



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

**DIFERENCIACIÓN CELULAR DE hDPSC EN UN CULTIVO CON
BIOPOLÍMERO ENRIQUECIDO CON ÓXIDO DE GRAFENO**

FORMA DE TITULACIÓN:

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

AGUSTIN ALEJANDRO REYES MACIEL

TUTOR: DR. RENÉ GARCÍA CONTRERAS

ASESOR: M.C. CHRISTIAN ANDREA LÓPEZ AYUSO



LEÓN, GTO.

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
CAPÍTULO 1.....	10
MARCO TEÓRICO.....	11
ANTECEDENTES.....	22
CAPÍTULO 2.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	29
CAPÍTULO 3.....	30
MARCO METODOLÓGICO	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA	36
CONCLUSIÓN	49
REFERENCIAS.....	50
ANEXO	56

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, muchas gracias por concederme la oportunidad de formar parte de la máxima casa de estudios de nuestro país.

Al Dr. René García Contreras por enseñarme el camino de las Ciencias Básicas, por apoyarme, brindarme su confianza y permitirme integrar parte del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria.

A la Mtra. Christian Andrea López Ayuso por guiarme durante todo este proceso, por compartir sus conocimientos conmigo, por inculcar en mí un interés por la ciencia, enseñarme a ser persistente y a no ver los errores como algo malo sino como aprendizaje, sin usted la elaboración de este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por ser una excelente maestra.

A la empresa OSFORMA: Salud e Innovación, le expresamos nuestro agradecimiento por el financiamiento con los productos destinados a la ejecución de la investigación.

DEDICATORIA

A mis padres, por siempre estar para mí, ya que sin ellos estoy seguro de que nada de esto hubiera sido posible, por apoyarme tanto emocionalmente como económicamente, por siempre incentivarme a esforzarme y dar lo mejor de mí, por su paciencia y sobre todo por el amor que me han dado.

A mi hermana, por soportar mi mal carácter, por escucharme y darme consejo, por incentivarme a esforzarme y sobre todo por hacerme notar que los problemas son más pequeños de lo que nosotros pensamos.

A mis abuelos, por todo el cariño que me dieron, por siempre recibirme con un abrazo cuando regresaba a Pátzcuaro y que la vida no me permito conservar para que vivieran conmigo este momento.

A Magdalena Vega, por ser mi compañera durante todo este camino llamado Licenciatura en Odontología, por los consejos y siempre apoyarme, por las risas, por ser mi pareja de clínica, y por nuestra amistad, por llevarme al hospital las veces que fueron necesarias, espero seguir contando con tu amistad por lo que reste de vida.

A mis amigos: Fernando Mendoza, Amairani Orozco, Rubén García, Marlen Gonzales, Fernanda Vázquez, Rogelio Duran y Monserrat Ávila, gracias por ser mis amigos durante el transcurso de esta etapa, por las risas, consejos y los viajes, la Universidad jamás hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A Kaori Gonzales, Sofia Torres, Camila Mata y Ximena Madrigal, por ser las mejores roomies y amigas que pude tener, muchas gracias por todos esos momentos en nuestro Refugio, por enseñarme a ser más seguro de mí mismo, por cuidarme cuando me enfermaba, por siempre estar para mí en momentos difíciles.

A Diego Berrueta, por ser el amigo que nunca espere, muchas gracias por todos los consejos, por enseñarme que no nos tenemos que tomar la vida tan seria todo el tiempo y disfrutar cada día como si fuera el último.

A mis profesores, principalmente al Dr. Abraham Mendoza, Dr. Francisco Palacios, Dra. Karla Aguirre, Dr. Federico Corona, Dr. Rogelio Danovan y el Dr. Luis Dugarte, por compartirme sus conocimientos y enseñarme todo lo que se, por formarme como profesional y como mejor persona, gracias por transmitirme su amor y pasión por la odontología y por incentivarme en siempre mantenerse actualizado, ya que nunca dejamos de aprender.

A mis pacientes, por su tiempo, ciertamente son parte sumamente importante en mi Licenciatura, gracias por permitirme atenderlos, por confiar en mí.

LISTA DE ABREVIATURAS

-α-

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

-μ-

μL: Microlitro

-B-

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

-C-

CM: Célula madre

CMM: Célula madre mesenquimal

CO₂: Dióxido de carbono

-E-

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

-G-

g: Gramo

-H-

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

-L-

LOT: Lote

-M-

mg: Miligramo

mL: Mililitro

mm: Milímetro

M: Molar

-N-

Nm: Nanómetro

-O-

ÓG: Óxido de grafeno

-P-

PBS: (Del inglés phosphate buffered saline) Solución salina buffer de fosfato

PMMA: polimetilmetacrilato

-R-

RPM: revoluciones por minuto

-S-

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino.

-T-

TGF- β 1: (Del inglés transforming growth factor) factor de crecimiento transformante beta 1

RESUMEN

Introducción: El PMMA es un material usado amplia y frecuentemente en la odontología, desde su invención hasta el día de hoy, por lo que se ha visto modificado con el objetivo de mejorar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. El óxido de grafeno es un alótropo del carbono el cual ha demostrado ser gran ayuda ya que cuenta con propiedades fisicoquímicas y biológicas de gran interés, entre ellas por ejemplo una alta biocompatibilidad, promueve la adhesión y proliferación celular e incluso induce la diferenciación en células madre, por lo que un PMMA modificado con óxido de grafeno puede ser de gran interés como una alternativa de material.

Objetivo: Identificar la diferenciación celular de hDPSC en un cultivo con biopolímero enriquecido con óxido de grafeno.

Metodología: Se realizó un estudio experimental *in vitro* comparativo, donde se elaboraron muestras de PMMA con las siguientes dimensiones 1.5x10 mm. Se emplearon subcultivos de hDPSC a partir de un subcultivo primario previamente caracterizado considerando los criterios internacionales mínimos establecidos por la declaración internacional de la Sociedad de Terapia Celular, la diferenciación a linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico se realizó por contacto directo e indirecto del subcultivo celular al biopolímero con y sin óxido de grafeno, se colocó medio de diferenciación de dos a cuatro semanas, finalmente, se realizaron tinciones de rojo aceitoso, safranina y rojo de alizarina, respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos correspondientes a la diferenciación osteogénica fueron analizados con prueba t-Student y ANOVA post-hoc de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Resultados y discusión: Los subcultivos de hDPSC que estuvieron en contacto con las muestras de PMMA modificadas con óxido de grafeno mostraron una diferencia favorable a la diferenciación adipogénica y condrogénica. En el caso de la diferenciación osteogénica se realizó una prueba ANOVA encontrando un valor de $p < 0.05$, donde se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa en las muestras que permanecieron en contacto indirecto con grafeno y en contacto directo sin grafeno. Los resultados coinciden con lo reportado por Lee *et al.*, 2011; La *et al.*, 2014 y Rosa *et al.*, 2016 quienes mostraron que el óxido de grafeno puede inducir la diferenciación adipogénica y osteogénica en las células mesenquimales.

