



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

TÍTULO:

“Diferenciación celular y expresión de proteínas inflamatorias de
hDPSC sobre andamios 3D de PLA”

FORMA DE TITULACIÓN:

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Odontología

P R E S E N T A:

Mayra Daniela Pérez Trujillo

TUTOR:

Dr. René García Contreras



León, Gto., México 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

1 Dedicatoria.....	3
2 Agradecimientos.....	4
3 Lista de abreviaturas.....	6
4 Resumen.....	10
5 Abstract.....	11
6 Introducción.....	12
Capítulo 1.....	14
7 Marco teórico.....	15
8 Antecedentes.....	26
Capítulo 2.....	29
9. Planteamiento del problema.....	30
10 Pregunta de investigación.....	30
11 Justificación.....	31
12 Objetivos: General y específicos.....	32
13 Hipótesis.....	33
Capítulo 3.....	34
14 Marco metodológico: Universo de estudio/muestra, criterios de inclusión, exclusión y eliminación, variables de estudio: dependientes e independientes.....	35
15 Materiales y métodos.....	38
16 Desarrollo de la metodología.....	42
Capítulo 4.....	47
17 Resultados.....	48
18 Discusión.....	54
19 Conclusiones.....	57
20 Bibliografía.....	58

1 DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanas

A mis abuelos

A mis amigos

A mis profesores

2 AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por quien soy y el lugar en el cual me colocó, por acompañarme en cada paso en mi vida.

A mis padres

Mis pilares, mi ejemplo de vida, por siempre estar para mí y brindarme su apoyo incondicional, por hacerme quien soy, porque sin ustedes no estaría donde estoy ahora, agradezco a la vida por tenerlos conmigo y espero algún día ser como ustedes.

A mis hermanas

Mis mejores amigas, que no escogí, pero no cambiaría por nada, gracias por alegrar mi vida.

A Saúl Rodríguez

Por siempre apoyarme, por alentarme a ser mejor persona, y a no rendirme cuando las cosas se ponen difíciles, por siempre tener las palabras correctas para reconfortarme y por acompañarme en cada paso en esta etapa de mi vida.

A mi familia

Por siempre darme palabras de ánimo y mostrarse orgullosos del camino que elegí.

A mi universidad

Por brindarme las herramientas, medios y recursos para desarrollarme como profesionista y como persona.

A mis profesores

Agradezco a todos mis profesores, por enseñarme todo lo que sé, por formarme como profesional y como una mejor persona, por enseñarme a ver siempre por el bien de los demás antes de mi beneficio, a trabajar y esforzarme hasta cumplir mis metas, porque de ellos aprendí que si quieres algo, tienes que conseguirlo por ti mismo, pero que en el camino siempre tendrás a personas maravillosas como todos ellos que siempre estarán dispuestos a ayudarte si lo necesitas. Gracias por transmitirme su amor y pasión por la odontología y sus diferentes áreas, por enseñarme que si amo y disfruto lo que hago, nunca tendré que trabajar.

Al Doctor René García Contreras

Por apoyarme en todo este proceso, por confiar en mí para realizar este proyecto, por compartir sus conocimientos conmigo, que fueron bastantes, por inculcar en mí el interés por la investigación, por hacerme ver de buena manera mis errores y corregirme cuando fuera necesario, pero también por no hacerme el camino completamente fácil, ya que así aprendí a buscar soluciones por mi cuenta, pero sabiendo que siempre podría acudir a él cuando lo requiriera para que me guiara, por enseñarme que existe un mundo más

allá de lo que aprendí en mis clases, por tenerme tanta paciencia, mostrarme y acompañarme en todos los pasos para lograr culminar este proyecto. Gracias por ser un excelente maestro y una increíble persona.

A mi asesor

El maestro Ángel David Paulino González, por convertirse en mi amigo, acompañarme y orientarme en todos los pasos de este proyecto, por aclarar mis dudas y siempre estar dispuesto a compartir conmigo todos sus conocimientos.

A mis sinodales por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar mi proyecto: Dr. René García Contreras, Dra. Laura Susana Acosta Torres, Mtro. Danovan Venegas Lancón, Dr. Ravichandran Manisekaran y Esp. Karla Marcela Aguirre Jiménez, porque aparte de ser buenos investigadores, profesores y clínicos son excelentes personas.

A todos mis profesores, que sin duda fueron y son una parte importante para mi formación académica y personal.

A mis pacientes

Gracias por confiar en mí, por el tiempo que me brindaron, por permitirme crecer como profesionalista, como persona y desarrollar mis habilidades, porque gracias a ustedes, pude practicar todo lo aprendido en clases, gracias también por compartir conmigo lo que pasaba en su día a día, por todas las anécdotas y consejos que compartieron conmigo.

A mis amigos

Gracias a todos mis compañeros por hacer de esta etapa la más bonita, por compartir nuestro día a día durante estos años, con ustedes todo fue más fácil y llevadero, porque si bien, no todo fue fácil, con ustedes fue mejor.

Gracias Grecia por ser mi amiga desde el principio, mi rommie, mi compañera de locuras, por escucharme siempre y ayudarme cuando lo necesité, gracias por tu amistad tan auténtica y por compartir conmigo este camino.

Gracias Marthita y Yareth, por su hermosa amistad, por escucharnos mutuamente y darnos consejos que nunca seguimos, por darme lecciones de vida, porque siempre estuvimos la una para la otra y siempre lo vamos a estar, gracias por estar en mi vida y hacer las clínicas, las tareas y todo más divertido, por compartir conmigo uno de los años más pesados de la licenciatura y por enseñarme que nunca es tarde para conocer a personas tan maravillosas como ustedes.

3 LISTA DE ABREVIATURAS

– 3 –

3D: Impresión tridimensional

– α –

α -MEM: (Del inglés *Minimum Essential Medium alpha modification*) Medio esencial mínimo α

– μ –

μ L: Microlitro

μ m: Micrómetro

– A –

AINE: Antiinflamatorios no esteroideos

– B –

BMP: (Del inglés *bone morphogenetic protein*) Proteína morfogenética ósea

– C –

CM: Célula madre

CMM: Célula madre mesenquimal

CO₂: Dióxido de carbono

Cox-1: Ciclooxygenasa tipo 1

Cox-2: Ciclooxygenasa tipo 2

– D –

DMEM: Eagle's minimal essential medium

DNAasa: Desoxirribonucleasa

DPSC: (Del inglés *Dental Pulp Stem Cells*) Células madre de la pulpa dental

– E –

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

EMA: Agencia de Medicina Europea

– F –

FDA: (Del inglés *Food and Drug Administration*) Administración de alimentos y drogas

FDM: Used deposition modelling

FFF: Fabricación de Filamentos Fundidos

FNT: Factor de necrosis tisular

– G –

g: Gramo

– H –

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

– I –

IgG: Inmunoglobulina G

IL-1: Interleucina-1

IL-1 β : Interleucina-1beta

ISCT: (Del inglés *International Society Cellular Therapy*) Sociedad Internacional de Terapia Celular

– K –

kDa: Kilo Daltons

kb: Kilobyte

– L –

LOT: Lote

– M –

mg: Miligramo

mL: Mililitro

mM: Mili Molar

mm: Milimetro

M: Molar

– N –

ng: nanogramo

– P –

PBS: (Del inglés *phosphate buffered saline*) buffer fosfato salino

PCL: Policaprolactona

PEO: Óxido de polietileno

PGA: Ácido poliglicólico

PGE₂: Prostaglandina E₂

PGH₂: Prostaglandina H₂

PHA's: Polihidroxicanoatos

PLA: Ácido poliláctico

pNpp: (Del inglés *p-Nitrophenyl Phosphate*) p-nitrofenilfosfato

PSA: Antígeno prostático específico

PVDF: Membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno

– R –

rpm: revoluciones por minuto

– S –

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino.

SLS: Selective laser sintering

– T –

TAE: Tampón.

TBS: Tris Buffer Salino.

TEMED: Tetrametiletilendiamina.

TFA: tecnología de fabricación por adición

TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta 1

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano.

– U –

UFC-F: Unidades formadoras de colonias de fibroblastos

UV: Ultravioleta

– V –

Voltios

4 RESUMEN

Introducción: El uso de prototipos de andamios naturales y sintéticos en la bioingeniería de tejidos han tenido mucho auge en el área de medicina regenerativa como biomateriales activos y biocompatibles. Por otro lado, el uso de células madre y especialmente células mesenquimales aisladas de la pulpa dental humana (hDPSC) ha tenido una gran avance en el área de bioingeniería de tejidos.

Metodología: Los andamios se imprimieron en una impresora comercial 3D con un diámetro de 10x10x10mm. Para el aislamiento y caracterización de la hDPSC se utilizaron terceros molares indicados para odontectomía, una vez obtenido el tejido pulpar de los dientes, se colocó en medios de cultivo ricos en aminoácidos y sueros para proliferar. La caracterización *in vitro* de las hDPSC consideró los criterios internacionales mínimos establecidos por la declaración internacional de la Sociedad de Terapia Celular. La diferenciación a linajes osteogénicos, adipogénicos y condrogénicos se realizó sobre los andamios con medio de diferenciación durante dos o cuatro semanas, se realizaron las tinciones de rojo de alizarina, rojo aceitoso y safranina, respectivamente. El mecanismo pro-inflamatorio se determinó por ensayo de ELISA y pruebas de Western-Blot, se utilizó interleucina-1beta como control positivo para inducir a un estado pro-inflamatorio y se cuantificó la expresión de prostaglandina E₂ y ciclooxigenasa 1 y 2, respectivamente. Los datos fueron analizados con pruebas t de student y la significancia estadística fue fijada con un valor $p < 0.05$.

Resultado: Los andamios se imprimieron con un relleno del 95% de PLA. Las hDPSC mostraron características fibroblastoides, adhesión focal al plato de cultivo y una favorable diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico. Al estar en contacto las hDPSC y el andamio de PLA mostraron una buena interacción en la diferenciación a linajes celulares. Las células en contacto con el andamio no mostraron efecto inflamatorio, sin embargo, en sinergia con un estado pro-inflamatorio previo mostraron ligera expresión de PGE₂ y Cox-1 y 2.

Conclusión: La impresión de andamios a base de PLA convencional muestra efectos favorables en la interacción con hDPSC para la diferenciación multilínea de estas, sin modificar significativamente el efecto inflamatorio lo que sugiere su potencial aplicación en regeneración de tejidos.

Palabras clave: hDPSC, multilínea, andamio 3D de PLA.

5 ABSTRACT

Introduction: The use of prototypes of natural and synthetic scaffolds in tissue bioengineering has been very popular in the area of regenerative medicine as active and biocompatible biomaterials. On the other hand, the use of stem cells and especially mesenchymal cells isolated from human dental pulp (hDPSC) has had a great advance in the area of tissue bioengineering.

Methodology: The scaffolds were printed on a commercial 3D printer with a diameter of 10x10x10mm. For the isolation and characterization of the hDPSC, third molars indicated for odontectomy were used, once the pulp tissue of the teeth was obtained, it was placed in culture media rich in amino acids and serum to proliferate. The in vitro characterization of hDPSC considered the minimum international criteria established by the international declaration of the Society for Cell Therapy. Differentiation to osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages was performed on the scaffolds with differentiation medium for two or four weeks, staining with alizarin red, oily red and safranin, respectively. The pro-inflammatory mechanism was determined by ELISA assay and Western-Blot tests, interleukin-1beta was used as a positive control to induce a pro-inflammatory state, and the expression of prostaglandin E₂ and cyclooxygenase-1 and 2, respectively, was quantified. Data were analyzed with student's t tests and statistical significance was set with a p value <0.05.

Result: Scaffolds were printed with 95% PLA infill. The hDPSC showed fibroblast characteristics, focal adhesion to the culture dish and a favorable differentiation towards osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. When the hDPSC and the PLA scaffold were in contact, they showed a good interaction in the differentiation to cell lines. The cells in contact with the scaffold didn't show an inflammatory effect, however, in synergy with a previous pro-inflammatory state, they showed slight expression of PGE₂ and Cox-1 and 2.

Conclusion: The impression of scaffolds based on conventional PLA shows favorable effects in the interaction with hDPSC for their multilineage differentiation, without significantly modifying the inflammatory effect, which suggests its potential application in tissue regeneration.

Keywords: hDPSC, multilineage, PLA 3D scaffold.

