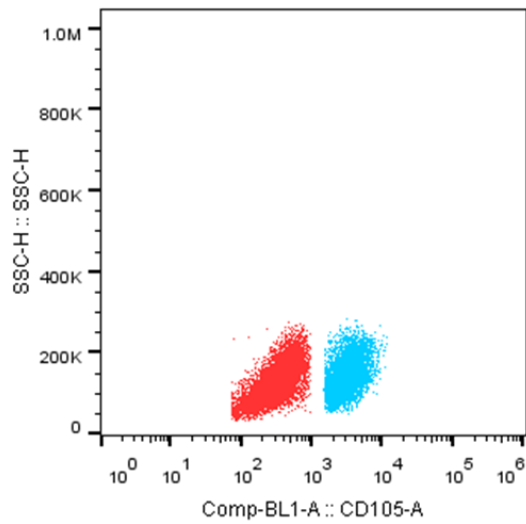
	Nombre de la muestra	Nombre del subconjunto	Conteo
<span style="color: blue;">■</span>	Grupo_HPC3-1++,fos	CD90+	5266
<span style="color: red;">■</span>	Grupo_autofluor.fos	CD90	7983

**C**

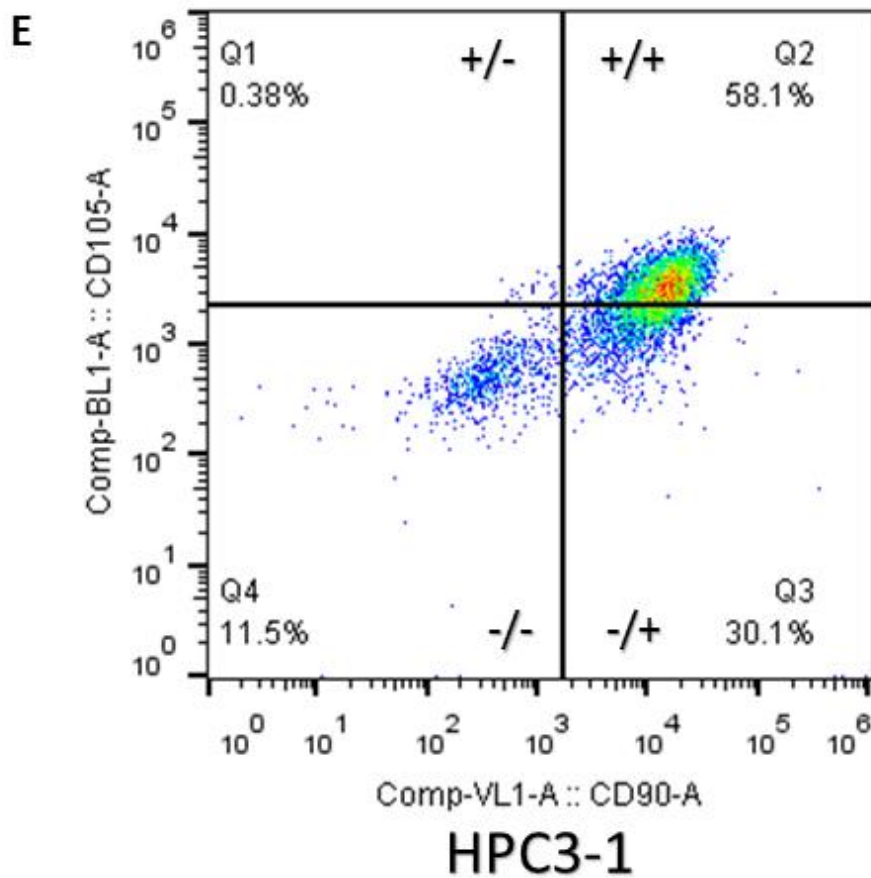


	Nombre de la muestra	Nombre del subconjunto	Conteo
<span style="color: cyan;">■</span>	Grupo_HPC3-1++,fos	CD105+	4867
<span style="color: red;">■</span>	Grupo_autofluor.fos	CD105-	7236

**D**



	Nombre de la muestra	Nombre del subconjunto	Conteo
<span style="color: cyan;">■</span>	Grupo_HPC3-1++,fos	CD105+	4867
<span style="color: red;">■</span>	Grupo_autofluor.fos	CD105	7830



**Figura 22** Análisis de citometría de flujo de células de paciente, denominadas hPC3-1 (pasaje 3). *A, B*) Población de células marcadas con el anticuerpo Anti- CD90. *C, D*) Población de células marcadas con el anticuerpo anti CD105. En color naranja la población de células negativas (autofluorescencia), en color azuis células positivas. *E*) Población de células dobles positivas a CD105 y CD90, correspondiente al 58.1%. Anticuerpo utilizado Anti-human-CD90 superbright 436 y Anti human-CD105 Alexa Fluor. **Fuente:** Directa