Conclusiones: El PMMA modificado con óxido de grafeno presenta efectos favorables en hDPSC hacia la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica.

Palabras Clave: hDPSC, diferenciación celular, óxido de grafeno, biopolímero.

ABSTRACT

Introduction: PMMA is a material used widely and frequently in dentistry, since its invention until today, which is why it has been modified with the aim of improving its physicochemical and biological properties. Graphene oxide is an allotrope of carbon which has proven to be of great help as it has physicochemical and biological properties of great interest, including, for example, high biocompatibility, promotes cell adhesion and proliferation and even induces differentiation in stem cells, so a PMMA modified with graphene oxide may be of great interest as an alternative material.

Objective: Identify cellular differentiation of hDPSC in a culture with biopolymer enriched with graphene oxide.

Methodology: A comparative in vitro experimental study was carried out where PMMA samples were made with the following dimensions. Subcultures of hDPSC were carried out from a previously characterized primary subculture considering the minimal global standards outlined in the international declaration of the Society for Cellular Therapy, differentiation to adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages was carried out by direct and indirect contact of the cell subculture to the biopolymer with and without graphene oxide, differentiation medium was placed for two to four weeks, finally, oily red, safranin and alizarin red stains were performed, respectively. The experiments were performed in triplicate. The data corresponding to osteogenic differentiation were analyzed using a t-Student test and Tukey's post-hoc ANOVA with a p-value <0.05.

Results and discussion: The hDPSC subcultures that were in contact with the PMMA samples modified with graphene oxide showed a difference favorable to adipogenic and chondrogenic differentiation. In the case of osteogenic differentiation, an ANOVA test was performed, finding a value of $p < 0.05$, where a statistically significant difference could be observed in the samples that remained in indirect contact with graphene and in direct contact without graphene.

The results coincide with what was reported by Lee et al., 2011; La et al., 2014 and Rosa et al., 2016 who showed that graphene oxide can induce adipogenic and osteogenic differentiation in mesenchymal cells.

Conclusions: PMMA modified with graphene oxide presented favorable effects on hDPSC towards adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation.

Keywords: hDPSC, cell differentiation, graphene oxide, biopolymer.

INTRODUCCIÓN

Debido a sus excelentes propiedades físicas y químicas, el grafeno ha despertado un gran interés en la ingeniería de tejidos. Desde su descubrimiento por Andre Geim y Kostya Novoselov en 2007, se han sintetizado diferentes derivados de este, como es el caso del óxido de grafeno (Geim *et al.*, 2007).

Este último es producto de la oxidación del grafeno, se caracteriza por la presencia de grupos funcionales hidroxilo, carboxilo y epoxi lo que le otorga propiedades hidrofílicas, haciendo de este un biomaterial capaz de interactuar con células y permitir la diferenciación, adhesión y proliferación celular (Maleki *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2021).

Introducido en 1936 para reemplazar a la vulcanita como material base para prostodoncias parciales y totales, el polimetacrilato de metilo, o PMMA, ha sido altamente empleado en la odontología, desde su invención hasta el día de hoy, por lo que se ha visto modificado con diferentes nanopartículas con el objetivo de mejorar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas (Rüggeberg *et al.*, 2002; González *et al.*, 2021).

Con el auge de la ingeniería tisular ha surgido una nueva rama dentro de la odontología “la odontología regenerativa” la cual reúne diferentes ciencias básicas como son la biología, física y química; con un objetivo, generar nuevas vías de tratamiento enfocadas en la regeneración tisular (Sharma *et al.*, 2019).

Durante los últimos años se ha implementado el óxido de grafeno en diferentes campos de la medicina con la finalidad de brindar a los materiales ya existentes mejores propiedades biológicas, físicas y mecánicas,

Con estos antecedentes esta investigación se centró en estudiar la capacidad de un biopolímero enriquecido con óxido de grafeno de promover la diferenciación celular de hDPSC a linajes, adipogénico, condrogénico y osteogénico con el objetivo que emplear este material como alternativa de uso posterior a una intervención quirúrgica como puede ser el caso de una prótesis inmediata, un obturador nasal, e incluso como cemento óseo en el caso de una craneoplastia.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

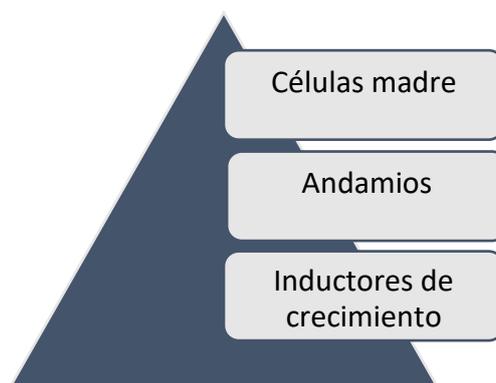
Ingeniería tisular

Empleado por primera vez en 1993 por Langer y Vacanti, el concepto “ingeniería de tejidos” se refiere a la rama interdisciplinaria que emplea principios y técnicas de ingeniería en la medicina y biología proponiendo terapias que sean capaces de rehabilitar, mejorar o reemplazar órganos y/o tejidos que han sido afectados por factores como traumas, quemaduras, enfermedades adquiridas o congénitas (Langer *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 2019; Dawson *et al.*, 2008).

Basada principalmente en tres componentes fundamentales (**Figura 1**).

- Células madre: Son células no especializadas capaces de dividirse continuamente y diferenciarse en células especializadas (Rendon *et al.*, 2011).
- Andamios: Son estructuras tridimensionales que proporcionan un ambiente adecuado para actividades celulares como: adhesión, nutrición, distribución y proliferación (Escorcía *et al.*, 2020; Casagrande *et al.*, 2011).
- Inductores de crecimiento: Son proteínas secretadas endógenamente, por las mismas células, como resultado de la comunicación entre estas mismas. Estas están encargadas de brindar señales químicas que desencadenan mecanismos biológicos y moleculares que regulan la división, migración, diferenciación celular, entre otros (Rosales-Ibañez *et al.*, 2012; Ikada *et al.*, 2006).

Figura 1. Componentes principales de la ingeniería tisular **Fuente:** Propia



Células Madre (CM)

Descritas por primera ocasión en 1976 por Friedenstein. Sin embargo, no fue hasta el término del siglo XX que los histoembriólogos Boveri y Haeckel, introdujeron el término de células madre, también llamadas células troncales,

este término hacer referencia a células no especializadas del cuerpo humano las cuales cuentan con cuatro características primordiales: estas son células no especializadas, cuentan con una alta renovación, tienen capacidad de proliferación y diferenciación formando así células especializadas (García-Torres *et al.*, 2018; Guadarrama *et al.*, 2018). Estas se pueden clasificar acorde a su origen y potencial de diferenciación (**Figura 2**).