6 INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa es una rama de la medicina que se ha desarrollado considerablemente en los últimos años. Los avances en este campo se han vinculado estrechamente con los nuevos conocimientos adquiridos sobre las células madre y su capacidad de convertirse en células de diferentes tejidos. ⁽¹⁾

En los últimos años se ha producido un notable avance en esta rama, que tiene como objetivo es estimular o regenerar tejidos u órganos con la finalidad de restaurar o reestablecer una función. La medicina regenerativa no se limita al empleo de las células madre, también incluye la aplicación terapéutica de diversos factores estimuladores y otros elementos solubles que intervienen en varios procesos biológicos, la terapia génica y la ingeniería de tejidos, tanto *in vitro* como *in vivo*. ⁽²⁾

La construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización terapéutica, para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos es a lo que se le denomina ingeniería tisular sus principales objetivos están encaminados a la regeneración, reparación o reemplazo bioartificial de tejidos y órganos propios del cuerpo humano, que han sido dañados por diversos factores, tales como traumas o lesiones, o por enfermedades adquiridas como el cáncer o ciertas anomalías congénitas. ^(3, 4)

Esta hace énfasis en los tejidos y la terapia basada en células, con enfoques hacia métodos de recolección y expansión de los tejidos vivos *in vitro*, y al diseño de los biomateriales y andamios que proporcionan el soporte estructural adecuado, se ha proyectado como un medio de regeneración de tejidos que intenta minimizar los riesgos y la morbilidad. Este campo, como uno de los pilares de la medicina regenerativa, amplía las posibilidades de investigación y aplicación clínica en la rama estomatológica. ⁽⁵⁻⁷⁾

La ingeniería de tejidos requiere una combinación de células formulada con precisión, factores bioactivos liberados espacio-temporal y un sistema de soporte de andamio especializado. ⁽⁸⁾

La necesidad de materiales en ingeniería tisular nació fundamentalmente para el tratamiento de heridas en las cuales hay pérdida de dermis y epidermis. ⁽⁹⁾ Los materiales en ingeniería tisular pueden beneficiar a pacientes con quemaduras, úlceras crónicas y aquellos que requieren cirugía reconstructiva. ⁽¹⁰⁾

La tecnología de fabricación por adición (TFA) es un conjunto de conocimientos técnicos cuyo objetivo es crear un objeto tridimensional mediante la superposición de capas sucesivas de diversos materiales. En los últimos años, la impresión tridimensional ha ido ganando terreno por su versatilidad y aplicaciones en diversos ámbitos, en especial en el área de la salud, por lo que resulta de nuestro interés su aplicación en la creación de modelos anatómicos, prototipos, prótesis personalizadas, entre muchas otras aplicaciones médicas. ⁽¹¹⁾

Hoy día el conocimiento en la bioingeniería tisular para lograr regenerar un tejido después de una lesión o de un daño causado por un ataque bacteriano han llevado a la identificación y aislamiento de poblaciones de células progenitoras que bajo estímulos específicos pueden diferenciarse en una población específica,

recibiendo el nombre de células madre. En ingeniería tisular, las células más prometedoras, son las células madres mesenquimales adultas (CMM).⁽¹²⁾

Estas CMM son indiferenciadas con capacidad de auto renovarse, pluripotentes, presentan morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteocitos y adipocitos entre otros. Estas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo. Se han hecho proliferar en cultivos *in vitro*, lo que ha permitido estudiar algunas de sus propiedades funcionales.⁽¹³⁾

Las aplicaciones de las células madre en el campo odontológico se encuentran en una fase de estudio prometedora. Actualmente, se podría concretar el papel de las células madre en Odontología en dos grandes campos: la cirugía, destacando la implantología; y la endodoncia, en tratamientos de apicoformación.⁽¹⁴⁾

Los avances recientes en el campo de la terapia celular y la medicina regenerativa describen las CMM como productos biológicos potenciales debido a su capacidad para autorrenovarse, diferenciarse, propiedades inmunomoduladoras y dado su potencial terapéutico, están siendo ampliamente estudiadas para evaluar su viabilidad, seguridad y eficacia.⁽¹⁵⁾

Es por ello que esta investigación tiene como objetivo estudiar la interacción de hDPSC cuando están en contacto con andamios 3D de ácido poliláctico para la diferenciación a linajes celulares osteogénico, adipogénico y condrogénico e identificar el mecanismo pro-inflamatorio de estas células, mediante ensayos de ELISA y Western Blot para evaluar si los andamios incrementan la expresión de proteínas inflamatorias.

Capítulo 1

7 MARCO TEÓRICO

Medicina regenerativa

La medicina regenerativa es una nueva disciplina médica impulsada fundamentalmente por los nuevos conocimientos sobre células madre y su capacidad de convertirse en células de diferentes tejidos. Esta se encuentra sustentada en conductas adoptadas por el organismo para reemplazar células dañadas por diversos procesos en determinados tejidos por células sanas. Integra todos los procedimientos destinados a la regeneración celular. ⁽¹⁶⁾

Los nuevos conocimientos contribuyeron significativamente a calificar a las células madre humanas como el pilar central de la medicina regenerativa y que significaría una sustancial renovación de este tipo de medicina, que algunos han valorado como nueva medicina regenerativa, pero que por sus antecedentes históricos, no se debe considerar como una nueva disciplina.

Esta área se ha ido fortaleciendo progresivamente a través de los años con los recursos aportados en los campos de la biología molecular de la ingeniería genética y de la biotecnología, entre otras disciplinas biomédicas. Esto hace que la medicina regenerativa sea una rama multidisciplinaria relacionada con diferentes áreas de la biomedicina. (figura. 1). ⁽¹⁾



Figura. 1. Carácter multidisciplinario de la medicina regenerativa. **Fuente:** Hernández Ramírez, P. (2009). Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 25(1), 0-0.

Ingeniería tisular

La ingeniería tisular es un campo de estudio multidisciplinario muy prometedor, pues tiene como finalidad la construcción de tejidos bioartificiales para la regeneración, reparación, reemplazo e incremento de la función de tejidos orgánicos a través de constructos tridimensionales tisulares a partir de células madre procedentes de cultivos para devolver la forma y función en conjunto con biomateriales y biomoléculas. Tejidos artificiales con el fin de restaurar, incrementar o sustituir las funciones de los tejidos orgánicos. Para ello se han combinado varias ciencias, como la biología molecular, la biología celular y la ingeniería genética. Esta ha adaptado la impresión tridimensional para la fabricación de bioandamios y tejidos u órganos para resolver las limitaciones de otros métodos convencionales *in vitro*.^(17, 18)

La ingeniería de tejidos requiere una combinación de células formulada con precisión, factores bioactivos liberados espacio-temporal y un sistema de soporte de andamio especializado.⁽¹⁹⁾

Los componentes principales utilizados en la bioingeniería tisular para la formación de nuevo tejido *in vitro* son: células madre, andamios e inductores o biomoléculas (figura. 2).⁽²⁰⁾

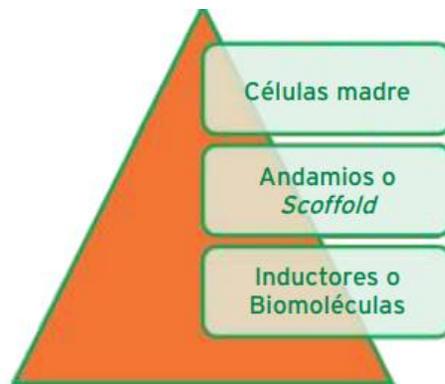


Figura. 2. Componentes principales que se usan en Ingeniería Tisular para formar nuevo tejido en el laboratorio. **Fuente:** Rosales Ibáñez, R., Alvarado Estrada, K. N., & Ojeda Gutiérrez, F. (2012). Ingeniería tisular en Odontología. *Revista ADM. Julio-agosto*, 164-67.

Las células más próximas a una lesión pueden restaurar un daño, esto gracias al denominado mecanismo de diferenciación, el cual es la capacidad que tiene una célula de diferenciarse, es decir, perder sus características originales y con posterioridad adquirir propiedades nuevas. Estas deben de ser células madre capaces de dar origen a células diferenciadas.^(21, 22)

Células madre o troncales

Las células madre (Troncales) son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y que presentan dos características fundamentales: tienen la habilidad de dividirse continuamente para replicarse en ellas mismas (auto-replicación) y pueden producir células especializadas que se logran diferenciar en otros tipos de células funcional y morfológicamente. ⁽²³⁾

Éstas células pueden clasificarse atendiendo a su origen en: células madre adultas y células madre embrionarias. Las células madre adultas, también son conocidas como órgano-específicas, ya que generan los tipos celulares del mismo tejido, Estas células son ideales para la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos y la terapia de sustitución celular. Esto se debe principalmente a su capacidad de diferenciarse en múltiples líneas celulares. Las células madre embrionarias derivan del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocito y posee la capacidad de generar cualquier célula diferenciada en el organismo. ^(24 - 27)

Otra clasificación que se aplica a las células madre se basa en su potencial y capacidad de diferenciación: Totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales, unipotenciales. ⁽²⁷⁾

C.M. totipotentes: Son aquellas capaces de originar un embrión y un individuo completo, diferenciándose hacia cualquier estirpe celular. ⁽²⁸⁾

C.M. pluripotentes: Tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias. ⁽²⁹⁾

C.M. multipotentes. Pueden originar un subconjunto de tipos celulares. Pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos. ^(28, 29)

C.M. oligopotentes. Al igual que las anteriores, pueden desarrollar un conjunto de tipos de celulares, pero mucho más reducido. ⁽²⁸⁾

C.M. unipotentes. Con capacidad para diferenciarse en un único tipo celular, han sido calificadas en algunos trabajos como células precursoras. ^(28, 29)

Células Madre Mesenquimales

Las células madre mesenquimales son células pluripotentes y adultas con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares condrogénico, osteogénico y adipogénico entre otros. Estas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo de donde se han logrado establecer cultivos que han permitido estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas.

Estas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal.⁽³⁰⁾

La sociedad internacional de Terapia Celular o ISCT (*Internacional Society Cellular Therapy*) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales (CMM): Éstas deben ser adherentes en cultivo, expresión específica de antígenos de superficie y ser capaces de diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Además de lo propuesto por la ISCT, también se deben tener en cuenta dos aspectos adicionales para clasificarlas como células madre: Deben de realizar procesos de autor renovación y que sean capaces de desarrollar plasticidad clonogénica.⁽³¹⁾

Células Madre de la Pulpa Dental

En la pulpa dentaria de los dientes adultos existe una población de células clonogénicas con alta capacidad proliferativa: las DPSC. Estas células se aislaron con éxito mediante digestión enzimática del tejido pulpar después de separar la corona de las raíces (Gronthos *et al.* 2000). Son células multipotentes que poseen potencial de multidiferenciación, teniendo la capacidad de diferenciarse a distintos linajes celulares, estas células provienen principalmente de terceros molares y dientes supernumerarios.^(28, 32)

La producción de células madre de la pulpa dental es muy pequeña (1 por 100 de todas las células) y según aumenta la edad del individuo, la disponibilidad de estas células se ve reducida.⁽²⁸⁾

El acceso al lugar donde se encuentran las células madre de la pulpa dental es fácil y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y ha demostrado tener buena interacción con biomateriales, lo cual las hace ideales para la regeneración tisular.⁽³³⁾

Células madre mesenquimales de la región oral: BMSC: Médula ósea, SHED: Pulpa de dientes deciduos, PDLSC: Ligamento Periodontal, iPAPC: Células inflamatorias, DPSC: Pulpa dental, SCAP: Papila apical, TGPC: Germen del diente, DFSC: Folículo dental, SGSC: Glándula salival, OESC: Epitelio oral, PSC: Periósticas, GMSC: Tejido gingival.⁽³²⁾

Andamios

Un componente esencial de la ingeniería tisular son los andamiajes. Estos proveen un microambiente físico-químico y biológico tridimensional. Debe permitir la unión, proliferación y diferenciación de las células madres sembradas en él. Además, debe permitir el paso de aire y tener la porosidad adecuada para el flujo de proteínas y factores de crecimiento. El ácido poliláctico es un polímero sintético que es sintetizado a partir de D, D-L, L ácido poliláctico. Este material tiene una estructura abierta 3D la cual es efectiva para cultivar células de alta densidad. Estos proveen un sustrato adhesivo que sirve como un soporte físico tridimensional para un cultivo de células *in vitro* como también para la regeneración tisular *in vivo*.⁽³⁴⁾

El término biomaterial designa a aquellos materiales utilizados en la fabricación de sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la medicina. Entre las características de los materiales se encuentra la de ser biocompatibles, o biológicamente aceptables. De este modo, en la evaluación de un material resulta fundamental examinar su biocompatibilidad y capacidad de reabsorción; ya que permanecen en contacto con los tejidos vivos, por lo que resulta imprescindible que no se produzcan reacciones no deseadas en la interfase tejido-material y que mantenga sus propiedades durante el tiempo que tenga que desempeñen su función.⁽²⁰⁾

Un beneficio de los biomateriales sintéticos es que reducen al mínimo el riesgo de transporte de elementos patógenos o contaminantes, además de presentar características modificables para programar la liberación de principios activos. El mayor beneficio de los biomateriales sintéticos es que pueden ser diseñados para satisfacer necesidades específicas.⁽³⁵⁾

En la ingeniería tisular, los biomateriales deben favorecer la función biológica y mecánica de las células ya que actúan como una matriz extracelular artificial. Como resultado, los biomateriales pueden proporcionar a las células un espacio en tres dimensiones para formar los tejidos nuevos con la estructura y función apropiada.⁽³⁶⁾

Sobre los andamios son depositadas las células vivas (que pueden ser genéticamente modificadas), cultivadas en el laboratorio en número suficiente para la posterior implantación, los cuales permiten a los cirujanos manipular el medio ambiente local del tejido y proporcionan una alternativa fisiológica con mejor y más rápida recuperación del cuerpo.⁽³⁷⁾

Andamios 3D de PLA

Los andamios son estructuras microscópicas 3D que favorecen y benefician la proliferación y diferenciación celular. Pueden ser de tres tipos: naturales, sintéticos y de vascularización, las propiedades de estos dependen de la naturaleza de los biomateriales y del proceso de fabricación. Es un elemento que sirve como plantilla y soporte estructural para las interacciones celulares y la formación de tejido. Los andamios para la regeneración ósea deben cumplir ciertas características: Propiedades mecánicas similares a las del sitio de reparación, biocompatibilidad, biodegradabilidad a un ritmo acorde con la remodelación.⁽³⁸⁾

Polímeros biodegradables

Los polímeros biodegradables pueden clasificarse, según su origen, dentro de tres categorías principales:

- a) Polímeros naturales: como la celulosa, el almidón y las proteínas.
- b) Polímeros sintéticos: los más prometedores son los poliésteres alifáticos como el PLA, el PGA, la PCL, o PEO.
- c) Polímeros sintetizados por microorganismos: son polímeros que se sintetizan biotecnológicamente con bacterias, como los PHA's. ⁽³⁹⁾

De los polímeros sintéticos, el polímero biodegradable más importante es el ácido poliláctico, que se obtiene a partir del almidón. La biodegradación del PLA tiene lugar a través de la hidrólisis de los enlaces éster que posee el polímero y posteriormente por degradación enzimática. Es el más utilizado en el campo de la salud y es aceptado por la FDA y la EMA. ^(39, 40)