## 18 DISCUSIÓN

A través del tiempo el aislamiento y cultivo de células madre a partir de tejidos dentales demostraron ser un pilar de gran importancia en ingeniería tisular y medicina regenerativa.<sup>(1)</sup> Desde la década de los 2000s, Gronthos y colaboradores, reportaron por primera vez la obtención de hDPSCs, a partir de esos resultados se han estudiado diferentes fuentes de obtención de células madre a partir de tejidos dentales.<sup>(35)</sup> Sin embargo, el avance tecnológico se ha visto limitado por la falta de protocolos estandarizados para aislar, cultivar, caracterizar y criopreservar las células madre. Con este fin en este trabajo se evaluaron y compararon las características de viabilidad y capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de las hDPSCs de terceros molares, para la elaboración de un manual de prácticas de laboratorio que permita a los estudiantes de la ENES Unidad León de la UNAM, tener una guía que facilite los nuevos trabajos de investigación con hDPSCs.

Friedenstein y colaboradores demostraron que las CMM crecían como focos de células, con morfología semejante a fibroblastos denominados: unidades de fibroblastos formadoras de colonias.<sup>(84)</sup> Con base en dicha característica y a su particularidad de adherirse a platos de cultivos plásticos es que en este estudio se examinaron diferentes medios de cultivo. Por lo tanto, una vez observando la adherencia al plato de cultivo se procedió a determinar cuál medio de cultivo propicia mayor proliferación celular.

Se ha podido determinar que los protocolos de aislamiento de células madre mesenquimales de tejido pulpar son altamente específicos, ya que presentan una baja contaminación con otras líneas celulares.<sup>(29)</sup> Es por esto que inclusive Boquest y colaboradores citan que uno de los métodos de validación final para determinar el éxito del aislamiento de este tipo de células es el crecimiento de células tipo fibroblasto (morfología fibroblastoide) en el cultivo, después de aplicado el protocolo de aislamiento.

Raouf y colaboradores, en el 2014 reportaron que estos cultivos tuvieron un crecimiento adecuado en medio esencial mínimo (MEM), suplementado con 20% de suero bovino fetal (FBS), a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad en la incubadora de CO<sub>2</sub>.<sup>(100)</sup> En este estudio se compararon los medios DMEM, McCoy y  $\alpha$ MEM para determinar que medio nos proporciona mayor viabilidad celular.

Lin y colaboradores, en el mismo año reportaron otro método de aislamiento en el que las células madre de la pulpa dental humana fueron extraídas de piezas dentales, se criopreservan a -196°C en tanque de nitrógeno líquido durante 24 h.<sup>(101)</sup> en comparación con las investigaciones de Gioventù y colaboradores, en el 2012 que reportaron una metodología en la que estudiaron dientes humanos enteros, que criopreservaron haciendo micro canales en el diente con la ayuda de rayo láser para ser almacenados a -80°C. Las células aisladas por este

método no mostraron cambios en cuanto a morfología, viabilidad celular y tasa de proliferación normal, así como el mantenimiento del fenotipo mesenquimal similar a los de las células aisladas de los dientes frescos no criopreservados.<sup>(102)</sup> Al comparar estos dos protocolos y observar que no existen cambios entre uno y otro, optamos por criopreservar las células obtenidas una vez aisladas.

Kohji Nagano y colaboradores, en 2008 concluyen que los biomarcadores y antígenos de superficie celular de los ESC se pueden utilizar en las DPSC para dar seguimiento de su estado en procesos de diferenciación, los cuales pueden ser visualizados por diversos métodos como la citometría de flujo, inmunofluorescencia y por complejos magnéticos activados.<sup>(103)</sup> En este estudio para la corroboración de que las células obtenidas son CMM se realizó la inmunotipificación por citometría de flujo e inmunofluorescencia.

En el año 2012 Ponnaiyan y colaboradores, reportaron que el inmunofenotipado de las DPSCs presenta una fuerte expresión de marcadores de CMM (CD73, CD90 y CD105).<sup>(104)</sup> Durante la realización de este estudio, se presentó una limitante, la disposición de algunos marcadores de CMM ya que determinados marcadores no están disponibles para exportarlos a México o el tiempo de espera pasa a ser demasiado largo. A pesar de esta limitante fue posible adquirir dos marcadores esenciales como lo reporta Ponnaiyan y colaboradores, para determinar si las células obtenidas son o no CMM, el marcador CD105 (conocido como endoglina y originalmente reconocida por el MAb SH2 y CD90 (también conocido como Thy-1). Cumpliendo al mismo tiempo con los otros criterios mínimos para definir las CMM humana propuestos por *Society for Cellular Therapy*.<sup>(11)</sup>

Federica Di Scipio y col.<sup>(51)</sup> reportan que las hDPSCs son capaces de diferenciarse tanto en mesenquimales como en linajes no mesenquimales in vitro. Proporcionando un método para la diferenciación neuroglial, la cual se puede realizar en futuras investigaciones abriendo las puertas a nuevas propuestas de terapias celulares para diversas enfermedades neurodegenerativas.