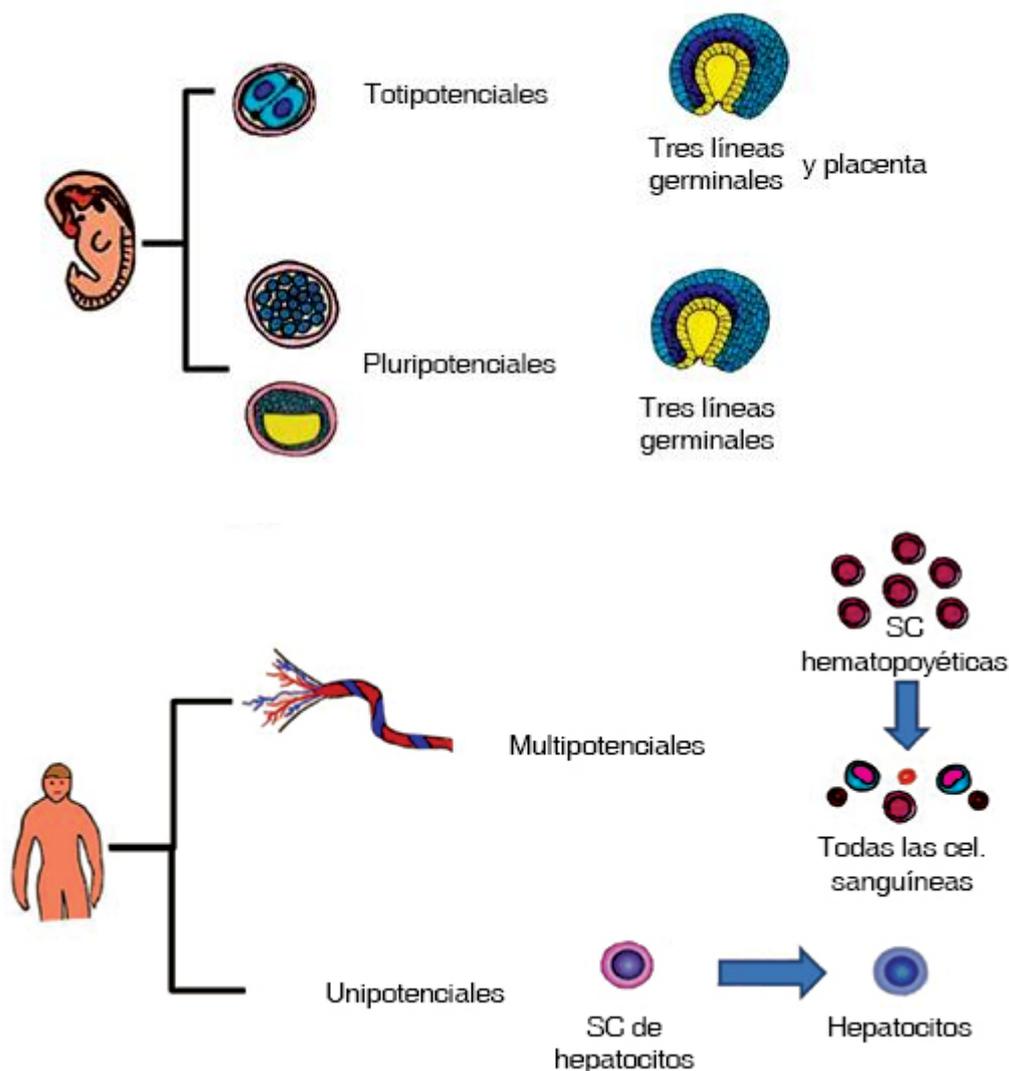
Debido a su Origen:

- Células madre adultas: Llamadas órgano-específicas, estas se encuentran distribuidas entre las células de un órgano, su función consiste en restaurar y preservar los tejidos circundantes (García-Torres *et al.*, 2018).
- Células madre embrionarias: Células madre totipotentes provenientes de embriones (Guadarrama *et al.*, 2018).

Debido a el potencial de diferenciación:

- Células madre totipotentes: Estas son capaces de no solo dividirse sino también de diferenciarse en células de todo el organismo pudiendo convertirse en cualquiera de las 3 capas germinales (permiten la formación de estructuras embrionarias y extraembrionarias) (Mata-Miranda *et al.*, 2013).
- Células madre pluripotentes: Células capaces de formar células de cualquiera de las tres capas germinales, pero no estructuras extraembrionarias (Mata-Miranda *et al.*, 2013).
- Células madre Multipotentes: Células con un espectro de diferenciación es más corto, por lo que pueden generar diversas células de acuerdo a el área donde se encuentran (Mata-Miranda *et al.*, 2013).
- Células madre unipotentes: Células cuya capacidad de diferenciación es la más estrecha, estas solo pueden diferenciarse en un linaje celular (Mata-Miranda *et al.*, 2013).

Figura 2. Clasificación de células madre. Fuente: Mata-Miranda *et al.*, 2013



Células Madre Mesenquimales (CMM)

Las células madre mesenquimales son células versátiles que tienen la capacidad de diferenciarse hacia diferentes linajes como condrocitos, osteocitos y adipocitos, presentan una morfología en forma de huso y cuentan con un núcleo alargado el cual contiene de 2 a 3 nucleolos, localizadas en diversas fuentes, dentro de las principales se destacan: médula ósea, la sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, músculo esquelético, pulpa dental (Socarras *et al.*, 2013; Figueroa-Flores *et al.*, 2006).

Para que se una célula se pueda clasificar como CMM, es necesario que esta cuente con las características mínimas necesarias propuestas por el Congreso de la *International Society of Cellular Therapy*, estos criterios son los siguientes: (Dominici *et al.*, 2006):