El PLA es un biopolímero termoplástico cuya molécula precursora es el ácido láctico. Debido a su biodegradabilidad, propiedades de barrera y biocompatibilidad, éste biopolímero ha encontrado numerosas aplicaciones ya que presenta un amplio rango inusual de propiedades, desde el estado amorfo hasta el estado cristalino. Este material tiene una estructura abierta 3D la cual es efectiva para cultivar células de alta densidad. Estos proveen un sustrato adhesivo que sirve como un soporte físico tridimensional para un cultivo de células in vitro como también para la regeneración tisular in vivo. ^(34, 41)

Biomoléculas, inductores o factores de crecimiento

Son proteínas que se unen a receptores de la célula e inducen proliferación celular y diferenciación. Muchos de estos factores tienen la capacidad de estimular en mayor o menor grado la división celular en numerosos tipos de células, mientras que otros son más específicos a un solo tipo celular. ⁽⁴²⁾

La célula responde al medioambiente extracelular detectando señales químicas o estímulos físicos que desencadenan una respuesta apropiada de las mismas mediante la activación de distintos mecanismos moleculares y biológicos que conducen a división, migración, diferenciación, mantenimiento del fenotipo. La actividad coordinada de estos procesos por parte de las células que forman un tejido conducen a la definición estructural y funcional de un tejido en un momento temporal determinado. ⁽²⁰⁾

Aislamiento y caracterización celular

Se refiere a la obtención de células a partir de una muestra, ya sea por disgregación enzimática o explante. ⁽⁴³⁾ En la técnica de disgregación se celular separan grupos celulares de la matriz extracelular para ser estudiadas. Cuando el tejido es sólido, se emplean métodos mecánicos o enzimáticos con base en tripsina, proteasas, colagenasas, hialuronidasas y DNAasa. Esta permite aumentar el área de contacto y liberar a las células dentro del tejido permitiendo que las células tengan contacto con la superficie de la placa y lograr su

expansión en monocapa (Gronthos et al., 2000). También permite una mayor liberación de células y una temprana adhesión al plato de cultivo. ⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾

Cultivo Primario: Cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de los organismos, un cultivo primario puede considerarse como tal hasta que se subcultiva por primera vez, a partir de entonces se considera una línea celular.

Explantos primarios: Fragmentos de tejidos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del tejido extraído. ⁽⁴⁹⁾

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

Adhesión al plato de cultivo en condiciones de cultivo estándar, la adherencia al plato de cultivo es una capacidad de expansión rápida de las CMM en el cultivo.

Expresión de anticuerpos positivos (CD150, CD73, CD90, STRO-1) y de anticuerpos negativos (CD45, CD34, CD14 O CD11b, CD79a o CD19, HLA clase II).

Capacidad de diferenciación mesenquimatosa trilineal: osteogénico, adipogénico y condrogénico *in vitro*. La diferenciación de osteoblastos puede demostrarse mediante tinción Rojo de Alizarina o de von Kossa, la diferenciación de adipocitos se demuestra mediante tinción Oil Red O y la diferenciación de condrocitos se demuestra mediante tinción con Safranina O/ azul alcian o tinción inmunológica para el colágeno tipo II. ^(43, 50)

Diferenciación celular

Las hDPSC tienen la capacidad diferenciarse a células con funciones especiales debido a su plasticidad celular al ser inducidas por un estímulo adecuado. Para la caracterización *in vitro* de células madre se considerarán los criterios mínimos establecidos para definir células troncales mesenquimales multipotentes, establecidos por la declaración internacional de la Sociedad de Terapia Celular: adherencia al plástico, morfología fibroblastoide y diferenciación a linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico y marcadores positivos y negativos por inmunotipificación. ⁽³¹⁾

Siendo la capacidad de diferenciarse a diversos linajes un aspecto trascendental en la caracterización. La diferenciación a osteocitos se identifica por los depósitos mineralizados, similar a la hidroxiapatita *in vivo*, de rojo alizarina presentes en el cultivo cuando las células han crecido en presencia de medios inductivos que contienen ácido ascórbico, dexametasona y un exceso de fosfato inorgánico. La diferenciación a adipocitos se da por la capacidad de marcadores positivos a aceite rojo aceitoso que se observan en los depósitos de lípidos cuando se cultiva bajo condiciones inductivas adipogénicas. La diferenciación a condrocitos se da por presencia de marcadores positivos a safranina con la tinción de los depósitos de colágeno tipo II que expresa condrocitos en presencia de TGF- β 1 y BMP-4 en cultivos esféricos de alta densidad (Tabla 1). ⁽⁴³⁾

Tabla 1. Diferenciación de células madre mesenquimales a otros linajes celulares			
	Medio de cultivo	Cambio de medio	Tinción
Diferenciación osteogénica	α -MEM SFB Penicilina G y sulfato de estreptomina Dexametasona B-Glicerofosfato Ascorbato-2 fosfato	Cada 2 días durante 4 semanas	Rojo de alizarina
Diferenciación adipogénica	α -MEM SFB Penicilina G y sulfato de estreptomina Dexametasona B-Glicerofosfato Ascorbato-2 fosfato Insulina L-glutamina	Cada 2 días durante 4 semanas	Rojo aceitoso O
Diferenciación condrogénica	α -MEM SFB Penicilina G y sulfato de estreptomina Dexametasona B-Glicerofosfato Ascorbato-2 fosfato Proteína morfogenética ósea	Cada 2 días durante 2 semanas	Safranina O

Fuente. García Contreras et al. Enseñanza práctica del Aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. Manual de prácticas de laboratorio, UNAM 2019.

Mecanismo pro-inflamatorio

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas.

Es posible dividir el proceso inflamatorio en 5 fases:

1. Liberación de mediadores. Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
2. Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
4. Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
5. Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.⁽⁴⁷⁾

Prostaglandina E₂, Cox 1 y 2

La Prostaglandina E₂ se forma en una variedad de células de PGH₂, que a su vez es sintetizado a partir del ácido araquidónico por la enzima prostaglandina sintetasa. Se ha demostrado que tiene una serie de acciones biológicas, incluida la vasodilatación, acción tanto antiinflamatoria como pro inflamatoria, modulación de ciclos de sueño y vigilia, y facilitación de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana. Estimula el hueso reabsorción, y tiene efectos termorreguladores. Se ha demostrado que es un regulador de la excreción de sodio y la hemodinámica renal.

Además, aumenta la secreción de moco, jugo gástrico y bicarbonato duodenal. En los seres humanos la mayoría de las prostaglandinas con efecto protector de la mucosa gástrica son sintetizadas a través de la Cox-1. Sin embargo, en los cánceres de colon humano, la Cox-2 se expresa en grandes cantidades.⁽⁵¹⁾

La PGE₂ interacciona con las citocinas IL-1 y FNT para producir la fiebre que se observa en las respuestas inflamatorias sistémicas que aparecen en las infecciones. El leucotrieno B₄ induce la adhesión y agregación leucocitarias en el endotelio vascular y también es un potente agente quimiotáctico.⁽⁵²⁾

La Ciclooxygenasa es la enzima clave en la síntesis de prostaglandinas a través de la oxidación del ácido araquidónico, éstas realizan funciones relacionadas con la homeostasis de diversos órganos, como el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias.⁽⁵³⁾

Por otra parte, las ciclooxigenasas juegan un papel importante en la biosíntesis de PGE₂, ya que actúan como precursores, activadores y potenciadores de la misma. ⁽⁵⁴⁾

La cox-1 se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos es la responsable de producción de prostaglandinas, de importancia para funciones homeostáticas, como mantener la integridad de la mucosa gástrica, regula la hemodinámica renal y media la función plaquetaria. ^(54, 55)

La cox-2 es una enzima inducible por múltiples estímulos, aunque también se encuentra de manera en diferentes sitios del aparato reproductor femenino y masculino, su gen se encuentra localizado en el cromosoma 1, en condiciones basales, la expresión de esta enzima se encuentra muy restringida, sin embargo, la cox-2 aumenta drásticamente durante la inflamación. ⁽⁵⁶⁾

Estructuralmente la Cox 1 y 2 presentan una homología del 90 %, pero el sitio de unión para el ácido araquidónico es diferente. La Cox-2 presenta un canal más amplio, que le permite el acceso a AINE de gran tamaño que no penetrarían en el canal de la Cox-1. Su estructura tridimensional consta de tres unidades independientes: una similar al factor de crecimiento epidérmico, otra en la membrana y otra en la que contiene los dominios enzimáticos. ⁽⁵³⁾

La isoforma Cox-1 se expresa de forma constitutiva (constante) en la mayor parte de los tejidos; mientras la Cox-2 es inducida en las inflamaciones. La Cox-1 es esencial para el mantenimiento del estado fisiológico normal de muchos tejidos, como la protección de la mucosa gastrointestinal; control del flujo sanguíneo renal; homeostasia; respuestas autoinmunes. La Cox-2, inducida en la inflamación por varios estímulos como citocinas, endotoxinas y factores de crecimiento, origina prostaglandinas inductoras, que contribuyen al desarrollo del edema, rubor, fiebre e hiperalgesia, esta enzima también es de carácter constitutivo en bajas cantidades, se encuentra en el cerebro, corazón, ovarios, músculos estriados y otros órganos, sin embargo, ante un estímulo, incrementa su expresión, por esto se le considera como de naturaleza inducible. ^(57, 58)

Ensayo ELISA

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30 000 Daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpos específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. ⁽⁴⁸⁾

El PGE₂ kit ELISA es un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa de prostaglandina E₂ en fluidos biológicos. El kit utiliza un anticuerpo monoclonal para PGE₂ para unir, de manera competitiva, el PGE₂ en la muestra, estándar, o una molécula de fosfatasa alcalina que tiene PGE₂ unido covalentemente a

él. Después de una incubación simultánea a temperatura ambiente, el exceso de reactivos se elimina por lavado y se agrega el sustrato. La densidad óptica medida se utiliza para calcular la concentración de PGE₂.

Ensayo Western blot

El Western blot se utiliza a menudo en la investigación para separar e identificar proteínas. En esta técnica se separa una mezcla de proteínas en función del peso molecular y, por tanto, por tipo, mediante electroforesis en gel. Estos resultados luego se transfieren a una membrana que produce una banda para cada proteína. Luego, la membrana se incuba con anticuerpos marcadores específicos para la proteína de interés.

El anticuerpo no unido se lava dejando solo el anticuerpo unido a la proteína de interés. A continuación, los anticuerpos unidos se detectan revelando la película. Como los anticuerpos solo se unen a la proteína de interés, solo debe ser visible una banda. El grosor de la banda corresponde a la cantidad de proteína presente; por tanto, hacer un estándar puede indicar la cantidad de proteína presente. El artículo describirá primero el protocolo para Western Blot, acompañado de imágenes para ayudar al lector y a la teoría a racionalizar el protocolo. A esto le seguirá la explicación teórica del procedimiento y, en la sección posterior, consejos para la resolución de problemas comunes. ⁽⁵⁹⁾

8 ANTECEDENTES

El concepto de Ingeniería Tisular fue acuñado por Fung en el año de 1987 durante una reunión de la Fundación Nacional de las ciencias, sin embargo, muchas de las técnicas utilizadas ya habrían sido descubiertas años antes. La ingeniería tisular surgió a partir de la unión de la experiencia adquirida de distintos campos, como la bioquímica, la biología celular y la biología molecular. ⁽¹⁷⁾

Se desarrolló como una alternativa al trasplante tradicional de órganos debido a la escasez o rechazo por parte de los pacientes. La convención fundamental de la ingeniería de tejidos parte de la capacidad del cuerpo humano para curarse a sí mismo, que depende del tipo de enfermedades o heridas, del tejido, el grado de daño, pérdida de la función y el número de tejidos involucrados. El proceso de reparación, sin embargo, se ha mejorado en gran medida gracias a los avances en la tecnología médica en la que se encuentran avances en implantes, prótesis y manipulaciones a nivel celular y molecular. ⁽³⁷⁾

Las células madre de la pulpa las primeras células madre dentarias que se aislaron (Gronthos 2000). Por analogía con las células madre de la médula, se consideró que había una comunidad de células multipotenciales en el tejido pulpar de dientes maduros. En estudios posteriores, se las empezó a relacionar con características endoteliales y vasculares, pero no ha sido hasta años después cuando se aislaron, determinando sus características. ^(60- 62)

En 1976 se informó que de la médula ósea se podían obtener células estromales con capacidad clonogénica. Con posterioridad, se describió en la médula ósea una población de células que presentaba una gran capacidad proliferativa y de diferenciación a varios linajes celulares. Estas células se denominaron células madre mesenquimales. También se han llamado mesenquimatosas o mesenquimáticas. Por su procedencia del estroma de la médula ósea otros las han llamado células madre estromales. ⁽⁶⁴⁾

Los progenitores mesenquimales son un grupo de células madres adultas que fueron caracterizadas por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos. Estos investigadores describieron células de la médula ósea que hacían parte de un estroma medular y que originaba un microambiente hematopoyético. Las llamaron *unidades formadoras de colonias de fibroblastos* (UFC-F). ⁽⁶⁵⁾

1983, Owen y colaboradores describieron la capacidad de las células troncales de generar hueso, cartílago y tejido conjuntivo con una poca cantidad de células de la médula ósea inoculadas en una cámara de difusión en modelos *in vivo*. ⁽⁶⁶⁾

En 1974, Friedenstein y su equipo comprobaron que estas células tienen propiedades de autor renovación y elevado potencial de proliferación. Teniendo estos conceptos más claros, a finales de la década de los

ochenta, los grupos de investigación de estos dos autores concluyeron que había una célula troncal presente en la médula ósea con capacidad de originar distintos tipos celulares, entre los que se incluía hueso. A esta célula la denominaron *célula troncal estromal*.⁽⁶⁷⁾

Años más tarde, en 1992, Caplan y colaboradores, citados en Nakata y colaboradores y D'Aquino y colaboradores propusieron realizar un estudio en humanos en el que cultivaron y trasplantaron células mesenquimales de humanos adultos para observar la formación de hueso.^(68, 69)

En el estudio de Ferlin y colaboradores se estudió la interacción entre células y un biomaterial subyacente y mostró su importancia para promover adhesión, proliferación y función celular. Se comprobó que el resultado de andamios impresos con precisión, con parámetros como tamaño de los poros, porosidad y espesor de precisión de hasta 91%, promueven el intercambio de nutrientes, factores solubles y señales celulares.⁽⁷⁰⁾

Año 1983, Chuck Hull, un inventor destacado en el campo de la óptica iónica, idea el primer método de impresión 3D: la estereolitografía.