Mohammed Bakkar y colaboradores en 2017, proponen un método que se puede adaptar a cualquier laboratorio con una configuración general para experimentos de cultivo celular.<sup>(51)</sup> El cual contribuyo a ser nuestra guía base para la realización del manual de prácticas del laboratorio ya que nos permitió adaptar el método propuesto con reactivos que no se consiguen en México con los que son de fácil acceso proponiendo un método que sea reproducible y viable para los estudiantes de la ENES Unidad León de la UNAM.

Respecto a nuestra hipótesis podemos señalar que esta sí se cumple. De acuerdo con los resultados fue posible aislar, cultivar, caracterizar y criopreservar hDPSCs de terceros molares en la ENES Unidad León de la UNAM, utilizando métodos previamente reportados, con lo

cual nos permitió adaptar cada procedimiento a las condiciones presentes en México, postulando con ello un manual de prácticas de laboratorio para fomentar el interés e investigación de posibles usos de las hDPSCs.

### **Perspectivas a futuro**

De acuerdo con Paul T. Sharpe, independientemente de la aplicación específica, las terapias dentales basadas en CMM deben superar obstáculos importantes para garantizar el control de calidad y eficacia en la clínica, como la movilización *in vivo* adecuada y selección del origen celular para terapias *ex vivo*. De esa manera, se puede considerar que las terapias basadas en CMM todavía están en su infancia y se requiere mucha más investigación.<sup>(7)</sup> Se espera que a partir de este estudio comiencen las investigaciones in vivo en la ENES Unidad León de la UNAM, que contribuyan al avance de las terapias celulares.

Dos grupos independientes liderados por Shinya Yamanaka y James Thomson informaron que lograron generar células iPS a partir de células somáticas humanas.<sup>(24)</sup> Estos resultados nos da apertura a nuevas oportunidades en el uso de CMM, pasando de obtener CMM multipotentes a CMM pluripotentes aumentando las investigaciones y disminuyendo el uso de ESC evitando así el conflicto ético que conlleva su obtención.

Se espera que el uso del manual de prácticas de laboratorio publicado a partir de este estudio permita nuevas investigaciones. Actualmente el equipo de investigación está trabajando en Impresión 3D de andamios a base de Ácido Poliláctico (PLA) y sus efectos en cultivo con células madre dentales, con excelentes resultados.

### **Relevancia clínica**

Las células madre de la pulpa dental pueden parecer una opción a priori para la regeneración de la pulpa dental.<sup>(105)</sup>

La pulpa dental, al ser un derivado ontogenético de la cresta neural, que es una población de células migratorias transitorias que surgen durante la formación del tubo neural y cuenta con la capacidad de diferenciarse en una cantidad impresionante de diferentes tipos de tejido (neuronas y glía de nervios autónomos sistema, células pigmentarias, muchos componentes del viscerocráneo, y algunas porciones del corazón) aumentando su potencial de uso e investigación en ingeniería tisular y medicina regenerativa.<sup>(106,107)</sup>

En el 2019 Gancheva, M. R. y colaboradores, postulan una alternativa prometedora para el tratamiento del accidente cerebrovascular y enfermedades neurológicas, esta alternativa se basa en terapia celular utilizando hDPSC.<sup>(50)</sup>

Actualmente, las CMM según sus propiedades inmuno moduladoras y regenerativas atraen la atención en los ensayos clínicos de enfermedades que no cuentan con un adecuado tratamiento. Estudios recientes consideran a las CMM un nuevo enfoque para mejorar la inmunología del paciente con COVID-19.

Sin embargo, actualmente, no hay enfoques basados en CMM aprobados para la prevención y/o el tratamiento de pacientes con COVID-19, pero los ensayos clínicos están en curso.<sup>(108)</sup>

## 19 CONCLUSIONES

Es posible aislar y cultivar hDPSCs de terceros molares con capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica en la ENES Unidad León de la UNAM.

Las células madre obtenidas de pulpa dental y mediante el método de digestión enzimática son una alternativa promisorio para aplicaciones en investigaciones futuras en ingeniería tisular y terapia regenerativa en odontología.

Las características del medio DMEM, fueron las óptimas para lograr una mayor adhesión focal y proliferación celular a comparación de los medios  $\alpha$ MEM y McCoy.

Los datos obtenidos confirman que las células aisladas y cultivadas son CMM por la adherencia al plástico presente en condiciones de cultivo estándar, expresión para anticuerpos CD105 y CD90, demostrando por tinción de cultivo celular *in vitro* la diferenciación en osteoblastos, condroblastos y adipocitos, cumpliendo todos los criterios estándar para su caracterización.