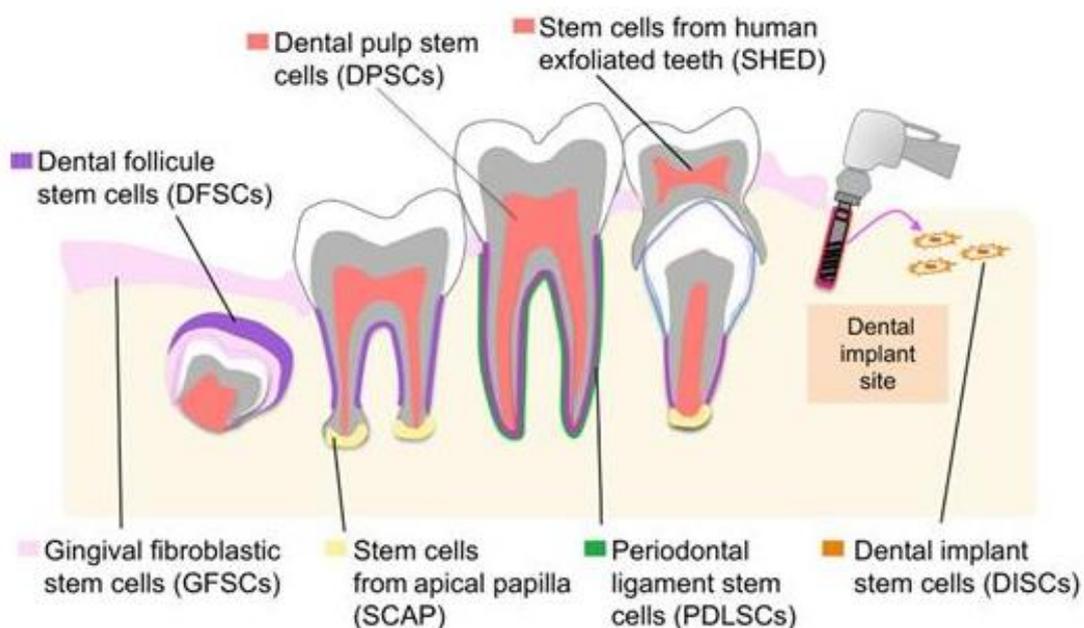
- “Las MSC deben tener capacidad de adherencia al plástico en cultivo” (Dominici *et al.*, 2006).
- “Expresar los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105 en ausencia de otros antígenos hematopoyéticos del tipo CD34, CD45 y marcadores típicos de linfocitos B, monocitos y macrófagos” (Dominici *et al.*, 2006).
- “Deben ser multipotentes y presentar una alta plasticidad para diferenciarse *in vitro* bajo condiciones estándar de cultivo de osteoblastos, adipocitos y condrocitos” (Dominici *et al.*, 2006).

Células Troncales Pulpares (hDPSC)

Aisladas en el año 2000 por Gronthos *et al.* (Solan *et al.*, 2009) las hDPSC se encuentran en la cámara pulpar, dentro de un tejido conectivo, vascularizado e innervado que se constituye por 75% de agua y 25% de materia orgánica llamado pulpa dental (Guadarrama *et al.*, 2018).

Estas células poseen un potencial de multidiferenciación, teniendo la capacidad de diferenciarse en distintos linajes celulares (Osteogénico, adipogénico, cardiogénico, neurogénico, miogénico). Generalmente estas células se obtienen a partir de terceros molares y dientes supernumerarios, Se estima que la producción de hDPSC es de aproximadamente de 1% (1 por 100 de todas las células de la pulpa dental) conforme aumenta la edad del individuo, se vuelve más compleja la obtención de estas (Sánchez-Gómez 2022).

Además de las células de origen pulpar podemos encontrar, células provenientes del folículo dental (DFSC), células madre provenientes de dientes exfoliados (SHED), células madre provenientes de la papila apical (SCAP), células madre gingivales (GFSCs), fibroblásticas, células madre del ligamento periodontal (PDLSCs), células precursoras de folículo dentario (DFSCs), sitio de implante dental (DISCs) (Bo Li *et al.*, 2021; Sharpe 2016).

Figura 3. Ubicación de células troncales Fuente: Sharpe 2016.

Diferenciación celular

Se entiende como diferenciación celular al proceso por el cual una célula madre adquiere características tanto fisiológicas como funcionales de un linaje celular, esto mediante señalizaciones tanto intracelulares como extracelulares. Al formar parte del grupo de células madre mesenquimales las hDPSC poseen la capacidad de diferenciarse a diferentes tipos de linajes celulares, según la declaración internacional de la Sociedad de Terapia Celular para poderse considerar células madre mesenquimales entre algunos criterios, se destaca la capacidad de diferenciación hacia linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico bajo condiciones *in vitro* estándar (Brizuela *et al.*, 2013).

Para poder determinar la diferenciación celular es necesaria la tinción de depósitos mineralizados mediante rojo de alizarina en el caso de diferenciación osteogénica, en el caso de la diferenciación adipogénica se observan depósitos de lípidos los cuales se identifican mediante tinción con rojo aceitoso.

La diferenciación condrogénica se corrobora por la presencia de marcadores positivos a depósitos de colágeno tipo VI (expresados mediante presencia de TGF-B1 Y BMP-4) los cuales van a ser teñidos mediante safranina. (García-Contreras *et al.*, 2019)

Para poder realizar una diferenciación es necesaria la aplicación de medios de inducción (Ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Diferenciación de hDPSC a linaje celular adipogénico, condrogénico y osteogénico.

Diferenciación de MSC a otros linajes celulares			
	Medio de cultivo	Cambio de medio	Tinción
Diferenciación adipogénica	α -MEM SFB Penicilina G y sulfato de estreptomicina Dexametasona B-Glicerofosfato Ascorbato-2 fosfato Insulina L-glutamina	Se realiza cada dos días por un periodo de cuatro semanas	Rojo aceitoso
Diferenciación condrogénica	α -MEM SFB Penicilina G y sulfato de estreptomicina Dexametasona B-Glicerofosfato Ascorbato-2 fosfato Proteína morfogenética ósea	Se realiza cada dos días por un periodo de dos semanas	Safranina O
Diferenciación osteogénica	α -MEM SFB Penicilina G y sulfato de estreptomicina Dexametasona B-Glicerofosfato Ascorbato-2 Fosfato	Se realiza cada dos días por un periodo de cuatro semanas	Rojo de alizarina

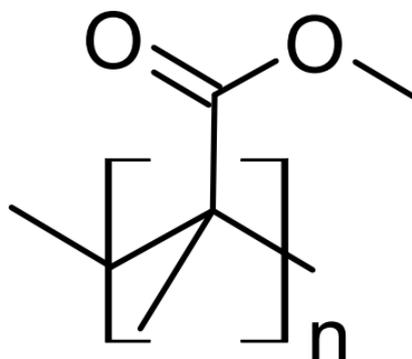
Fuente: García Contreras *et al.*, 2019. Enseñanza práctica del aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. Manual de prácticas de laboratorio, UNAM.

Polimetilmetacrilato de metilo (PMMA)

En el año de 1936 los científicos alemanes Rohm y Haas introdujeron el PMMA en forma de lámina como vidrio de seguridad, en 1937 que el científico Nemours lo comercializó en forma de polvo, durante el mismo año el Dr. Walter Wright lo incorporo en la elaboración de prótesis dentales donde una vez en el mercado se convirtió en el polímero de principal uso desplazando así a la vulcanita como material para prótesis (Tandon *et al.*, 2010; Rüggeberg *et al.*, 2002).

Este material que se obtiene a partir de la mezcla de monómero líquido (metacrilato de metilo) con un polímero en forma de polvo (polimetilmetacrilato) mediante una reacción de polimerización radical, la cual puede ser iniciada térmicamente o bien empleando algún iniciador peroxídico, como el peróxido de benzoilo (Morales *et al.*, 2015; Gonzales *et al.*, 2021).

Figura 4. Estructura química de PMMA. Fuente: González *et al.*, 2021



De acuerdo con el mecanismo que inicia la activación de la reacción de polimerización el PMMA se puede clasificar en diferentes clases (Gautam *et al.*, 2012):

- Termocurado.
- Autocurado.
- Fotocurado.