Año 1988, la compañía 3D Systems, fundada por Chuck Hull, comercializa las primeras máquinas de impresión estereolitográficas.

Años 1988 – 1990, se desarrollan nuevos métodos de impresión: la impresión por deposición de material fundido (FDM) y la impresión por láser (SLS).

Año 1999, primeras aplicaciones en medicina, se crea el primer órgano y se implanta en un ser humano. La tecnología utilizada por los científicos del Instituto de Wake Forest de Medicina Regenerativa, abrió las puertas al desarrollo de otras estrategias para la impresión 3D.

Año 2009 Industrias MakerBot, una compañía de hardware de código abierto para las impresoras 3D, comienza la venta de kits de montaje que permiten a los compradores fabricar sus propias impresoras 3D y productos.⁽⁷¹⁾

En el año 2018 Nathalia Calleja y colaboradores imprimieron andamios 3D a base de Ácido Poliláctico, se realizó la caracterización de la ultraestructura y topografía de estos con estereomicroscopio (Leica), la rugosidad superficial fue determinada con MFA (Nanosurf), también se estudiaron sus efectos en cultivo con células madre dentales, y se realizaron pruebas de degradación en tripsina y PBS, esta se observó mediante pruebas de peso y degradación, proliferación y adhesión celular en la cual se obtuvo un total de dos millones de células adheridas al plato de cultivo y en las pruebas de adhesión a los andamios se obtuvieron resultados iguales o más altos que en el plato de cultivo.⁽⁷²⁾

En el año 2020 María de Jesús Guerrero Gutiérrez y colaboradores realizaron cultivo, caracterización y criopreservación de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana de terceros molares, en el cual se dieron lecturas positivas a los marcadores de células madre mesenquimales obteniendo células con características cartilaginosas, adiposas y óseas, para su posterior almacenamiento por medio de un protocolo de criopreservación, se concluyó que al ser criopreservadas, estas poseen una mayor tasa de proliferación y supervivencia tras su descongelamiento, por lo que son óptimas para su utilización en ingeniería tisular y medicina regenerativa.⁽⁵⁰⁾

Capítulo 2

9 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los grandes retos en Odontología es la restauración o reposición de tejidos que se han perdido debido a lesiones o patologías, las cuales pueden ser de tipo periodontal, endodónticas, caries, lesiones que afecten los tejidos de soporte como huesos maxilares o mandibulares o mucosa oral.⁽²⁰⁾

Los traumatismos maxilofaciales representan un motivo de consulta común en los servicios de urgencias. La compleja anatomía del macizo facial, requiere de métodos de imágenes y técnicas de reconstrucción multiplanares para su correcta evaluación y rehabilitación. Estas fracturas son más comunes en hombres en un rango de edad de 15 a 35 años y pueden resultar de diversas situaciones, siendo los más comunes accidentes de tránsito, lesiones por enfrentamientos o lesiones deportivas. Aunque también existen enfermedades congénitas que pueden afectarlo, como el labio y paladar hendido, fisuras orofaciales, craneosinostosis, faciocraneosinostosis o neoplasias. ^(74, 75)

Este proyecto propone el uso de andamios de ácido poliláctico comercial como biomaterial en conjunto con células madre de pulpa dental del propio paciente para crear un constructo tridimensional que ayude a devolver la forma y función de tejidos perdidos.

10 PREGUNTA DE INVESTIVACIÓN

¿Las hDPSC tienen potencial multilínea al interactuar con andamios impresos en 3D de PLA sin alterar su mecanismo pro-inflamatorio?

11 JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periodontal y la caries, son algunos de los padecimientos bucodentales con mayor prevalencia a nivel mundial. En México se ha reportado hasta en 70% de la población (según la Academia Americana de Periodoncia) y se presenta principalmente en adultos mayores (de 65 años en adelante). Al afectar los tejidos de soporte del diente ocasiona afecciones que van desde la inflamación gingival, la cual puede conducir a la destrucción del tejido blando y si no se trata a la pérdida del hueso alveolar. ⁽⁷³⁾

Los andamios 3D de PLA convencional podrían ser una buena opción como biomaterial en odontología regenerativa, debido a sus características y propiedades, las cuales fueron evaluadas en un estudio realizado en la ENES León, UNAM, también se llevó a cabo otro estudio en el cuál se aislaron y caracterizaron hDPSC obtenidas a partir de terceros molares y estas demostraron tener un gran potencial debido a su capacidad de diferenciación multilínea. Es por ello, que esta investigación tiene el fin de analizar la interacción de andamios 3D de ácido poliláctico en conjunto con células madre de la pulpa dental humana para diferenciarse a distintos linajes celulares y evaluar la expresión de proteínas inflamatorias.

12 OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la interacción bioquímica de las hDPSC con andamios de PLA convencional obtenidos por impresión 3D.

Objetivos específicos

- Determinar la diferenciación multilineaje mediante tinción de rojo de alizarina, rojo aceitoso y safranina O de células madre de la pulpa dental humana sobre andamios 3D de ácido poliláctico obtenidos previamente mediante el método de impresión FFF.
- Identificar la expresión de PGE₂ del contacto de hDPSC con el andamio 3D de PLA mediante ensayo ELISA.
- Identificar la expresión de cox-1 y 2 del contacto de hDPSC con el andamio 3D de PLA mediante ensayo Western Blot.

13 HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación

1. Las hDPSC tienen capacidad de diferenciación a linaje celular osteogénico sobre andamios 3D de PLA.
2. Las hDPSC tienen capacidad de diferenciación a linaje celular adipogénico sobre andamios 3D de PLA.
3. Las hDPSC tienen capacidad de diferenciación a linaje celular condrogénico sobre andamios 3D de PLA.
4. La interacción del andamio 3D de PLA con las hDPSC no incrementa la expresión de proteínas inflamatorias.

Hipótesis causales

1. La diferenciación a linaje celular osteogénico sobre andamios 3D de PLA no incrementó la expresión de proteínas inflamatorias.
2. La diferenciación a linaje celular adipogénico sobre andamios 3D de PLA no incrementó la expresión de proteínas inflamatorias.
3. La diferenciación a linaje celular condrogénico sobre andamios 3D de PLA no incrementó la expresión de proteínas inflamatorias.

Hipótesis Nula

1. Las hDPSC no tienen capacidad de diferenciación a linaje celular osteogénico sobre andamios 3D de PLA.
2. Las hDPSC no tienen capacidad de diferenciación a linaje celular adipogénico sobre andamios 3D de PLA.
3. Las hDPSC no tienen capacidad de diferenciación a linaje celular condrogénico sobre andamios 3D de PLA.
4. La interacción del andamio 3D de PLA con las hDPSC incrementa la expresión de proteínas inflamatorias.

Capítulo 3

14 MARCO METODOLÓGICO

Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro*, prospectivo, descriptivo.

Universo de estudio

Células madre de la pulpa dental humana.

Andamios 3D de PLA.

Tipo de muestreo

Muestreo no probabilístico por conveniencia.

Tamaño de muestra

n=4, de tres experimentos independientes, n=12 (siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 10993-5:1333)

Criterios de inclusión

Andamios rígidos a base de PLA.

Células madre división 4-8.

Criterios de exclusión

Andamios semirrígidos de PLA.

Células madre división 9 en adelante.

Criterios de eliminación

Muestras contaminadas.

Variables

Variables dependientes:

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Diferenciación celular	Proceso en el cual una célula se especializa adquiriendo la capacidad de desarrollar funciones propias de células de otros tejidos.	Diferenciar las hDPSC a distintos linajes celulares (osteogénico, adipogénico y condrogénico).	Cualitativa	Nominal 1. Positivo 2. Negativo
Mecanismo de inflamación	La inflamación es una respuesta ante una injuria de tipo química, microbiológica o traumática.	El mecanismo pro inflamatorio se determinó por ensayo de ELISA, se utilizó IL-1 β , como control positivo para inducir a un estado pro-inflamatorio, se cuantificará la expresión de prostaglandina E ₂ mediante un kit de ELISA	Cuantitativo	De razón Absorbancia (ng/mL)
	La inflamación es una respuesta ante una injuria de tipo química, microbiológica o traumática.	Se realizó un ensayo Western-Blot, utilizando IL-1 β y se observó la expresión de Cox 1 y 2 por electroforesis (SDS-PAGE poliacrilamida)-transferencia proteica a membranas de difluoruro De polivinilideno mediante método húmedo.	Cualitativa	Binaria Presencia / ausencia de bandas de proteínas.

Tabla 2. Variables dependientes del estudio.

Variable independiente:

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Uso o no de andamio de PLA	Un andamio es una estructura microscópica 3D que favorecen y benefician la diferenciación celular.	Se evaluó la diferenciación multilínea de las hDPSC y el mecanismo pro-inflamatorio sobre andamios 3D de PLA y sin ellos, para realizar una comparación de ambos resultados.	Cuantitativa	Nominal 1. Sin andamio (control) 2. Con andamio

Tabla 3. Variables independientes del estudio.

15 MATERIALES Y MÉTODOS

Impresión 3D de andamios

Ácido Poliláctico (Filamento NinjaFlex 3mm Midnight. LOT: 3D3181290)

Impresora comercial 3D MakerMex (Modelo: MM1) método de Fabricación de Filamentos Fundidos.

Aislamiento y caracterización de hDPSC

Reactivos	Materiales	Equipo
Medio de cultivo base .Suero fetal Bovino (SFB). (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA. LOT:1606686) Antibiótico: Penicilina/estreptomina 10,000UI/mL y 10,000 µg/mL. (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) Solución salina buffer de fosfato (PBS, pH 7.4). (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA. LOT:1253067) Enzima tripsina con EDTA al 0.05%. (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA. LOT: 2065178) L-glutamina (Glutamax). (Life Technologies, Gibco) dimetilsulfóxido (DMSO, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA. LOT:2085268)	Hoja de bisturí del 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. Micropipetas de volumen variable. Puntas para micropipeta. Tubos eppendorf de 1.5 mL de capacidad. Cajas Petri de 10-cm y 6-cm.	Micromotor. Bomba de vacío. Baño María. Tanque para Nitrógeno líquido. Tanque de CO ₂ . Hematocitómetro de Neubauer Microscopio SEM. (JEOL JSM-6360, Co., Ltd Akishima, Tokio, Japón). Incubadora a 37°C con Atmósfera de 5 % de CO ₂ y 95% de humedad.

Tabla 4. Reactivos, materiales y equipo para el aislamiento y caracterización de hDPSC. **Fuente:** García Contreras et al. Enseñanza práctica del Aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. Manual de prácticas de laboratorio, UNAM 2019

Diferenciación multilínea de hDPSC

Reactivos en general	Diferenciación osteogénica	Diferenciación adipogénica	Diferenciación condrogénica
DMEM (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA.)	α -MEM	α -MEM	α -MEM
SFB (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA. LOT:1606686)	Dexametasona	Insulina	Dexametasona
Antibióticos (Sulfato de estreptomicina y Penicilina G) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA)	Glicerolfosfato	l-glutamina	Glicerolfosfato
PBS (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA. LOT:1253067)	Rojo de Alizarina	Glicerolfosfato	Proteína morfogenética ósea (BMP 4)
Etanol al 70%		Ascorbato-2 fosfato	Safranina O
Agua destilada		Isopropanol al 60%	
		Rojo aceitoso O	

Tabla 5. Reactivos para la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de hDPSC.

Identificación de mecanismo pro-inflamatorio

Ensayo ELISA

- Kit ELISA (Enzo Life Sciences New York, USA)
- IL-1 β (Novus Biologicals, LL, Briarwood, USA)
- Placa de 96 pocillos, número de catálogo 80-0050 Una placa que utiliza tiras separables recubiertas con anticuerpo de cabra específico para IgG de ratón.
- PGE₂ Conjugado ELISA, 5 mL, No. de catálogo 80-0002.
Una solución azul de fosfatasa alcalina conjugada con PGE₂.
- PGE₂ Anticuerpo ELISA, 5 mL, No. de catálogo 80-0003.
Una solución amarilla de un anticuerpo monoclonal para PGE₂.
- Tampón de ensayo, 27 mL, no. de catálogo 80-0010.
Solución salina tamponada con Tris que contiene proteínas y azida de sodio como conservante.
- Tampón de lavado concentrado, 27 mL, número de catálogo 80-1286.
Solución salina tamponada con Tris que contiene detergentes.
- Prostaglandina E₂ Estándar, 0.5 mL, No. de catálogo 80-0004.
Una solución de 50.000 pg / mL de PGE₂.
- Substrato pNpp, 20 mL, No. de catálogo 80-0075.
Una solución de fosfato de p-nitrofenilo en tampón. Listo para usar.
- Solución de parada, 5 mL, no. de catálogo 80-0247.
Una solución de fosfato trisódico en agua. Mantener bien tapado. Precaución: Cáustico.
- PGE₂ Hoja de diseño del ensayo, 1 cada uno, Número de catálogo 30-0002.
- Sellador de placas, 1 cada uno, Número de catálogo 30-0012.
- Agua desionizada o destilada.
- Pipetas de precisión para volúmenes entre 5 μ L y 1.000 μ L.
- Pipetas repetidoras para dispensar 50 μ L y 200 μ L. Vaso de precipitados desechable para diluir.
- Concentrados tampón.
- Cilindros graduados.
- Un agitador de micro placas.
- Papel absorbente.
- Lector de micro placas capaz de leer a 405 nm, preferiblemente con corrección entre 570 y 590 nm.
- PGE₂ Estándar para permitir que la eficiencia de extracción sea precisa determinado.
- Ácido clorhídrico 2 M, agua desionizada, etanol, hexano y acetato de etilo.
- 200 mg C 18 Columnas de extracción de fase inversa.