Las células madre aisladas son capaces de resistir un proceso de criopreservación, sin afectar significativamente la viabilidad celular. Esta característica indica un potencial para futuras aplicaciones en bancos de células madre.

Es posible realizar un manual de prácticas de laboratorio para la ENES Unidad León de la UNAM para el aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de las células madre mesenquimales de la pulpa dental humana de terceros molares, para su uso y futura investigación en el área de ingeniería tisular y medicina regenerativa en odontología.

Actualmente a partir de este estudio, se impulsó el interés en las CMM dentales fomentando nuevas investigaciones con los otros elementos de la ingeniería tisular como los andamios.

Se espera que el manual de prácticas de laboratorio resultado de esta investigación el uso *in vivo* de las hDPSCs en el área de odontología de la ENES Unidad León de la UNAM.

## 20 BIBLIOGRAFÍAS

- 1 Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- 2 Kaul, H., & Ventikos, Y. (2015). On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 21(2), 203–217. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0285>
- 3 Kaul, H., & Ventikos, Y. (2015). On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 21(2), 203–217. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0285>
- 3 Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), 381–390.
- 4 Zhang, Q., Xiang, W., Yi, D. Y., Xue, B. Z., Wen, W. W., Abdelmaksoud, A., Xiong, N. X., Jiang, X. B., Zhao, H. Y., & Fu, P. (2018). Current status and potential challenges of mesenchymal stem cell-based therapy for malignant gliomas. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0977-z>
- 5 Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling : CCS*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- 6 Marrelli, M., Codispoti, B., Shelton, R. M., Scheven, B. A., Cooper, P. R., Tatullo, M., & Paduano, F. (2018). Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell Behavior. *Frontiers in physiology*, 9, 1685. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01685>
- 7 Sharpe P. T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 143(13), 2273–2280. <https://doi.org/10.1242/dev.134189>
- 8 Yoshida, S., Tomokiyo, A., Hasegawa, D., Hamano, S., Sugii, H., & Maeda, H. (2020). Insight into the Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapy. *Biology*, 9(7), 160. <https://doi.org/10.3390/biology9070160>
- 9 Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M., & Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3213–3218. <https://doi.org/10.1073/pnas.070034097>
- 10 Zhang, Q., Xiang, W., Yi, D. Y., Xue, B. Z., Wen, W. W., Abdelmaksoud, A., Xiong, N. X., Jiang, X. B., Zhao, H. Y., & Fu, P. (2018). Current status and potential challenges of mesenchymal stem cell-based therapy for malignant gliomas. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0977-z>
- 11 Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for

- defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- 12 Baksh, D., Davies, J. E., & Zandstra, P. W. (2003). Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Experimental hematology*, 31(8), 723–732. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(03\)00106-1](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(03)00106-1)
  - 13 Li, Q., Gao, Z., Chen, Y., & Guan, M. X. (2017). The role of mitochondria in osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Protein & cell*, 8(6), 439–445. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0385-7>
  - 14 Pilbauerová, N., & Suchánek, J. (2018). Cryopreservation of Dental Stem Cells. *Acta medica (Hradec Kralove)*, 61(1), 1–7. <https://doi.org/10.14712/18059694.2018.16>
  - 15 Alessandrini, M., Preynat-Seauve, O., De Bruin, K., & Pepper, M. S. (2019). Stem cell therapy for neurological disorders. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 109(8b), 70–77. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2019.v109i8b.14009>
  - 16 Khademhosseini, A., Vacanti, J. P., & Langer, R. (2009). Progress in tissue engineering. *Scientific American*, 300(5), 64–71. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0509-64>
  - 17 Wang, J., Sun, M., Liu, W., Li, Y., & Li, M. (2019). Stem Cell-Based Therapies for Liver Diseases: An Overview and Update. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 16(2), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s13770-019-00178-y>
  - 18 Christine M. Sedgley, Tatiana M. Botero. (2012). Dental Stem Cells and Their Sources. Department of Endodontology, School of Dentistry, Oregon Health and Science University. MI 48108-1078, USA.
  - 19 Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100:143–55
  - 20 Sen S. (2019). Adult Stem Cells: Beyond Regenerative Tool, More as a Bio-Marker in Obesity and Diabetes. *Diabetes & metabolism journal*, 43(6), 744–751. <https://doi.org/10.4093/dmj.2019.0175>
  - 21 Bonaventura, G., Chamayou, S., Liprino, A., Guglielmino, A., Fichera, M., Caruso, M., & Barcellona, M. L. (2015). Different Tissue-Derived Stem Cells: A Comparison of Neural Differentiation Capability. *PloS one*, 10(10), e0140790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140790>
  - 22 Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, A. G. (2019). Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*, 8(8), 784. <https://doi.org/10.3390/cells8080784>
  - 23 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–7.
  - 24 Mitalipov, S., & Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 114, 185–199. [https://doi.org/10.1007/10\\_2008\\_45](https://doi.org/10.1007/10_2008_45)
  - 25 Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A.