A pesar el tiempo transcurrido continúa siendo un material empleado en las ciencias médicas para la fabricación de prótesis totales, obturadores, cucharillas individuales, aparatos ortopédicos, restauraciones temporales, entre otros, esto debido a las ventajas que nos ofrece este material (Morales *et al.*, 2015)

Dentro de sus propiedades como material restaurador podemos encontrar (Zafar Muhammad *et al.*, 2020; Umar Ali *et al.*, 2015):

- Biocompatibilidad.
- Reacciones inflamatorias mínimas.
- Baja densidad.
- Alta estética.
- Facilidad de manipulación.
- Alta dureza.
- Rigidez.
- Bajo costo.

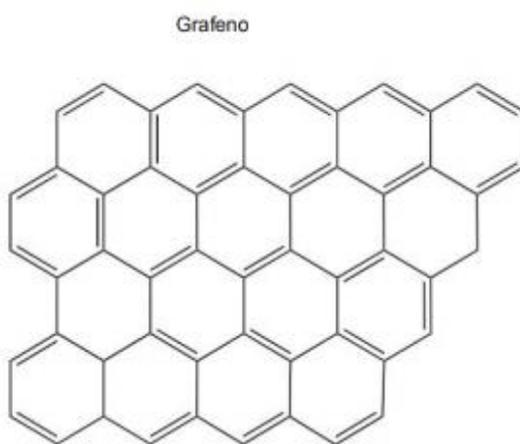
Sin embargo, no es un material ideal ya que entre sus principales desventajas encontramos, inestabilidad de color, poca resistencia al desgaste, contracción en volumen posterior a la polimerización, absorción de agua y provoca irritación en la mucosa oral (Wang *et al.*, 2015).

Grafeno

Descubierto por primera vez en el año 2004 por Andre Geim y Kostya Novoselov, el grafeno es un alótropo de carbono y el material más fino y resistente conocido, este cuenta con una estructura laminar plana, la cual tiene un átomo de grosor, formada por átomos de carbono en hibridación Sp^2 con una estructura hexagonal unida por enlaces covalentes (**Figura 5**). Debido a su estructura química cuenta con propiedades como (Liu *et al.*,2022; Huang *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2011; Loh *et al.*, 2010):

- Alta conductividad térmica y gran conductividad eléctrica. (Torres-Silva *et al.*,2011)
- Cuenta con una gran elasticidad, una resistencia mecánica superior a la del acero y una extraordinaria dureza (Torres-Silva *et al.*,2021; Elkhenany *et al.*, 2014).
- El grafeno tiene la capacidad de interactuar con otras sustancias para formar compuestos con múltiples propiedades (Torres-Silva *et al.*, 2011).
- Presenta alta resistencia a la ionización (Torres-Silva *et al.*, 2011).

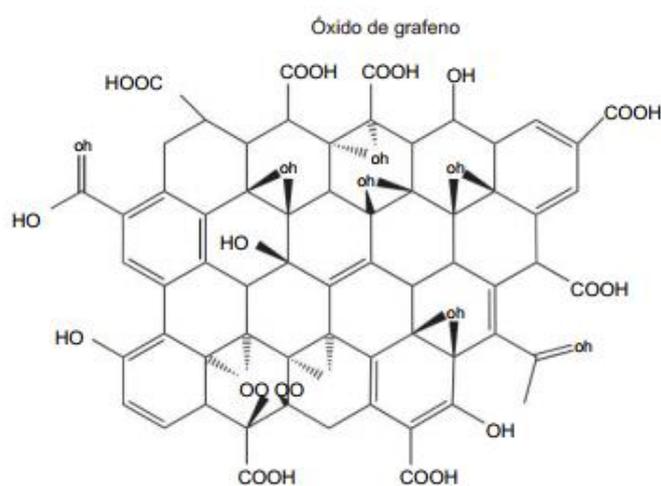
Figura 5. Estructura del grafeno. Fuente: Dubey *et al.*, 20015



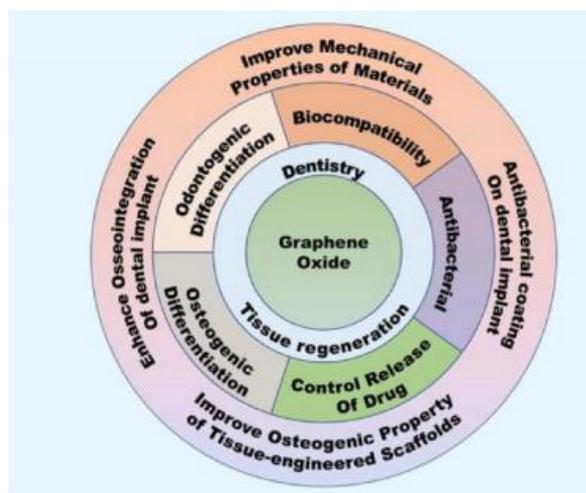
Óxido de Grafeno

El óxido de grafeno (**Figura 6**) tiene su origen a partir del grafeno, este se obtiene mediante la oxidación y exfoliación del grafeno, se caracteriza por la presencia de oxígeno el cual tiene grupos funcionales carboxilo(-COOH), carbonilo(C=O) hidroxilo(-OH), como resultado a esta modificación se tiene un material anfifílico con propiedades como: biocompatibilidad, favorece la adhesión y proliferación celular, fomenta la diferenciación de células madre, además de contar con propiedades antibacterianas (Qi *et al.*, 2021; Xue *et al.*, 2018; Goenka *et al.*, 2014; Banerjee *et al.*, 2018; Durán *et al.*, 2015).

Figura 6. Estructura del óxido de grafeno Fuente: Dubey *et al.*, 2015.



Se ha demostrado una mejora significativa en las propiedades mecánicas, ya que las láminas funcionalizadas tienen una mejor dispersión e interacción con la matriz polimérica en comparación con las láminas de grafeno no funcionalizadas (**Figura 7**) (Kumar *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2021).

Figura 7. Propiedades del OG Fuente: Qi et al.,2021)

Entre diversos métodos descritos en la literatura, los procesos *bottom-up* y *bottom-down* son los más empleados para la obtención de grafeno.

Bottom -up

- Deposición química de vapor: este método se basa en la descomposición de precursores de carbono (hidrocarburos, alcoholes, etc.) los cuales se depositan sobre sustratos metálicos (níquel, cobre, cobalto y rubidio) en este proceso se forma una sola capa sobre el sustrato metálico que funciona como canalizador, brinda un óxido de grafeno con pocos defectos y contaminantes (Felli *et al.*, 2015).

Bottom-down

- La exfoliación mecánica se basa en la producción de fuerzas mayores a las existentes entre las capas del grafeno, para realizar esto se emplea cinta adhesiva, con la cual se realizan movimientos de pegado y despegado repetidamente con el objetivo de provocar un clivaje en los planos cristalinos dejando los planos atómicos expuestos, posteriormente el material es recolectado con ayuda de una solución de acetona y un sustrato de dióxido de silicio (SiO₂) (Camargos *et al.*, 2017; Rao *et al.*, 2009).
- La exfoliación química emplea agentes oxidativos como ácido sulfúrico, ácido nítrico, permanganatos y cloratos, estos provocan intercalación de iones con la estructura del grafito lo que amplía el espacio interplanar, así obteniendo grafito intercalado el cual posteriormente es llevado a

ultrasonidos para separar las capas de grafito obteniendo grafeno (Camargos *et al.*, 2017; Felli *et al.*, 2015).