Ensayo Western Blot

- Cámara de electroforesis
- Agua desionizada.
- Tris HCl pH.
- Acrilamida.
- SDS al 10%.
- PSA al 10%.
- TEMED.
- Buffer de carga Laemmli 2X con mercaptoetanol.
- Buffer de corrida.
- Marcador de peso molecular.
- Buffer de transferencia
- Esponja.
- Papel filtro.
- Rodillo.
- Colocar gel.
- Colocar la membrana de PVDF.
- Metanol.
- Anticongelante.
- TAE 1X twin 20 1%.
- Leche descremada.
- TBST
- Anticuerpo primario
- Anticuerpo primario monoclonal de ratón COX 1 o COX 2
- Anticuerpo secundario Anti-ratón con peroxidasa de rábano.
- Agitador de micro placas.
- Solución químico luminiscente PREMIUM LI-COR.
- Scanner C-Digit Blot.
- Software image studio versión 4.0.
- Membranas de PVDF (Inmobilon Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- Buffer de carga Laemmli 2x (Bio-rad laboratories, Hercules, California, USA)
- Buffer RIPA 1X (life technologies, Carlsbad, California, USA)
- Marcador de peso molecular (Bio-rad laboratories, Hercules, California, USA)
- Anticuerpo primario monoclonal de ratón Cox-1 y Cox-2 (Sigma-aldrich, St. Louis, USA) y
- Anticuerpo secundario anti-ratón con peroxidasa de rábano (Sigma-aldrich, St. Louis, US

16 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

Impresión 3D de andamios a base de Ácido Poliláctico

Los andamios fueron impresos en 3D, con una impresora comercial (Makerex, Gto, México), con resolución X Y 0.0125mm, fueron elaborados con ácido poliláctico convencional mediante el método de fabricación de filamentos fundidos con ácido poliláctico convencional, el material debe calentarse de 210 a 230 °C para su extrusión y mediante coordenadas realizadas previamente se formara un andamio con un diámetro de 10x10x0.5 cm en aproximadamente 20 minutos y se polimerizará por policondensación. La impresión de los andamios se debe realizar dentro de una campana de flujo laminar horizontal con previa desinfección de todos los componentes y bajo irradiación UV.⁽⁷²⁾ Antes de que los andamios entraran en contacto con las células, estos fueron puestos dentro de tubos cónicos Eppendorf de 10 mL con metanol al 100% y se colocaron por 5 minutos en el ultrasonido, posteriormente fueron esterilizados durante 20 minutos.

Obtención y aislamiento de las hDPSC

El protocolo para el aislamiento, cultivo y caracterización de células madre de la pulpa dental humana fue evaluado por el comité de bioética de la ENES, Unidad León de la UNAM para su autorización.

Se utilizaron terceros molares permanentes retenidos o erupcionados indicados para odontectomía en las clínicas de la ENES Unidad León de pacientes de 16-25 años de edad, libres de patología pulpar y periapical.

El tejido pulpar fue aislado dentro de la campana de flujo laminar horizontal previamente desinfectada con luz UV, se lavó el diente 3 veces con PBS removiendo los restos de tejido hematopoyético, se realizó un corte transversal a nivel de la corona anatómica con un disco de diamante a baja velocidad y con refrigeración para separar la corona de la raíz, el corte no debe tocar la cámara pulpar, se procedió a fracturar la corona de la raíz con una espátula 7A o un elevador recto, se retiró con mucho cuidado la pulpa cameral y radicular con pinzas de disección.

Para la disgregación enzimática se colocó el tejido pulpar sobre un porta objetos de vidrio, se realizaron explantes de 1x1 mm con una hoja de bisturí, se depositaron los explantes en platos de cultivo de 10 cm, se inoculó en medio de cultivo α -MEM suplementado con el 20% de suero fetal bovino, glutamina y antibiótico (Gibco), se e incubaron a 37°C con el 5% de CO₂ y en atmósfera húmeda sin mover el plato de cultivo durante 7 días. Posterior a este periodo, se realizó la visualización de la migración de células adherentes a partir del explante a lo largo de la caja Petri y se reemplazó el medio de cultivo inicial por un volumen de medio fresco, cuidando no desalojar los explantes. Después de la semana inicial y el primer medio de cambio de cultivo, este se reemplazó cada dos semanas hasta que las células proliferaron alcanzando una confluencia de aproximadamente un 80% y se observó morfología fibroblastoide de estas (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. Se realizó un

subcultivo retirando el medio de cultivo con bomba de vacío, se lavó 2 veces con 4 ml de PBS, se añadieron 5 mL de Tripsina-EDTA, se incubó por un lapso de 5 minutos a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, se observó el desprendimiento bajo el microscopio, donde se identificó la presencia redondeada y altamente refractante de los cuerpos celulares, se agregaron 3 mL de medio fresco para inactivar la Tripsina, se realizó un pipeteado con la finalidad de conseguir la resuspensión completa de las células, se realizó un conteo celular con el hematocitómetro de Neubauer de la cantidad de células a inocular, posteriormente se tomaron 10 µL de la muestra de hDPSC y se pipeteó cuidadosamente en uno de los extremos del cubreobjetos, se inocularon 1x10⁵-2x10⁵ células/mL, se añadieron 6-10 mL de medio de cultivo para completar el medio y se colocaron los platos en la incubadora bajo las mismas condiciones iniciales que los cultivos primarios.

Caracterización de hDPSC sobre el andamio 3D de PLA

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

1. Subcultivar hDPSC en DMEM+10% FBS+antibióticos+I-glutamina a una densidad de 3x10⁵ células/mL en platos de cultivo de placas de 6 pocillos e incubadas a 37°C con 5% CO₂ hasta observar una confluencia celular del 80-100%.

DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA:

Esta diferenciación fue realizada en 6 andamios rígidos de PLA.

2. Retirar el medio de cultivo.
3. Lavar dos veces con PBS.
4. Agregar medio de diferenciación osteogénica con α -MEM [SFB 10%, penicilina y estreptomycin (1%), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/mL)]
5. Reemplazar el medio cada segundo día durante 4 semanas o hasta que se observen cúmulos de minerales y cristales birrefringentes al microscopio.
6. Interrumpir la diferenciación con una tinción de rojo de Alizarina (40 mM) en NaH₂PO₄ (0.1 M) y un pH de 4,3.
7. Lavar las células dos veces con PBS.
8. Fijar con etanol al 70% (v/v) por 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavar dos veces con PBS y finalmente lavar 5 veces con agua bidestilada.
10. Agregar 0.25 mL de rojo de Alizarina por 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavar dos veces con PBS y finalmente lavar cinco veces con agua bidestilada.

12. Observar en microscopio e identificar estructuras mineralizadas de apariencia rojiza.

DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

Esta diferenciación fue realizada en 4 andamios rígidos y 2 semirrígidos de PLA.

2. Retirar el medio de cultivo.
3. Lavar dos veces con PBS.
4. Agregar medio de diferenciación adipogénica con α -MEM [SFB 10%, penicilina y estreptomicina (1%), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/mL)] adicionado con insulina y L-glutamina.
5. Reemplazar el medio cada segundo día durante 4 semanas.
6. Lavar dos veces con PBS.
7. Agregar medio de cultivo con una solución de rojo aceitoso (0.3 g) en isopropanol 60% v/v (100mL) durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Lavar dos veces con PBS.
9. Observar bajo microscopia de contraste de fases la presencia de depósitos de lípidos en coloración rojo a naranja.

DIFERENCIACIÓN CONDROGÉNICA

Esta diferenciación fue realizada en 6 andamios rígidos de PLA.

1. Subcultivar células en platos de cultivo de placas de 6 pocillos en forma de microgota o micromasa con medio de diferenciación con α -MEM [SFB 10%, penicilina y estreptomicina (1%), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/mL), proteína morfogenética ósea (BMP-1 o 4)] e incubar.
2. Reemplazar el medio cada segundo día durante 4 semanas.
3. Lavar las células dos veces con PBS.
4. Fijar con etanol al 70% v/v por 10 minutos.
5. Lavar una vez con PBS.
6. Agregar 0.15 ml de safranina O (0.1%) por 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar cinco veces con 0.15 mL etanol al 100%.

8. Lavar cinco veces con agua bidestilada y se observar bajo el microscopio de contraste de fases e identificar glucosaminoglicanos de apariencia azul en el cromosoma cultivado.

Identificación del mecanismo pro-inflamatorio de hDPSC sobre el andamio.

Ensayo pro-inflamatorio mediante kit ELISA para detección de PGE₂

Para la detección de PGE₂ se utilizó un kit ELISA, se inocularon 2x10⁶ células/mL de acuerdo con los datos obtenidos previamente en la curva dosis-respuesta. Se analizaron y promediaron 7 muestras: 1 de hDPSC, 2 de hDPSC sobre el andamio de PLA, 2 de hDPSC más IL-1 β y 2 de hDPSC sobre el andamio de PLA más IL-1 β a una concentración de 3 ng/mL durante 48 horas como control positivo y las células sin exposición a IL-1 β se utilizaron como control negativo para hacer la comparación.

Posterior al periodo de incubación de las células, se recolectó el sobrenadante de cada muestra para determinar la cantidad de PGE₂ que produjo cada una siguiendo el protocolo descrito por el fabricante para la ejecución del ensayo. La curva estándar se realizó en 7 tubos para centrífuga de 15 mL.

Se utilizó un microplato de 96 pocillos incluido en el kit y se colocaron 100 μ L de cada muestra y 100 μ L de estándares en su respectivo pocillo. Se agregaron 50 μ L de conjugado y 50 μ L de anticuerpo como lo indica el fabricante. Se cubrió el plato de la luz y se colocó en agitación durante 2 horas a 500 rpm, después se realizaron 3 lavados con la solución incluida en el kit, se retiró completamente esta solución y se agregaron 200 μ L de sustrato a los pocillos, posterior a esto, se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se agregaron 50 μ L de solución stop y se leyó inmediatamente el plato a 405 nm en el espectrofotómetro de UV-visible Multiskan TM GO.

WESTERN BLOT

Para realizar el protocolo de Western Blot, se utilizó IL-1 β para inducir a un estado pro-inflamatorio de las células y se observó la expresión de COX 1, COX 2 por electroforesis (SDS-PAGE poliacrilamida)-transferencia proteica a membranas de difluoruro de polivinilideno mediante método húmedo.

Se inocularon 24x10⁶ células/mL de hDPSC en un plato de 12 pocillos y estas se incubaron durante 48 horas, después de este tiempo se reemplazó el medio de cultivo y las muestras fueron añadidas en las dosis seleccionadas, utilizando como controles negativos células sin tratamiento (4 muestras de hDPSC y 4 de hDPSC sobre los andamios de PLA) y células inflamadas con IL-1 β como controles positivos (4 muestras de hDPSC y 4 de hDPSC sobre los andamios de PLA).

Las células se incubaron las durante 24 horas, después de este periodo se realizó la lisis y extracción de proteína, se lavaron 3 veces las células con PBS, se añadieron 300 μ L de Buffer RIPA 1X a cada pocillo y se incubaron en hielo frapeé durante 15 minutos. Las células fueron raspadas con una espátula flexible previamente esterilizada, los platos se observaron bajo el microscopio para verificar el desprendimiento celular y se colocaron en tubos de centrifuga, se sonicaron durante 15 segundos y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente se recolectó el sobrenadante de cada muestra y se colocaron en tubos Eppendorf y se almacenaron a -20°C.

Se utilizó el método de Bradford para la cuantificación de proteínas, utilizando Albúmina Bovina sérica para realizar la curva estándar, se leyeron las diluciones con diferentes concentraciones cada una en el espectrofotómetro a 595 nm, los datos fueron graficados y se obtuvo la regresión lineal de la curva y la ecuación de la recta fue utilizada para calcular la concentración de las muestras.

Para realizar la electroforesis se utilizó la técnica SDS-PAGE, usando geles de poliacrilamida al 12%. Utilizando la curva estándar se determinó cargar 50 μ g/ μ L de proteína a cada una de las muestras a analizar. Previo a la carga en el gel, las muestras se prepararon utilizando buffer de carga Laemmli 2x con mercaptoetanol, se centrifugaron durante 5 segundos y se calentaron a 100°C durante 5 minutos. El primer pocillo se reservó para colocar 10 μ L de marcador de peso molecular, después de añadir el resto de las muestras el gel se corrió a 175 V durante 1 hora. Después se realizó la transferencia húmeda a las membranas de PVDF a 100 V durante 45 minutos. El gel fue teñido con rojo Ponceau para comprobar que la transferencia de las proteínas a la membrana hubiera resultado efectiva. Después se realizaron lavados de la membrana con TBS 1X más twin 20 al 1% y se agregó la solución de bloqueo compuesta por 1.5g de leche descremada más 30 mL de solución TBS 1X más tween 20 al 1%. Se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, posteriormente se realizaron 2 lavados con TBS 1X más twin 20 al 1%, cada lavado de 10 minutos. Se añadió el anticuerpo primario adicionado con anticuerpo primario monoclonal de ratón Cox-1 o Cox-2 según las indicaciones del fabricante y se deja en agitación por overnight con una cubierta para evitar la evaporación. Se realizan 2 lavados con TBS 1X más twin 20 al 1% durante 10 minutos cada uno y se agregó anticuerpo secundario anti-ratón con peroxidasa de rábano según las indicaciones del fabricante y se deja en agitación durante 1 ½ horas. Después realizar dos lavados con TBS 1X más twin 20 al 1%. Colocar la membrana de PDVF en un contenedor plástico con solución quimiolumincente PREMIUM LI-COR, previamente preparada con las instrucciones del fabricante (relación 1:1). La membrana se coloca en el scanner C-Digit Blot y analizar con el software image studio versión 4.0 para la obtención de imágenes.