- (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* (New York, N.Y.), 318(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- 26 Ghiri Jafari, Z., Jabery Mirzaei, F., & Ghzello Rezaei, S. (2014). Induced pluripotent stem cells generated from mesenchymal stem cells for the treatment of infertility...1st International Congress on Reproductive Ethics 3rd National Congress on Ethics & Modern Methods of Infertility Treatment, December 18th-20th, 2013. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences*, 11, 260.
- 27 Bastien, J. P., Minguy, A., Dave, V., & Roy, D. C. (2019). Cellular therapy approaches harnessing the power of the immune system for personalized cancer treatment. *Seminars in immunology*, 42, 101306. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101306>
- 28 Karimineko, S., Movassaghpour, A., Rahimzadeh, A., Talebi, M., Shamsasenjan, K., & Akbarzadeh, A. (2016). Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(3), 749–757. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1129620>
- 29 Jeon, B.-G., Jang, S.-J., Park, J.-S., Subbarao, R. B., Jeong, G.-J., Park, B.-W., & Rho, G.-J. (2015). Differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from human dental tissues into non-mesodermal lineage. *Animal Cells & Systems*, 19(5), 321
- 30 Bochon, B., Kozubska, M., Surygała, G., Witkowska, A., Kuźniewicz, R., Grzeszczak, W., & Wystrychowski, G. (2019). Mesenchymal Stem Cells-Potential Applications in Kidney Diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2462.
- 31 Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling : CCS*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- 32 Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European journal of immunology*, 36(10), 2566–2573. <https://doi.org/10.1002/eji.200636416>
- 33
- 34 Zhang, B., Yin, Y., Lai, R. C., Tan, S. S., Choo, A. B., & Lim, S. K. (2014). Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem cells and development*, 23(11), 1233–1244. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0479>
- 35 Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- 36 Yalvac, M. E., Ramazanoglu, M., Rizvanov, A. A., Sahin, F., Bayrak, O. F., Salli, U., Palotás, A., & Kose, G. T. (2010). 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*, 10(2), 105–113. <https://doi.org/10.1038/tpj.2009.40>



- 37 Shi, X., Mao, J., & Liu, Y. (2020). Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem cells translational medicine*, 9(4), 445–464. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0398>
- 38 Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* (2008) 34:166–71. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
- 39 Park JC, Kim JC, Kim YT, Choi SH, Cho KS, Im GI, et al. Acquisition of human alveolar bone-derived stromal cells using minimally irrigated implant osteotomy: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol.* (2012) 39:495–505. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01865.x>
- 40 Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* (2005) 24:155–65. doi: 10.1016/j.matbio.2004.12.004
- 41 Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y., & Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet (London, England)*, 364(9429), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
- 42 Volponi, A. A., & Sharpe, P. T. (2013). The tooth -- a treasure chest of stem cells. *British dental journal*, 215(7), 353–358. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.959>
- 43 Ramamoorthi, M., Bakkar, M., Jordan, J., & Tran, S. D. (2015). Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells in Preclinical Studies: A Systematic Review Using Modified ARRIVE and CONSORT Guidelines. *Stem cells international*, 2015, 378368. <https://doi.org/10.1155/2015/378368>
- 44 Ito, K., Yamada, Y., Nakamura, S., & Ueda, M. (2011). Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 26(5), 947–954.
- 45 Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., Hibi, H., Kadomatsu, K., Ishiguro, N., & Ueda, M. (2012). Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuroregenerative mechanisms. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 80–90. <https://doi.org/10.1172/JCI59251>
- 46 Nishino, Y., Ebisawa, K., Yamada, Y., Okabe, K., Kamei, Y., & Ueda, M. (2011). Human deciduous teeth dental pulp cells with basic fibroblast growth factor enhance wound healing of skin defect. *The Journal of craniofacial surgery*, 22(2), 438–442. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e318207b507>
- 47 Iohara, K., Zheng, L., Wake, H., Ito, M., Nabekura, J., Wakita, H., Nakamura, H., Into, T., Matsushita, K., & Nakashima, M. (2008). A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), 2408–2418. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0393>