De acuerdo con los reactivos empleados existen diferentes rutas para la exfoliación química:

- El método Staudenmaier emplea ácido nítrico fumante (HNO_3), ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y clorato de potasio (KClO_3) (Camargos *et al.*, 2017).
- El método Hofmann utiliza emplea nítrico concentrado (HNO_3), ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y clorato de potasio (KClO_3) (Camargos *et al.*, 2017) .
- Finalmente, el método Hummers emplea ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), nitrato permanganato de sodio (NaNO_3) y potasio (KMnO_4) (Camargos *et al.*, 2017).

ANTECEDENTES

En el año 2004 en la ciudad de Manchester Andre Geim y Kostya Novoselov aislaron por primera vez el grafeno, a partir de la remoción consecutiva de un pedazo de cinta adhesiva en una muestra de grafito (Martínez *et al.*, 2009).

En 2010, Andre Geim y Kostya Novoselov fueron galardonados con el Premio Nobel de Física por su descubrimiento del grafeno (Pinto *et al.*, 2014).

Año 2010 Kalbacova y colaboradores evaluaron la capacidad del grafeno para promover la adherencia y proliferación de células madre mesenquimales, donde se observó un aumento en la adhesión y proliferación celular gracias a la presencia del grafeno, además destacaron la importancia de la densidad celular para la realización de pruebas biológicas (Kalbacova *et al.*, 2010).

Año 2010 Gonçalves y colaboradores modificaron óxido de grafeno con PMMA como relleno de refuerzo, realizaron varias pruebas a diferentes proporciones entre ellas encontraron un aumento significativo de las propiedades físico-térmicas, en la concentración de 1/100 p/p teniendo un material más dúctil y tenaz, además de contar con una mejor estabilidad térmica (Goncalves *et al.*, 2010).

Año 2011 Lee y colaboradores evaluaron la diferenciación celular hacia linajes adipogénico y osteogénico en células madre mesenquimales expuestas a grafeno y óxido de grafeno, teniendo como resultado en el grupo con grafeno una disminución en la diferenciación adipogénica debido a que el grafeno desnaturaliza la insulina y un aumento en la diferenciación osteogénica, para el caso del óxido de grafeno se observó un aumento tanto en la diferenciación adipogénica como osteogénica debido a que el óxido de grafeno actúa como una plataforma de concentración para los inductores químicos (Lee *et al.*, 2011).

Año 2011 Nayak y colaboradores demostraron la biocompatibilidad y osteoconductividad que posee el óxido de grafeno en MSC en condiciones osteogénicas, en este estudio observaron un aumento en el crecimiento celular sin afectar la forma y tamaño de las células para el estudio de biocompatibilidad, mientras que en el ensayo de diferenciación se observó una diferenciación osteogénica acelerada, (Nayak *et al.*, 2011).

Año 2014 La y colaboradores estudiaron la reducción de dosis de BMP-2 mediante la presencia de óxido de grafeno, donde concluyeron que media dosis de BMP-2 administrada con óxido de grafeno tiene efectos similares a una dosis

completa además de evitar los efectos adversos ocasionados por altas dosis de BMP-2 (La *et al.*, 2014).

En el año 2016 Rosa y colaboradores evaluaron el potencial de diferenciación y la citocompatibilidad de un sustrato de óxido de grafeno en hDPSC, el óxido de grafeno permite proliferación celular y la estimulación de la expresión de genes que regulan las células productoras de minerales (Rosa *et al.*, 2016).

En el año 2020 Krukiewicz y colaboradores incorporaron OG en un cemento a base de polimetacrilato de metilo, el cual mejoró la proliferación celular, y la expresión de genes encargado de la diferenciación osteogénica en las MSC en comparación con los grupos que no contaban con OG (Krukiewicz *et al.*, 2020).

En el año 2020 García y colaboradores se realizaron una investigación la cual estudió las características mecánicas, físicas y biológicas de PMMA enriquecido con óxido de grafeno, el cual tuvo como resultado una mejora significativa en dichas características, al mismo tiempo se pudo observar una biocompatibilidad aceptable, además de eso se concluye que el PMMA con óxido de grafeno puede contribuir en la proliferación y regeneración celular (García-Contreras *et al.*, 2021).

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La salud bucal es poco reconocida por la sociedad y servicios de salud como parte integral para la salud general, debido a eso, aunque la dentición tiene la capacidad de permanecer en boca durante el transcurso de la vida, la pérdida de órganos dentales se observa conforme van pasando los años (Luengas-Aguirre *et al.*, 2015). Esta condición es denominada edentulismo y corresponde al estado de salud bucal en el que existe la ausencia de piezas dentarias.

Las etiologías que dan como resultado esta condición es diversas, sin embargo, dentro de las principales podemos destacar la caries dental y la enfermedad periodontal.

La caries dental es una enfermedad no transmisible, progresiva e irreversible que se origina en un desequilibrio ecológico. Este desequilibrio surge debido al aumento en la ingesta de carbohidratos fermentables, lo que ocasiona alteraciones en la composición y actividad de la biopelícula, junto con la pérdida mineral causada por los ácidos bacterianos, producto del metabolismo de los carbohidratos (Basso., 2019).

Mientras que la enfermedad periodontal es una enfermedad causada a partir de una inflamación crónica grave la cual es desarrollada en respuesta a la transición del microbioma simbiótico localizado en el surco gingival hacia la disbiosis con cambios de composición de la placa dentobacteriana, produciendo la destrucción de tejidos de soporte del diente (Sojod *et al.*,2022).

A pesar de verse reducida la prevalencia de edentulismo durante la última década, la pérdida de órganos dentales continúa siendo un problema de gran importancia alrededor del mundo, en México se estima una prevalencia de edentulismo total que varía entre 12% a 38.9%, mientras que el edentulismo parcial tiene una prevalencia de 61,4% a 87.0% (Vizcaino *et al.*, 2022).

Debido a la alta prevalencia de edentulismo se han desarrollado tratamientos para devolver la funcionalidad y estética de la cavidad oral, entre los cuales se destacan: prótesis fija, prótesis removible, prótesis implantosoportadas, prostodoncias totales, prostodoncias inmediatas, ente otras; estas últimas suelen ser prótesis transitorias donde se observa una pérdida ósea debido a la remodelación del hueso alveolar ocasionada por las extracción dental y el proceso de cicatrización, generalmente estas son confeccionadas con PPMA el cual es considerado un material bioinerte incapaz de promover la regeneración tisular, por lo que un PMMA capaz de promover dicha regeneración sería conveniente para así favorecer los proceso de cicatrización y evitar la pérdida ósea posterior a múltiples extracciones (Tan *et al.*, 2012).