Capítulo 4

17 RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de hDPSC

Se observó que la cantidad de células obtenidas del tejido pulpar de terceros molares aumenta a medida que aumenta el tiempo de incubación. Bajo microscopía óptica se observó que las células emigraron desde la superficie de los explantes. A los 7 días de cultivo se observaron las células dispersas adheridas al fondo del plato de cultivo y éstas muestran morfología fibroblastoide con contorno fusiforme con uno o dos núcleos ovalados o elípticos y proyecciones fibroblásticas en toda la superficie de la célula, a los 15 días se observan conexiones a través de las prolongaciones fibroblásticas de la superficie celular. A los 21 días se observa una confluencia una alta confluencia celular y un cambio en la morfología de las 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 la misma dirección (figura 3).⁽⁵⁰⁾

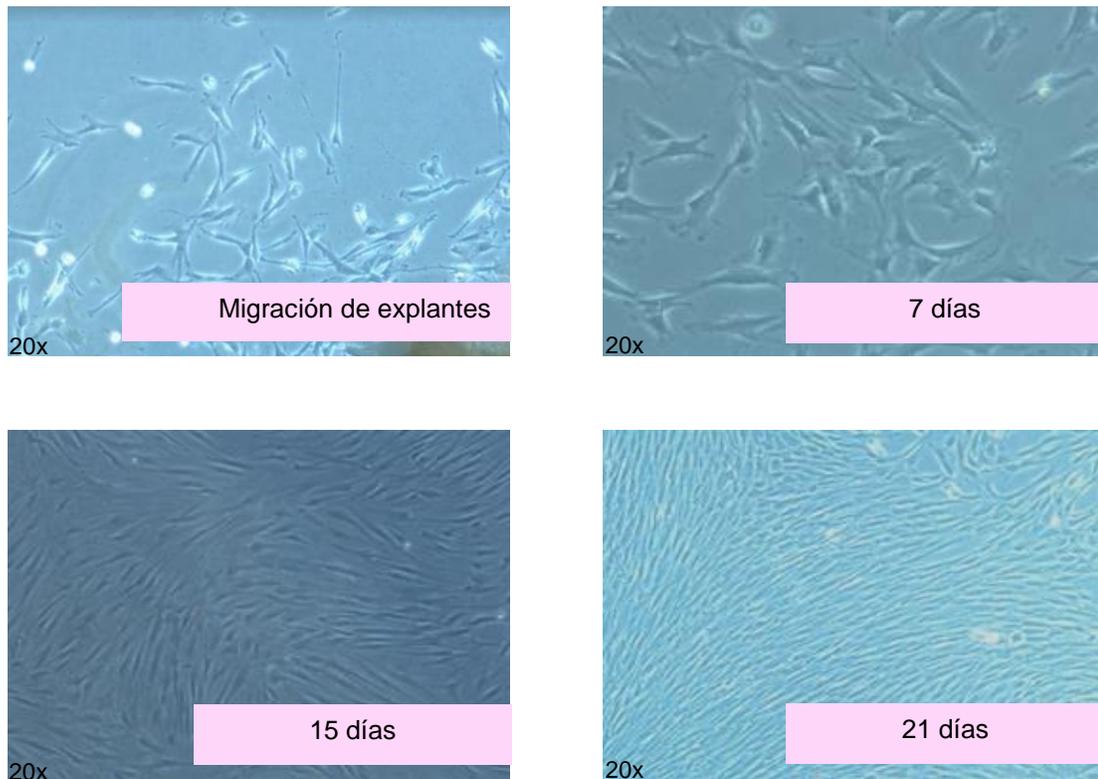


Figura 3. Microfotografías de tiempo de incubación. **Fuente:** Guerrero M. García R., (2020), Aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana de terceros molares. (Tesis de licenciatura).

Entre los 15 o 21 los explantes fueron expuestos a agentes osteogénicos, adipogénicos y condrogénicos y se observó una diferenciación celular exitosa hacia estos linajes (figura 4).

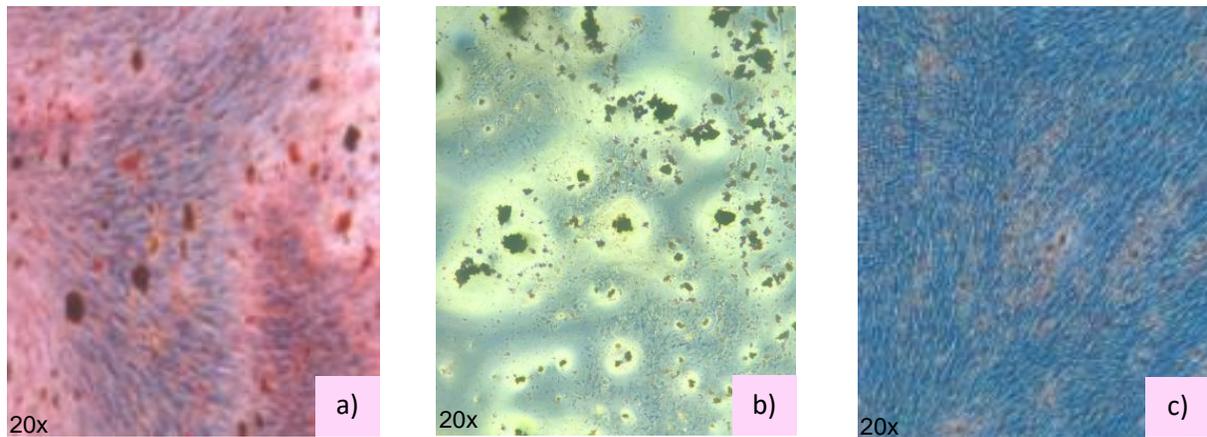


Figura 4. Diferenciación celular a) Osteogénica b) Adipogénica y c) Condrogénica. **Fuente:** Guerrero M. García R., (2020), Aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana de terceros molares. (Tesis de licenciatura).

Impresión 3D de andamios de PLA

Los andamios de ácido poliláctico tienen una rugosidad promedio de 10 μm , porosidades de 100 μm , y un relleno del 95% de ácido poliláctico.⁷²

Determinación de la diferenciación multilínea de hDPSC sobre el andamio

DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

La diferenciación osteogénica se determinó por medio de la detección de la enzima fosfatasa alcalina, marcador temprano del fenotipo osteoblástico, y la mineralización de la matriz extracelular como marcador de la funcionalidad celular en medio osteogénico, se observaron 6 andamios con hDPSC bajo microscopía de contraste de fases y se identificaron cúmulos de minerales y cristales birrefringentes al microscopio de apariencia rojiza, esto debido a la tinción con rojo de alizarina, esto nos indica la presencia de células osteogénicas.

DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

Durante el proceso de diferenciación adipogénica, las células forman vacuolas de lípidos, se observaron 4 andamios con hDPSC bajo microscopía de contraste de fases, se detectó la presencia de depósitos de lípidos en coloración rojiza posterior a la solución saturada de rojo aceitoso, la cual es una tinción que tiñe específicamente los lípidos mediante solubilidad selectiva, gracias a esto, se pudo evidenciar la diferenciación de las células hacia el linaje adipogénico.

DIFERENCIACIÓN CONDROGÉNICA

La presencia de condrocitos fue detectada por tinción de Safranina O, la cual es un colorante básico que tiñe la matriz secretada por estas células, permite detectar glicosaminoglicanos y proteoglicanos, se observaron 6 andamios con hDPSC bajo el microscopio de contraste de fases y se identificaron glucosaminoglicanos de apariencia azul, lo cual es un marcador positivo de la presencia de células condrogénicas.

Las imágenes de los diferentes tipos de diferenciación, se muestran en la figura 5.

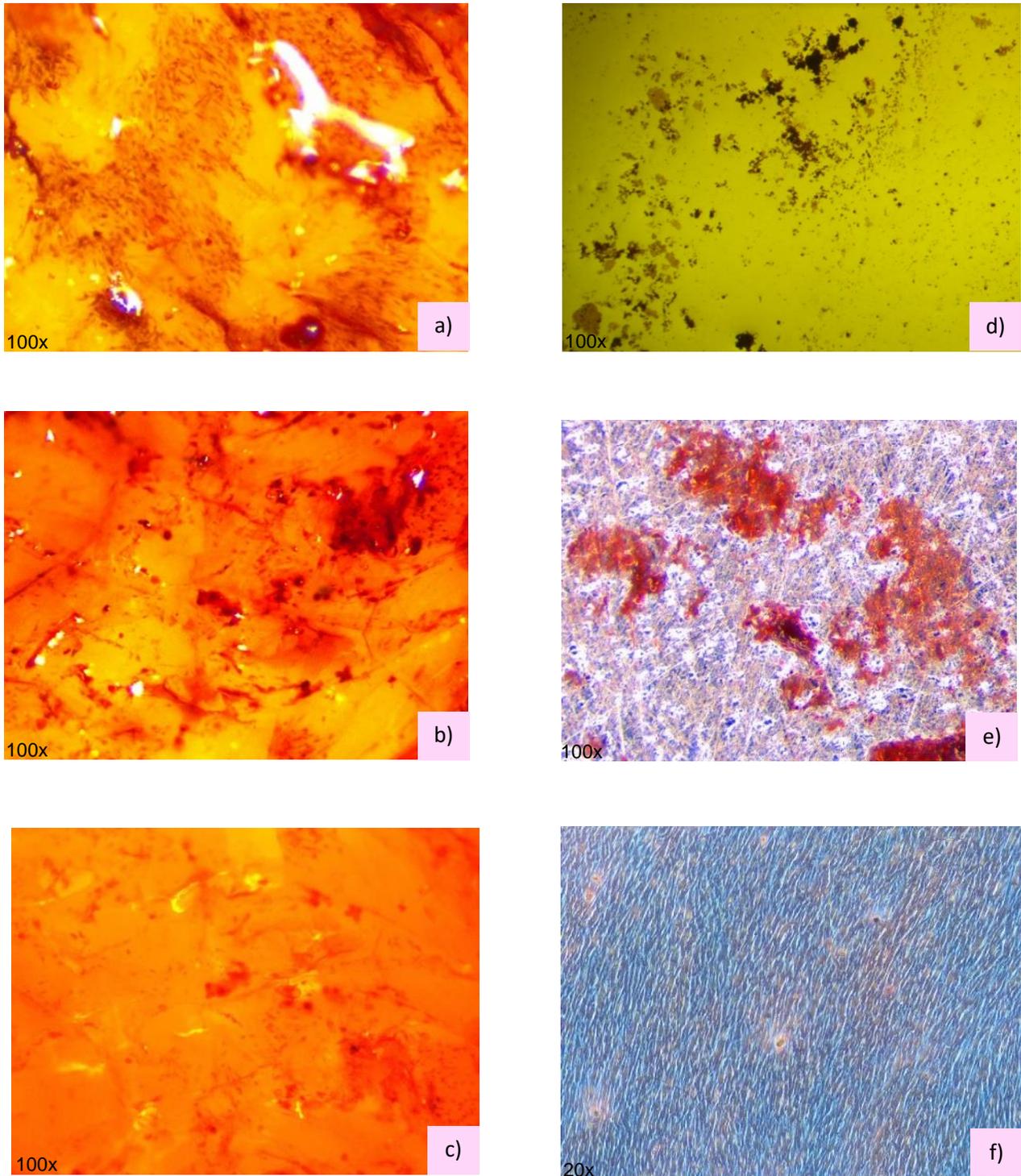


Figura 5. Diferenciación a) osteogénica, b) adipogénica y c) condrogénica de las hDPSC sobre el andamio y diferenciación d) osteogénica, e) adipogénica y f) condrogénica de las células aisladas 100x. **Fuente:** Directa.

Identificación del mecanismo pro-inflamatorio de hDPSC sobre el andamio.

Ensayo ELISA

La producción de PGE_2 puede observarse en la figura 6. Las muestras positivas corresponden a las células expuestas a $\text{IL-1}\beta$ para inducir a un estado pro-inflamatorio de las mismas, y las que no fueron expuestas a $\text{IL-1}\beta$ corresponden a las muestras negativas. Se evaluó la producción de PGE_2 en siete muestras con el fin de realizar una comparación de la producción de PGE_2 de las células cuando se encuentran en contacto con el andamio de PLA y de las células por sí solas.