- 48 Gandia, C., Armiñan, A., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, M. D., Sanchez-Torrijos, J., Payá, R., Mirabet, V., Carbonell-Uberos, F., Llop, M., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 26(3), 638–645. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0484>
- 49 Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. (2001) 29:532–9. doi: 10.1016/S8756-3282(01)00612-3
- 50 Gancheva, M. R., Kremer, K. L., Gronthos, S., & Koblar, S. A. (2019). Using Dental Pulp Stem Cells for Stroke Therapy. *Frontiers in neurology*, 10, 422. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00422>
- 51 Bakkar, M., Liu, Y., Fang, D., Stegen, C., Su, X., Ramamoorthi, M., Lin, L. C., Kawasaki, T., Makhoul, N., Pham, H., Sumita, Y., & Tran, S. D. (2017). A Simplified and Systematic Method to Isolate, Culture, and Characterize Multiple Types of Human Dental Stem Cells from a Single Tooth. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1553, 191–207. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6756-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6756-8_15)
- 52 Karp G. (2014) *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos*. 7ma ed, Edit MacGraww Hill, México, pp. 1-7.
- 53 Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
- 54 Atala A. (2002) *Methods of Tissue Engineering*. Houston, Texas, USA: Gulf Professional.
- 55 Saward, L., & Zahradka, P. (1997). Coronary artery smooth muscle in culture: migration of heterogeneous cell populations from vessel wall. *Molecular and cellular biochemistry*, 176(1-2), 53–59.
- 56 König, J. J., van Dongen, J. W., & Schröder, F. H. (1993). Preferential loss of abnormal prostate carcinoma cells by collagenase treatment. *Cytometry*, 14(7), 805–810. <https://doi.org/10.1002/cyto.990140713>
- 57 Salehinejad, P., Alitheen, N. B., Ali, A. M., Omar, A. R., Mohit, M., Janzamin, E., Samani, F. S., Torshizi, Z., & Nematollahi-Mahani, S. N. (2012). Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 48(2), 75–83. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9480-x>
- 58 Can, A., & Karahuseyinoglu, S. (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 25(11), 2886–2895. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0417>
- 59 Goswami, R., & Kaplan, M. H. (2011). A brief history of IL-9. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 186(6), 3283–3288. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003049>

- 60 Pawitan J. A. (2014). Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed research international*, 2014, 965849. <https://doi.org/10.1155/2014/965849>
- 61 Sriramulu, S., Banerjee, A., Di Liddo, R., Jothimani, G., Gopinath, M., Murugesan, R., Marotta, F., & Pathak, S. (2018). Concise Review on Clinical Applications of Conditioned Medium Derived from Human Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs). *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 12(3), 230–234.
- 62 Durante W. (2019). The Emerging Role of l-Glutamine in Cardiovascular Health and Disease. *Nutrients*, 11(9), 2092. <https://doi.org/10.3390/nu11092092>
- 63 Sigma Life Science., (2011-2014) Cell Culture Manual, SIGMA-ALDRICH, 123-307
- 64 Dimarakis, I., & Levicar, N. (2006). Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(5), 1407–1408. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0577>
- 65 Perlman D. (1979). Use of antibiotics in cell culture media. *Methods in enzymology*, 58, 110–116. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(79\)58128-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(79)58128-2)
- 66 Sprio, A. E., Di Scipio, F., Raimondo, S., Salamone, P., Pagliari, F., Pagliari, S., Folino, A., Forte, G., Geuna, S., Di Nardo, P., & Berta, G. N. (2012). Self-renewal and multipotency coexist in a long-term cultured adult rat dental pulp stem cell line: an exception to the rule?. *Stem cells and development*, 21(18), 3278–3288. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0141>
- 67 Angeleri, Anabela, & Ariagno, Julia, & Sardi, Melba, & Carbia, Claudio, & Palaoro, Luis, & Rocher, Adriana (2017). Comparación del recuento celular entre un método manual y un contador automatizado en líquidos de derrame. *Acta Bioquímica Clínica*
- 68 Zimmermann, M., Ruprecht, K., Kainzinger, F., Heppner, F. L., & Weimann, A. (2011). Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. *International journal of laboratory hematology*, 33(6), 629–637. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2011.01339.x>
- 69 Chen, Y., Shao, J. Z., Xiang, L. X., Dong, X. J., & Zhang, G. R. (2008). Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(5), 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.007>
- 70 Pilbauerová, N., & Suchánek, J. (2018). Cryopreservation of Dental Stem Cells. *Acta medica (Hradec Kralove)*, 61(1), 1–7. <https://doi.org/10.14712/18059694.2018.16>
- 71 Mullen, S. F., & Critser, J. K. (2007). The science of cryobiology. *Cancer treatment and research*, 138, 83–109. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-72293-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-0-387-72293-1_7)
- 72 Zhurova, M., Woods, E. J., & Acker, J. P. (2010). Intracellular ice formation in confluent monolayers of human dental stem cells and membrane damage. *Cryobiology*, 61(1), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.06.007>