Este proyecto propone el uso de PMMA enriquecido con óxido de grafeno como un material restaurador que permita promover una regeneración celular en situaciones clínicas donde sea necesaria la colocación de una prótesis a base de PMMA posterior a una intervención quirúrgica; ya que por sí solo el óxido de grafeno se ha demostrado ser capaz de inducir diferenciación celular.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Puede un polímero enriquecido con óxido de grafeno inducir la diferenciación celular en hDPSC?

JUSTIFICACIÓN

Las prostodoncias inmediatas son un tratamiento en el cual se coloca una prostodoncia total, posterior a la extracción de múltiples dientes, por lo general provocan incomodidad al paciente, lo que puede ocasionar una interrupción en su uso. Este tratamiento tiene como enfoque restaurar la función y estética de la cavidad oral, un PMMA modificado con óxido de grafeno podría ayudar a preservar la estructura ósea y el tejido blando posterior a la extracción evitando así una pérdida de ambos tejidos.

De acuerdo a varios estudios anteriores se ha comprobado el aumento de las propiedades físico-mecánicas del PMMA enriquecido con óxido de grafeno, sin embargo la evidencia documentada aunque presenta la importancia de la capacidad del óxido de grafeno de promover el crecimiento y la diferenciación celular, carece de estudios suficiente que evalúen la capacidad de este material en combinación con PMMA, aún no existen estudios suficientes que evalúen la capacidad del PMMA modificado con óxido de grafeno de inducir células madre a una diferenciación multilinaje; la importancia de este estudio radica en promover una regeneración tisular del sitio quirúrgico, acelerando la cicatrización de heridas, favoreciendo la disminución de los tiempos postoperatorios y la tasa de complicaciones, evitando posibles incomodidades, mejorando la adaptabilidad de la prótesis dental mientras se preservan los tejidos de la cavidad oral, trayendo como consecuencia la mejora de la calidad de vida del paciente (García-Contreras *et al.*, 2021).

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar la diferenciación celular de hDPSC en un cultivo con biopolímero enriquecido con óxido de grafeno.

Objetivos específicos

- Obtener muestras de un polímero enriquecido con grafeno.
- Determinar la diferenciación a linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico mediante tinción de rojo alizarina, rojo aceitoso y safranina de hDPSC en contacto con un polímero enriquecido con grafeno.

HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación

El polimetilmetacrilato enriquecido con óxido de grafeno tiene la capacidad de inducir la diferenciación de hDPSC a linaje celular adipogénico, condrogénico, osteogénico.

Hipótesis nula

El polimetilmetacrilato enriquecido con óxido de grafeno no induce la diferenciación de hDPSC a linaje celular adipogénico, condrogénico y osteogénico.

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de estudio

Estudio experimental puro, *in vitro*.

Diseño de estudio

Prospectivo y comparativo.

Universo del estudio

hDPSC.

Discos de polimetilmetacrilato enriquecidos con óxido de grafeno.

Discos de polimetilmetacrilato sin óxido de grafeno añadido.

Tipo de muestreo

Muestreo no probabilístico, por conveniencia.

Tamaño de muestra

Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado (n=9) para obtener datos reproducibles.

Criterios de inclusión

Muestras de polímero enriquecido con óxido de grafeno.

Muestras de polímero sin óxido de grafeno.

hDPSC cultivadas *ex-vivo* con una densidad mínima de 1×10^5 cel/mL.

Criterios de no inclusión

Muestras que presenten irregulares durante y después del procesado.

hDPSC con más de 15 divisiones celulares.

Criterios de eliminación

Cultivos contaminados.

Muestras que se dañen o fracturen durante el proceso de elaboración.

VARIABLES

Variables dependientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Diferenciación celular	Capacidad que tiene una célula a diferenciarse en diferentes tipos de linajes celulares, (Rosales Ibañez <i>et al.</i> , 2012)	Diferenciar hDPSC a diferentes tipos de linajes celulares (osteogénico, adipogénico, comedogénico)	Cualitativa nominal: Adipogénica y condrogénica 1. Positivo 2. Negativo Cuantitativa Continua de razón: Osteogénica 0- <i>n</i> absorción

Variables Independientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Polímero Autopolimerizable con/sin óxido de grafeno	El polimetil metacrilato de metilo es un polímero de origen sintético que presenta una alta biocompatibilidad (González <i>et al.</i> , 2021).	Obtención de muestras de polímero enriquecido con óxido de grafeno y muestras de polímero sin óxido de grafeno	Cualitativa nominal 1. Con óxido de grafeno 2. Sin óxido de grafeno

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Reactivos para la elaboración de muestras de PMMA con/sin grafeno.

Elaboración de muestras de polímero		
Reactivos	Materiales	Equipo
<ul style="list-style-type: none"> Addir Pink® (Osfoma®, México) 	<ul style="list-style-type: none"> Espátula de cementos Puntas de micropipeta Frasco de vidrio 	<ul style="list-style-type: none"> Bascula analítica Micropipeta Molde de metal previamente fabricado Prensa
Fuente: Propia		

Tabla 3. Reactivos, materiales y equipo para el aislamiento y caracterización de hDPSC.

Subcultivo celular		
Reactivos	Materiales	Equipo
<ul style="list-style-type: none"> Medio de cultivo base (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA.) Suero fetal Bovino (SFB) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA.) 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.) 	<ul style="list-style-type: none"> Portaobjetos de vidrio Pipetas volumétricas de 10 mL descartables estériles Micropipetas de volumen variable Puntas para micropipeta Cajas Petri de 10-cm y 6-cm 	<ul style="list-style-type: none"> Bomba de vacío Hematocitómetro Microscopio invertido Campana de flujo laminar Incubadora a 37°C con atmósfera húmeda al 95% y 5% de CO₂

<ul style="list-style-type: none"> Enzima tripsina con EDTA al 0.05% (Gibco® by LifeTechnologies corporation, Gran Island, NY, EUA.) 		
<p>Fuente: García Contreras <i>et al.</i>, 2019. Enseñanza práctica del aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. Manual de prácticas de laboratorio, UNAM.</p>		

Tabla 4. Reactivos para la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de hDPSC.