Se puede corroborar que en presencia de una citocina pro-inflamatoria como la $\text{IL-1}\beta$ se incrementa la producción de PGE_2 , es importante puntualizar que en las muestras donde las células se encuentran en contacto con el andamio de ácido poliláctico hay un ligero incremento de PGE_2 en comparación a las células que se encuentran aisladas, lo cual se interpreta como un aumento de la inflamación en estas, teniendo un valor estadístico de $p < 0.05$. La desviación estándar de la cantidad de PGE_2 producida en cada muestra con respecto a su promedio es de 0.46 ng/mL. (Figura 6)

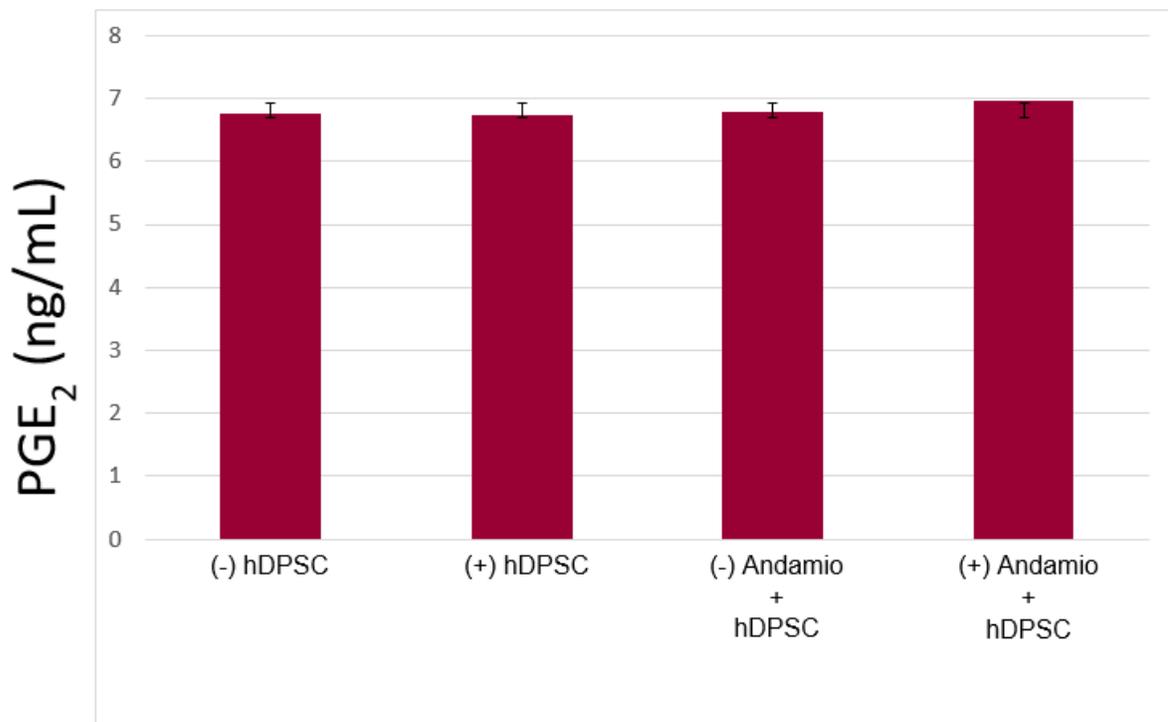


Figura 6. Producción de PGE_2 de hDPSC aisladas y en contacto con el andamio de PLA.
Fuente: Directa

Ensayo Western Blot

Se evaluaron 8 muestras, 2 de hDPSC, 2 de hDPSC sobre el andamio, 2 de hDPSC con IL-1 β y 2 de hDPSC sobre el andamio e IL-1 β .

Ambas ciclooxigenasas tienen una afinidad similar por el ácido araquidónico. La expresión de cox-1 en hDPSC se observa en la imagen a) y la expresión de cox-2 corresponde a la imagen b). Es importante identificar la expresión protéica ya que se puede establecer una relación con la producción de PGE₂ encontrada en el ensayo ELISA, en ambos ensayos se mostró una mayor expresión de proteínas inflamatorias, en este caso de ciclooxigenasa 1 y 2 en las muestras que se encuentran en contacto con el andamio de ácido poliláctico en las cuales se utilizó IL-1 β como inductor pro-inflamatorio. (Figura 7)

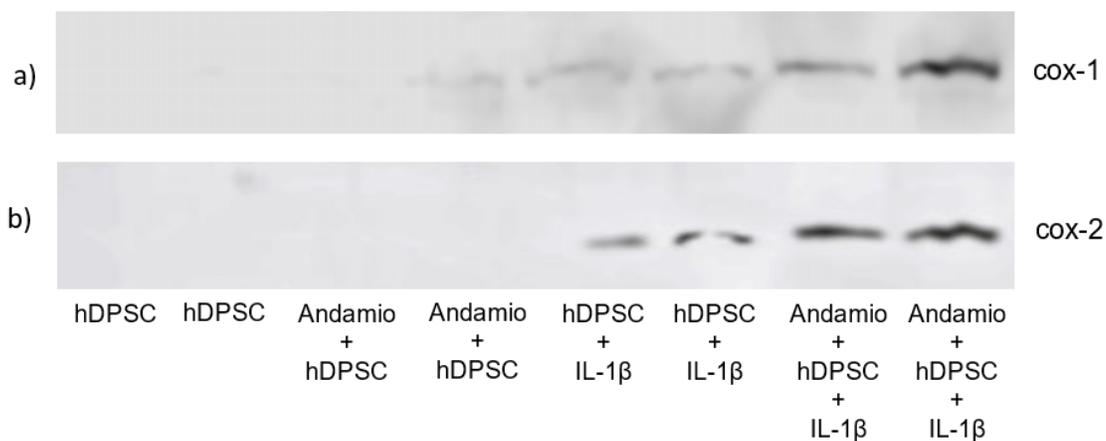


Figura 7. Producción de cox-1 y 2 de hDPSC aisladas y en contacto con el andamio de PLA.

Fuente: Directa

18 DISCUSIÓN

Aislamiento y diferenciación de hDPSC

Las células madre de la pulpa dental han demostrado que pueden resolver todas estas cuestiones: el acceso al lugar donde se encuentran estas células es fácil y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular.⁽³³⁾ Pisciotta A., et al 2015 demostró la diferenciación multilineaje de las células de tejido pulpar humano y estas células demostraron ser capaces de diferenciarse hacia linajes osteogénicos, adipogénicos y miogénicos, pero también tienen la capacidad de diferenciarse a otros linajes.⁽⁷⁶⁾

Para la obtención de las hDPSC utilizadas en este trabajo, se siguió el protocolo para la obtención y aislamiento de éstas células propuesto por el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES, Unidad León de la UNAM, en el cuál se aislaron células madre de terceros molares con indicación de extracción, gracias a su localización anatómica, estas demostraron ser de fácil acceso y de bajo costo, a su vez, demostraron tener capacidad de multidiferenciación a distintos linajes celulares.

Diferenciación de hDPSC sobre el andamio

Brizuela C., et al 2013 comprobó la biocompatibilidad de las células madre mesenquimales de tejido gingival humano con el andamiaje de polímero sintético de ácido poliláctico.⁽¹³⁾

El andamiaje de polímero sintético de ácido poliláctico muestra biocompatibilidad con las células madre mesenquimales de tejido gingival humano. El ácido poliláctico es un biomaterial que permite el transporte celular y ofrece una viabilidad (83,32%), lo que lo convierte en un candidato para procedimientos regenerativos en conjunto con células madre mesenquimales.⁽³²⁾

Para llevar a cabo este estudio, se siguió el protocolo establecido en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES, Unidad León, UNAM para el aislamiento y caracterización de hDPSC aisladas y en contacto con andamios 3D de ácido poliláctico realizados en el mismo, mostrando resultados favorables en la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

Expresión pro-inflamatoria

La importancia clínica de la utilización de IL-1 β es que esta es una citocina pro-inflamatoria, estas estimulan a los macrófagos y a otras células para producir cantidades importantes de prostaglandinas, en particular PGE₂. Las prostaglandinas actúan sobre los fibroblastos y osteoclastos, junto con las citocinas, para inducir la producción de metaloproteinasas de la matriz, lo cual es relevante para el recambio tisular y para el proceso destructivo periodontal. Además se ha encontrado IL-1 β en el líquido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal, diversos estudios muestran una relación entre los niveles de esta citocina y el estado periodontal del paciente, en este proceso inflamatorio la IL-1 β es uno de los compuestos encargados de iniciar la destrucción de los tejidos de inserción del diente.⁽⁷⁷⁾

Diversos autores han señalado la relación de cox-1 y 2 con la producción de PGE₂, sin embargo, cox-1 es más reconocida por su participación en funciones fisiológicas en condiciones normales, por lo que la expresión de esta enzima no necesariamente se relaciona directamente con el proceso de inflamación y cox-2 es la que guarda una relación más directa con la producción de PGE₂ y con los procesos inflamatorios.⁽⁵³⁾

Al realizar los ensayos de ELISA y cox-1 y 2 se observó un patrón, que se repitió en ambos, ya que, aunque todas las muestras a las que se les agregó IL-1 β para inducir a un estado pro-inflamatorio mostraron aumento en la expresión de estas proteínas, las muestras en las que hay mayor aumento de éstas, fueron en las que las células que se encontraban en contacto con el andamio de ácido poliláctico adicionadas con IL-1 β . Una observación importante es que la expresión de cox-1 es un poco más notoria, esto podría deberse, sin ser la única explicación, a que el tiempo de vida media de cox-1 es significativamente mayor al de cox-2.⁽⁷⁸⁾

Limitantes de estudio

Durante la realización de este estudio, se presentó una limitante de estudio durante la diferenciación adipogénica, ya que utilizamos andamios semirrígidos de PLA y al momento de realizar la tinción y los lavados para su posterior observación en el microscopio, estos absorbieron demasiado la tinción y fue imposible visualizar las células, por lo tanto, en este experimento únicamente se analizaron cuatro andamios bajo el microscopio, ya que dos eran de PLA semirrígido. Es importante mencionar que además de haber realizado las pruebas de cox-1 y 2, hubiera sido idóneo hacerlo con alguna proteína constitutiva como la β -actina, lo cual es utilizada para verificar que se haya cargado la misma cantidad de proteínas en cada carril, esto hubiera dado mayor impacto y validez al ensayo, sin embargo, por cuestiones de disponibilidad en el laboratorio, dicho ensayo no se muestra en este proyecto. Hubo algunos factores que alteraron los resultados del ensayo, entre ellos que el agitador se detuvo durante el tiempo de exposición de los anticuerpos en las membranas de PVDF, por lo cual, se tuvieron que desechar esos resultados y realizar nuevamente el ensayo, por lo que este se repitió menos veces de las que se pensaron en un principio por cuestión de tiempo.

Perspectivas a futuro

La multidiferenciación de las CM puede dar como resultado una población celular con características morfológicas y funcionales estables, logrando obtener células de reemplazo, lo cual les confiere cualidades que las posicionan como una posibilidad en la terapia de diversas enfermedades, en la actualidad son la base de numerosas investigaciones en el área de terapia celular y medicina regenerativa.⁽⁷⁹⁾

Se espera que a partir de este estudio, se generen nuevas investigaciones en el laboratorio de la ENES, Unidad León de la UNAM, y así fortalecer esta línea de investigación, se podría contemplar estudiar los linajes celulares por separado y evaluar cuál de ellos tiene mayor rango de diferenciación sobre el andamiaje de ácido poliláctico, a su vez, cuál es el que muestra mayor aumento en la inflamación. Para así seguir avanzando en los conocimientos de las propiedades de estas células al interactuar con este biomaterial y así contribuir con el avance de las terapias celulares.

19 CONCLUSIONES

Los andamios impresos en 3D de ácido poliláctico convencional mostraron efectos favorables en la interacción con hDPSC en la diferenciación a linajes celulares osteogénico, adipogénico y condrogénico, lo que los convierte en un material óptimo para la diferenciación multilinaje.

En cuanto a la expresión de proteínas inflamatorias, se notó un ligero aumento de la producción de éstas en ambos ensayos cuando las células estaban en contacto con el andamio de PLA, sin embargo, considero que sería posible realizar este experimento con un mayor número de muestras, para así poder evaluar con un tamaño de muestra mayor la comparación de la expresión de dichas proteínas que las células muestran por sí solas y las que expresan a estar en contacto con el andamio.

Sería interesante realizar este estudio *ex vivo* e *in vivo* más adelante, ya que de obtener resultados favorables estos serían una gran aportación para el área de medicina regenerativa y la ingeniería tisular no sólo en la odontología sino también en otras áreas biomédicas.

Gracias a los resultados obtenidos en este estudio podemos sugerir que los andamios pueden ser una buena opción como biomaterial para la odontología regenerativa y las hDPSC de terceros molares en conjunto con este, tienen un gran potencial para su aplicación en regeneración de tejido cartilaginoso, óseo y adiposo. Lo cual en un futuro y con más estudios sobre este tema, nos permitirá brindarle a los pacientes alternativas de tratamiento innovadoras para la regeneración de tejidos que se hayan perdido por diversos factores, como caries o traumatismos que afecten a los tejidos de soporte del diente.

20 BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández Ramírez, P. (2009). Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 25(1), 0-0.
2. Hernández Ramírez, Porfirio. (2011). Medicina regenerativa y aplicaciones de las células madre: una nueva revolución en medicina. *Revista Cubana de Medicina*, 50(4), 338-340. Recuperado en 31 de enero de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232011000400001&lng=es&tlng=es.
3. De Ferraris, M. E. G., & Muñoz, A. C. (2009). *Histologa, embriologa e ingeniera tisular bucodental/Histology, embryology and oral tissue engineering*. Ed. Médica Panamericana.
4. Atala A. (2007). Engineering tissues, organs and cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(2), 83–96. <https://doi.org/10.1002/term.18>
5. Colorado, Ana Cristina, Agudelo, Carlos Andrés, & Moncada A., María Elena. (2013). ANÁLISIS DE BIOMATERIALES PARA USO EN INGENIERÍA DE TEJIDO DE PIEL: REVISIÓN. *Revista Ingeniería Biomédica*, 7(14), 11-23. Retrieved January 31, 2021, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S190997622013000200002&lng=en&tlng=es
6. Navarro, DM (2015). Medicina Regenerativa aplicada en el tratamiento de defectos óseos del complejo craneofacial. *Revista Cubana de Estomatología*, 52 (1), 63-78.
7. Morales Navarro, D. (2014). Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. *Revista Cubana Estomatol*, 51(3), 26-32. Recuperado de <http://www.revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/364/80>
8. Kretlow, JD, Young, S., Klouda, L., Wong, M. y Mikos, AG (2009). Biomateriales inyectables para la regeneración de tejidos craneofaciales complejos. *Materiales avanzados*, 21 (32-33), 3368-3393.
9. Hart, DW, Wolf, SE, Chinkes, DL, Gore, DC, Mlcak, RP, Beauford, RB, ... y Herndon, DN (2000). Determinantes del catabolismo del músculo esquelético después de una quemadura grave. *Anales de cirugía*, 232 (4), 455.
10. MacNeil, S. (2007). Progreso y oportunidades para la piel con ingeniería de tejidos. *Nature*, 445 (7130), 874-880.
11. César-Juárez, Ángel Adrián, Olivos-Meza, Anell, Landa-Solís, Carlos, Cárdenas-Soria, Víctor Hugo, Silva-Bermúdez, Phaedra Suriel, Suárez Ahedo, Carlos, Olivos Díaz, Brenda, & Ibarra-Ponce de León, José Clemente. (2018). Uso y aplicación de la tecnología de impresión y bioimpresión 3D en medicina. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 61(6), 43-51. <https://doi.org/10.22201.fm.24484865e.2018.61.6.07>
12. Krebsbach, PH y Robey, PG (2002). Células madre dentales y esqueléticas: posibles terapias celulares para la regeneración craneofacial. *Revista de educación dental*, 66 (6), 766-773.
13. Brizuela C, Claudia, Galleguillos G, Sussy, Carrión A, Flavio, Cabrera P, Carolina, Luz C, Patricia, & Inostroza S, Carolina. (2013). Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes

- de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *International Journal of Morphology*, 31(2), 739-746. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200063>
14. Orta, L. J. G., Rytzner, A. F., & de Nova García, J. (2011). Investigación con células madre de origen dentario. Actualización. *Gaceta dental: Industria y profesiones*, (223), 118-129.
 15. Guadix, JA, Zugaza, JL y Gálvez-Martín, P. (2017). Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Medicina Clínica (edición en inglés)* , 148 (9), 408-414.
 16. Hernández Ramírez, P. (2006). Medicina regenerativa II: Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 22(1), 0-0.
 17. Falke, G. F., & Atala, A. (2000). Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch argent pediatr*, 98(2), 103-105.
 18. Heineken, FG y Skalak, R. (1 de mayo de 1991). "Ingeniería de tejidos: una breve descripción". *J Biomech Eng* . Mayo de 1991; 113 (2): 111–112. <https://doi.org/10.1115/1.2891223>
 19. Kretlow, JD, Young, S., Klouda, L., Wong, M. y Mikos, AG (2009). Biomateriales inyectables para la regeneración de tejidos craneofaciales complejos. *Materiales avanzados* , 21 (32-33), 3368-3393.
 20. Rosales Ibáñez, R., Alvarado Estrada, K. N., & Ojeda Gutiérrez, F. (2012). Ingeniería tisular en Odontología. *Revista ADM [internet]*. Julio-agosto, 164-67.
 21. Rezwan, K., Chen, QZ, Blaker, JJ y Boccaccini, AR (2006). Andamios compuestos inorgánicos / polímeros porosos biodegradables y bioactivos para la ingeniería de tejidos óseos. *Biomateriales* , 27 (18), 3413-3431.
 22. Atala, A. (2007). Ingeniería de tejidos, órganos y células. *Revista de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa* , 1 (2), 83-96.
 23. Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. J., & Sánchez-Monroy, V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*, 27(3), 194-199.
 24. Chavarri, M. V., Figal, D. P., Cardoso, F. P., Montañés, J. M., Olmos, D. G., & Albacar, J. B. (2005). Medicina regenerativa con células madre adultas. *Revista clinica espanola*, 205(11), 556-564.
 25. Yamanaka, S. (2012). Células madre pluripotentes inducidas: pasado, presente y futuro. *Célula madre celular* , 10 (6), 678-684.
 26. Hernández Ramírez, P., & Dorticós Balea, E. (2004). Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*, 20(3), 0-0.
 27. Alison, MR e Islam, S. (2009). Atributos de las células madre adultas. *The Journal of Pathology: una revista de la Sociedad de Patología de Gran Bretaña e Irlanda* , 217 (2), 144-160
 28. González L, Font A, de Nova J. Investigación de células madre. Actualización. *Gaceta dental* 2011 223:118-129
 29. Hernández Ramírez, P., & Dorticós Balea, E. (2004). Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*, 20(3), 0-0.
 30. Arévalo Romero, J. A., Pardo, V. M., & Paéz Guerrero, D. M. Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Clinical Applications.

31. Dominici, MLBK, Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, FC, Krause, DS, ... y Horwitz, EM (2006). Criterios mínimos para definir células estromales mesenquimales multipotentes. Declaración de posición de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Citoterapia* , 8 (4), 315-317.
32. Rodríguez - Lozano, FJ, Bueno, C., Insausti, CL, Meseguer, L., Ramirez, MC, Blanquer, M., ... y Moraleda, JM (2011). Células madre mesenquimales derivadas de tejidos dentales. *Revista internacional de endodoncia* , 44 (9), 800-806.
33. d'Aquino, R., Papaccio, G., Laino, G. y Graziano, A. (2008). Células madre de la pulpa dental: una herramienta prometedora para la regeneración ósea. *Revisión de células madre* , 4 (1), 21-26.
34. Brizuela Cordero, C., Saint Jean, N., e Inostroza Silva, C. (2014). Biocompatibilidad de células madres mesenquimales de tejido gingival humano en cultivo con un andamiaje de polímero sintético de ácido poliláctico (OPLA). *Revista Internacional de Morfología* , 32 (3), 767-772.
35. Lanza, R., Langer, R., Vacanti, JP y Atala, A. (Eds.). (2020). *Principios de la ingeniería de tejidos* . Prensa académica.
36. Bairo, F. y Vitale - Brovarone, C. (2011). Andamios tridimensionales derivados del vidrio para la ingeniería de tejidos óseos: tendencias actuales y previsiones para el futuro. *Revista de investigación de materiales biomédicos Parte A* , 97 (4), 514-535.
37. Chen, Q., Liang, S. y Thouas, GA (2013). Biomateriales elastoméricos para ingeniería de tejidos. *Progreso en la ciencia de los polímeros* , 38 (3-4), 584-671.
38. Gallegos Nieto, E., Medellín Castillo, H. I., & De Lange, D. F. (2013). Análisis del desempeño estructural de andamios de hidroxiapatita utilizados en ingeniería tisular. *Ingeniería mecánica, tecnología y desarrollo* , 4(5), 185-194.
39. Labeaga Viteri, A. (2018). Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones.
40. Nair, NR, Sekhar, VC y Nampoothiri, KM (2016). Aumento de un consorcio microbiano para la degradación mejorada de polilactida (PLA). *Revista india de microbiología* , 56 (1), 59-63.
41. Serna, L., & Albán, F. (2003). Ácido poliláctico (PLA): Propiedades y aplicaciones. *Ingeniería y competitividad* , 5(1), 16-26.
42. Rendón, J., Jiménez, L. P., & Urrego, P. A. (2011). Células madre en odontología. (Stem cells in dentistry). *CES Odontología* , 24(1), 51-58.
43. García Contreras et al. Enseñanza práctica del Aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. Manual de prácticas de laboratorio, UNAM 2019
44. Bordés González, R., Martínez Beltrán, M., García Olivares, E., & Guisado Barrilao, R. (1994). El proceso inflamatorio.
45. Pineda Molina, C., & Londoño Peláez, C. (2009). Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. *Revista Ingeniería Biomédica* , 3(5), 58-65.
46. Rodríguez-Pardo VM, Fuentes-Lacouture MF, Aristizabal-Castellanos JA, Paul J, Hernandez V. Aislamiento y caracterización de células "stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Introducción*. 2010; 15: 224–239.

47. Mercado-Rubio, M. D., Rivas-Aguayo, Á. G., López, C. D. F. G., Peñaloza, R., Cuevas, M. C. V. T., Can, G. N., & Junco, B. A. R. ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO PRIMARIO A PARTIR DE LA PULPA DENTAL HUMANA COMO MODELO DE ESTUDIO PARA LA DIFERENCIACIÓN CELULAR. *REVISTA DEL CENTRO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN*, 75.
48. Guzmán-Vázquez, E. (2004). V. Las pruebas de Elisa. *Gaceta Médica de México*, 140(S3), 48-49.
49. Bayúgar, R. C., Martínez, C. R., Miranda, E. M., Martínez, J. A. Á., & Millán, J. V. F. Cultivo de Células Animales y sus Aplicaciones.
50. Guerrero M. García R., (2020), Aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana de terceros molares. (Tesis de licenciatura).
51. Morita, I., Schindler, M., Regier, MK, Otto, JC, Hori, T., DeWitt, DL y Smith, WL (1995). Diferentes ubicaciones intracelulares para la prostaglandina endoperóxido H sintasa-1 y - 2. *Journal of Biological Chemistry* , 270 (18), 10902-10908.
52. Pérez Ruiz, A. O., Padrón, C., Valencia Fernández, V., Sanjurjo Gámez, V., & Ilisástigui Ortueta, T. (1998). Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*, 35(2), 56-61.
53. García Meijide, J. A., & Gómez-Reino Carnota, J. J. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Rev Esp Reumatol*, 27(1), 33-5.
54. Paulino A. (2019). Impacto biológico y antimicrobiano de nanopartículas de Fe₃O₄-quitosán en cultivo con células orales. Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León (Tesis de maestría).
55. Martínez, Ó. N., Ricote, G. C., & Monzón, C. G. (2003). Papel de la ciclooxigenasa 2 en la patogenia de las enfermedades del hígado. *Medicina Clínica*, 121(19), 743-748.
56. Crofford L. J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 49, 15–19.
57. Pisciotta, A., Carnevale, G., Meloni, S., Riccio, M., De Biasi, S., Gibellini, L., ... y De Pol, A. (2015). Células madre de la pulpa dental humana (hDPSC): aislamiento, enriquecimiento y diferenciación comparativa de dos subpoblaciones. *Biología del desarrollo de BMC* , 15 (1), 1-16.
58. La Noce, M., Paino, F., Spina, A., Naddeo, P., Montella, R., Desiderio, V.,... y Laino, L. (2014). Células madre de la pulpa dental: estado del arte y sugerencias para una verdadera traducción de la investigación en terapia. *Revista de odontología*, 42 (7), 761-768.
59. Mahmood, T. y Yang, PC (2012). Western blot: técnica, teoría y resolución de problemas. *Revista norteamericana de ciencias médicas*, 4 (9), 429.
60. Martínez-Canabal, A., & Rivas-Arancibia, S. (2005). Funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 48(5), 210-216.
61. Batlouni, M. (2010). Antiinflamatorios no esteroides: efectos cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. *Arq Bras Cardiol*, 94(4), 538-546.

62. Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, PG y Shi, S. (2000). Células madre de la pulpa dental humana posnatal (DPSC) in vitro e in vivo. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias* , 97 (25), 13625-13630.
63. Huang, GJ, Gronthos, S. y Shi, S. (2009). Células madre mesenquimales derivadas de tejidos dentales frente a las de otras fuentes: su biología y función en la medicina regenerativa. *Revista de investigación dental* , 88 (9), 792-806.
64. Friedlander, LT, Cullinan, MP y Love, RM (2009). Células madre dentales y su papel potencial en la apexogénesis y la apexificación. *Revista Internacional de Endodoncia* , 42 (11), 955-962.
65. Yang, X., Van Der Kraan, PM, Bian, Z., Fan, M., Walboomers, XF y Jansen, JA (2009). Formación de tejido mineralizado por células madre pulpaes transfectadas con BMP2. *Revista de investigación dental* , 88 (11), 1020-1025.
66. Hernández Ramírez, Porfirio, & Dorticós Balea, Elvira. (2004). Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 20(3) Recuperado en 02 de febrero de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000300001&lng=es&tlng=es.
67. Romero, J. A. A., Guerrero, D. M. P., & Pardo, V. M. R. (2007). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Nova*, 5(8).
68. Owen, JTT, Jenkinson, EJ y Kingston, R. (julio de 1983). La ontogenia de los linfocitos T. En *Annales de l'Institut Pasteur / Immunologie* (vol. 134, núm. 1, págs. 115-122). Elsevier Masson.
69. Friedenstein, A. J., AJ, F., & AF, P. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method.
70. Nakata, K., Nakahara, H., Kimura, T., Kojima, A., Iwasaki, M., Caplan, AI y Ono, K. (1992). Expresión de genes de colágeno durante la condrogénesis de células derivadas del periostio de pollo. *Cartas FEBS* , 299 (3), 278-282.
71. d'Aquino, R., De Rosa, A., Laino, G., Caruso, F., Guida, L., Rullo, R., ... y Papaccio, G. (2009). Células madre de la pulpa dental humana: de la biología a las aplicaciones clínicas. *Revista de Zoología Experimental Parte B: Evolución Molecular y del Desarrollo* , 312 (5), 408-415.
72. Calleja N., Guerrero M., Paulino A., Acosta L., Nuñez R., García R., (2018), Impresión 3D de andamios a base de ácido poliláctico y sus efectos en cultivo con células madre dentales. Laboratorio de investigación Interdisciplinaria (LII), Área de Nanoestructuras y Biomateriales, Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León.
73. Fernández, Ana María (2016, Julio) En México, la enfermedad periodontal tiene una prevalencia de 70 por ciento. *Boletín UNAM-DGCS-476*.
74. Wirth, C., & Bouletreau, P. (2012). Cirugía de los traumatismos del macizo facial óseo. *EMC-Cirugía plástica reparadora y estética*, 20(1), 1-24.
75. Sorolla, P. J. P. (2010). Anomalías craneofaciales. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(1), 5-15.

76. Chu, DT, Phuong, TNT, Tien, NLB, Tran, DK, Thanh, VV, Quang, TL,... y Kushekhar, K. (2020). Una actualización sobre el progreso del aislamiento, cultivo, almacenamiento y aplicación clínica de células madre mesenquimales / estromales de la médula ósea humana. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 21 (3), 708.
77. Valderrama, G., Vijande, F., Escribano, J. M., Garrido-Pertierra, A., & Bascones, A. (2005). La IL-1 y su eventual asociación con la enfermedad periodontal crónica: Una revisión de la literatura (I). *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 17(2), 89-95.
78. Gómez-Luque, A. (2005). Inhibidores de la COX ¿hacia dónde vamos? *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 12(6), 321-325.
79. Mata Miranda, M. M., Sánchez Monroy, V., & Vázquez Zapién, G. J. (2014). Investigación básica con células madre pluripotentes en la escuela médico militar. *Rev Sanit Mil*, 68(4), 233-7.