- 73 Mazur, P., Leibo, S. P., & Chu, E. H. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental cell research*, 71(2), 345–355. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90303-5)
- 74 Stolzing, A., Naaldijk, Y., Fedorova, V., & Sethe, S. (2012). Hydroxyethylstarch in cryopreservation - mechanisms, benefits and problems. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 46(2), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2012.01.007>
- 75 Zambelli, A., Poggi, G., Da Prada, G., Pedrazzoli, P., Cuomo, A., Miotti, D., Perotti, C., Preti, P., & Robustelli della Cuna, G. (1998). Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer research*, 18(6B), 4705–4708.
- 76 Golchin, A., Farahany, T. Z., Khojasteh, A., Soleimanifar, F., & Ardeshiryajimi, A. (2019). The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. *Current stem cell research & therapy*, 14(1), 22–33. <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180913123424>
- 77 Khan, Y. S., & Farhana, A. (2020). Histology, Cell. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- 78 Ringer S. (1882). Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle. *The Journal of physiology*, 3(5-6), 380–393. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1882.sp000111>
- 79 Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Fifth Edition. By R Ian Freshney . Hoboken (New Jersey): John Wiley & Sons. \$79.95. xxvi + 642 p + 24 pl; ill.; index. ISBN: 0-471-45329-3. 2005 . (2006). *The Quarterly Review of Biology*, 81(1), 60. <https://doi.org/10.1086/503945>
- 80 Hamburger, V. (1981). Historical landmarks in neurogenesis. *Trends in Neurosciences*, 4, 151–155. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(81\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0166-2236(81)90051-5)
- 81 Landecker, H. (2002). New times for biology: nerve cultures and the advent of cellular life in vitro. *Studies in History and Philosophy of Biol & Biomed Sci*, 33(4), 667–694. [https://doi.org/10.1016/S1369-8486\(02\)00026-2](https://doi.org/10.1016/S1369-8486(02)00026-2)
- 82 Rogers, I., & Casper, R. F. (2004). Umbilical cord blood stem cells. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 18(6), 893–908. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.06.004>.
- 83 Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., & Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British journal of haematology*, 121(2), 368–374. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x>
- 84 Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, 4(5), 267–274.
- 85 Zhang, Q., Xiang, W., Yi, D. Y., Xue, B. Z., Wen, W. W., Abdelmaksoud, A., Xiong, N. X., Jiang, X. B., Zhao, H. Y., & Fu, P. (2018). Current status and potential challenges of mesenchymal stem cell-based therapy for malignant gliomas. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0977-z>

- 86 Oh, E. J., Lee, H. W., Kalimuthu, S., Kim, T. J., Kim, H. M., Baek, S. H., Zhu, L., Oh, J. M., Son, S. H., Chung, H. Y., & Ahn, B. C. (2018). In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 279, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.020>
- 87 Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., & Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), 41–49. <https://doi.org/10.1038/nature00870>
- 88 Anjos-Afonso, F., Siapati, E. K., & Bonnet, D. (2004). In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *Journal of cell science*, 117(Pt 23), 5655–5664. <https://doi.org/10.1242/jcs.01488>
- 89 Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8(3), 301–316. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x>
- 90 Abedini, S., Kaku, M., Kawata, T., Koseki, H., Kojima, S., Sumi, H., Motokawa, M., Fujita, T., Ohtani, J., Ohwada, N., & Tanne, K. (2011). Effects of cryopreservation with a newly-developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues. *Cryobiology*, 62(3), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.03.001>
- 91 He, Q., Wan, C., & Li, G. (2007). Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(1), 69–77. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0335>
- 92 Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R. S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(6), 1384–1392. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0709>
- 93 da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, 119(Pt 11), 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
- 94 Koide, Y., Morikawa, S., Mabuchi, Y., Muguruma, Y., Hiratsu, E., Hasegawa, K., Kobayashi, M., Ando, K., Kinjo, K., Okano, H., & Matsuzaki, Y. (2007). Two distinct stem cell lineages in murine bone marrow. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(5), 1213–1221. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0325>
- 95 Qiao, C., Xu, W., Zhu, W., Hu, J., Qian, H., Yin, Q., Jiang, R., Yan, Y., Mao, F., Yang, H., Wang, X., & Chen, Y. (2008). Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell biology international*, 32(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.08.002>

- 96 Mansbridge J. N. (2009). Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine. *Current opinion in biotechnology*, 20(5), 563–567. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.08.008>
- 97 Balic, A., Aguila, H. L., Caimano, M. J., Francone, V. P., & Mina, M. (2010). Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone*, 46(6), 1639–1651. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.02.019>
- 98 Tsutsui T. W. (2020). Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. *Stem cells and cloning : advances and applications*, 13, 33–42. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S166759>
- 99 Jawets, M. & A. medical microbiology, Brooks, G. F., Morse, S. A., Carroll, K. C., Mietzner, T. A., Butel, J. S., Blengio Pinto, J. R., González Hernández, J. L., Pérez Tamayo, A. M., & Arias Rebatet, G. (2011). *Microbiología médica : Jawetz, Melnick y Adelberg*. McGraw-Hill Interamericana
- 100 Raoof, M., Yaghoobi, M. M., Derakhshani, A., Kamal-Abadi, A. M., Ebrahimi, B., Abbasnejad, M., & Shokouhinejad, N. (2014). A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dental research journal*, 11(2), 244–250.
- 101 Lin, S. L., Chang, W. J., Lin, C. Y., Hsieh, S. C., Lee, S. Y., Fan, K. H., Lin, C. T., & Huang, H. M. (2015). Static magnetic field increases survival rate of dental pulp stem cells during DMSO-free cryopreservation. *Electromagnetic biology and medicine*, 34(4), 302–308. <https://doi.org/10.3109/15368378.2014.919588>
- 102 Gioventù, S., Andriolo, G., Bonino, F., Frasca, S., Lazzari, L., Montelatici, E., Santoro, F., & Rebullà, P. (2012). A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 47(2), 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2012.06.005>
- 103 Nagano, K., Yoshida, Y., & Isobe, T. (2008). Cell surface biomarkers of embryonic stem cells. *Proteomics*, 8(19), 4025–4035. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800073>
- 104 Ponnaiyan, D., Bhat, K. M., & Bhat, G. S. (2012). Comparison of immuno-phenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 25(1), 127–134. <https://doi.org/10.1177/039463201202500115>
- 105 Mao, J. J., Kim, S. G., Zhou, J., Ye, L., Cho, S., Suzuki, T., Fu, S. Y., Yang, R., & Zhou, X. (2012). Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation. *Dental clinics of North America*, 56(3), 639–649. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2012.05.005>
- 106 York, J. R., Yuan, T., & McCauley, D. W. (2020). Evolutionary and Developmental Associations of Neural Crest and Placodes in the Vertebrate Head: Insights From Jawless Vertebrates. *Frontiers in physiology*, 11, 986. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00986>
- 107 Di Scipio, F., Sprio, A. E., Folino, A., Carere, M. E., Salamone, P., Yang, Z., Berrone, M., Prat, M., Losano, G., Rastaldo, R., & Berta, G. N. (2014). Injured cardiomyocytes

- promote dental pulp mesenchymal stem cell homing. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(7), 2152–2161. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.005>
- 108 Golchin, A., Seyedjafari, E., & Ardeshirylajimi, A. (2020). Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future. *Stem cell reviews and reports*, 16(3), 427–433. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09973-w>

## 21 ANEXO

Estudiante de apoyo en el programa de entrenamiento en emprendimiento en *Customer Discovery* con el tema: Banco de células troncales de la región oral 2017



### CERTIFICADO DE TERMINACIÓN

A María de Jesús Guerrero quien fungió como  
Estudiante de Apoyo del proyecto:  
Banco de células troncales adultas de la región oral

Por su conclusión exitosa del programa de entrenamiento en emprendimiento en  
*Customer Discovery*

Realizado del 31 de julio al 22 de septiembre de 2017 con duración de más de 150 horas

Irapuato, Gto., a 22 de septiembre de 2017

  
Dr. Agustino Martínez Antonio  
Líder de NoBI Bajío

  
Dra. Candy Flores Gracia  
Líderesa de Instructores



Escuela  
Nacional de  
Estudios  
Superiores





Participación en el marco del Primer encuentro InterENES con el trabajo “Medios de cultivo para la proliferación celular”



Unidad León  
Escuela  
Nacional de  
Estudios  
Superiores



ESCUELA  
NACIONAL  
de ESTUDIOS  
SUPERIORES  
UNIDAD MORELIA

Otorgan la presente

# CONSTANCIA

a:

Nathalia Estefanía Calleja López, María de Jesús Guerrero Gutiérrez,  
René García Contreras

*Por su participación académica con el trabajo*

**“Medios de cultivo para la proliferación celular”**

*En el marco del Primer Encuentro InterENES*

*“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
León, Guanajuato a 26 de abril de 2018*

Dra. Laura Susana Acosta Torres  
Directora

PRIMER ENCUESTRO  
**inter**  
*enes*

Dra. Diana Tamara Martínez Ruiz  
Directora

Coautor del manual de prácticas del laboratorio para la enseñanza del aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. 2019.



## Autores

- Dr. René García Contreras
- Dra. Laura Susana Acosta Torres
- Dra. Ma. Concepción Arenas Arroccena

*Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII),  
Área de Nanestructuras y Biomateriales,  
Escuela Nacional de Estudios Superiores,  
Unidad León, UNAM.*

- Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.*

- LO. Angel David Paulino González

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Odontológicas, Escuela  
Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, UNAM.*

- C. Nathalia Estefanía López Calleja
- C. María de Jesús Guerrero

*Estudiantes de la Licenciatura en Odontología Escuela Nacional  
de Estudios Superiores, Unidad León, UNAM.*