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.)	Dexametasona	Insulina	Dexametasona
Antibióticos (Sulfato de estreptomina y Penicilina G) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA.)	Glicerofosfato	L-glutamina	Glicerofosfato
PBS (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA.)	Rojo de alizarina	Glicerofosfato	Proteína morfogenética ósea (BMP 4)
Etanol al 70%	Dimetilsulfóxido	Ascorbato-2 fosfato	Safranina O
Agua destilada		Isopropanol al 60%	
		Rojo aceitoso	
<p>Fuente: García Contreras <i>et al.</i>, 2019. Enseñanza práctica del aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. Manual de prácticas de laboratorio, UNAM.</p>			

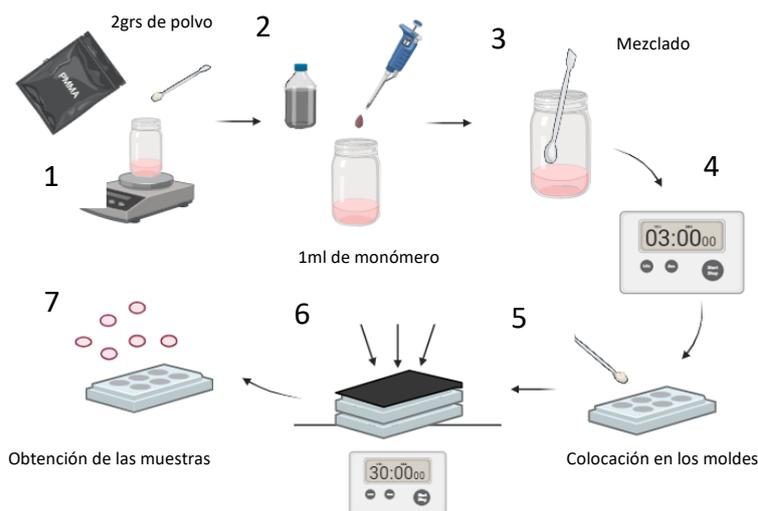
DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

La realización de muestras como los ensayos de diferenciación celular fueron realizados en el Laboratorio de investigación interdisciplinaria de la ENES Unidad León, UNAM el cual cuenta con los más altos estándares de calidad NOM-010-STPS-2014, NOM-210-SSA1-2014, ISO 10993-5:1999.

Realización de muestras de polímero con/sin óxido de grafeno.

Se realizaron las muestras de PMMA, con el polímero siguiendo las proporciones del fabricante 2 g de polvo/1 mL de líquido. Se pesaron en una báscula 2 g de polvo (paso 1) y con ayuda de una pipeta volumétrica se midió 1 mL de monómero (paso 2), este se colocó en un recipiente al cual posteriormente se le agregó el polvo previamente pesado, se mezclaron ambos con ayuda de una espátula (paso 3) (evitando la incorporación de aire y asegurando la humectación de las partículas de polvo), esta mezcla se dejó reposar hasta que se perdiera la consistencia líquida (paso 4) (aproximadamente 6 minutos), con ayuda de una espátula se colocó la mezcla en un molde el cual se cerró (paso 5), posteriormente se aplicó presión (paso 6), reposo en el molde por 30 minutos. Una vez terminado el tiempo de curado se retiraron los discos de PMMA del molde y fueron acabados y pulidos con ayuda de una pieza de mano y un fresón de acrílico (paso 7) (**Figura 8**).

Figura 8. Elaboración de muestras de PMMA. Fuente: Propia.

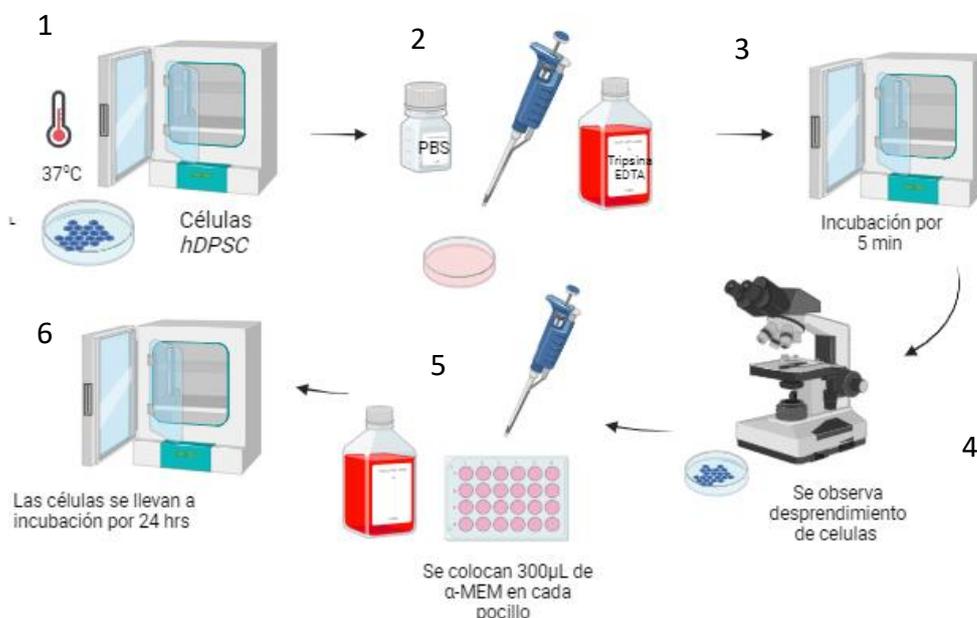


Elaboración de subcultivo celular de hDPSC

Para realizar el subcultivo celular se retira la caja de Petri con las células de la incubadora (paso 1) y se observan las células del cultivo primario previamente caracterizado considerando los criterios internacionales mínimos establecidos por la declaración internacional de la Sociedad de Terapia Celular, una vez se observa una alta confluencia (80-100%), se llevan las células hacia la campana de flujo donde es apartado el medio con ayuda de una bomba de vacío, después se enjuaga dos veces con 4 ml de PBS , posteriormente se añaden 500 μ L de Tripsina-EDTA (paso 2) (se procura que la solución cubra todo el fondo de la caja), se lleva a la incubadora por 5 min a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad (paso 3).

Pasado el tiempo se lleva la caja de Petri al microscopio donde se observa el desprendimiento de las células (paso 4), una vez se encuentran suspendidas, se colocan 3 mL de medio fresco para inactivar la tripsina y después se añade el medio faltante para la cantidad de pocillos a subcultivar (paso 5), se retiran 10 μ L de muestra para realizar el conteo celular (en el microscopio mediante un hematocitómetro). Por último, se realiza nuevamente un pipeteado y se colocan 300 μ L de medio en cada pocillo de la caja (paso 6) (**Figura 9**).

Figura 9: Subcultivo celular, principales pasos. Fuente: Propia.



Ensayo de diferenciación celular de hDPSC

Los ensayos de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica fueron realizados con células con un pasaje celular de entre 7 a 12 divisiones, con una confluencia del 80-100%, sembradas en cajas de 24 pocillos, se colocaron muestras de PMMA con/sin OG en contacto directo e indirecto, las primeras durante toda duración del ensayo y las muestras en contacto indirecto mediante una elución (**Figura 10**) durante 24 horas.

Figura 10. Obtención de elución. Fuente: Propia.



Método de diferenciación celular de hDPSC hacia linaje adipogénico

En placas de 24 pocillos se realizó el sembrado celular en una densidad celular 2.4×10^5 cel/mL. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ y 95% de humedad durante 24 horas, posteriormente se observaron las células mediante un microscopio de contraste de fases con el objetivo de corroborar la adhesión a los múltiples pocillos.

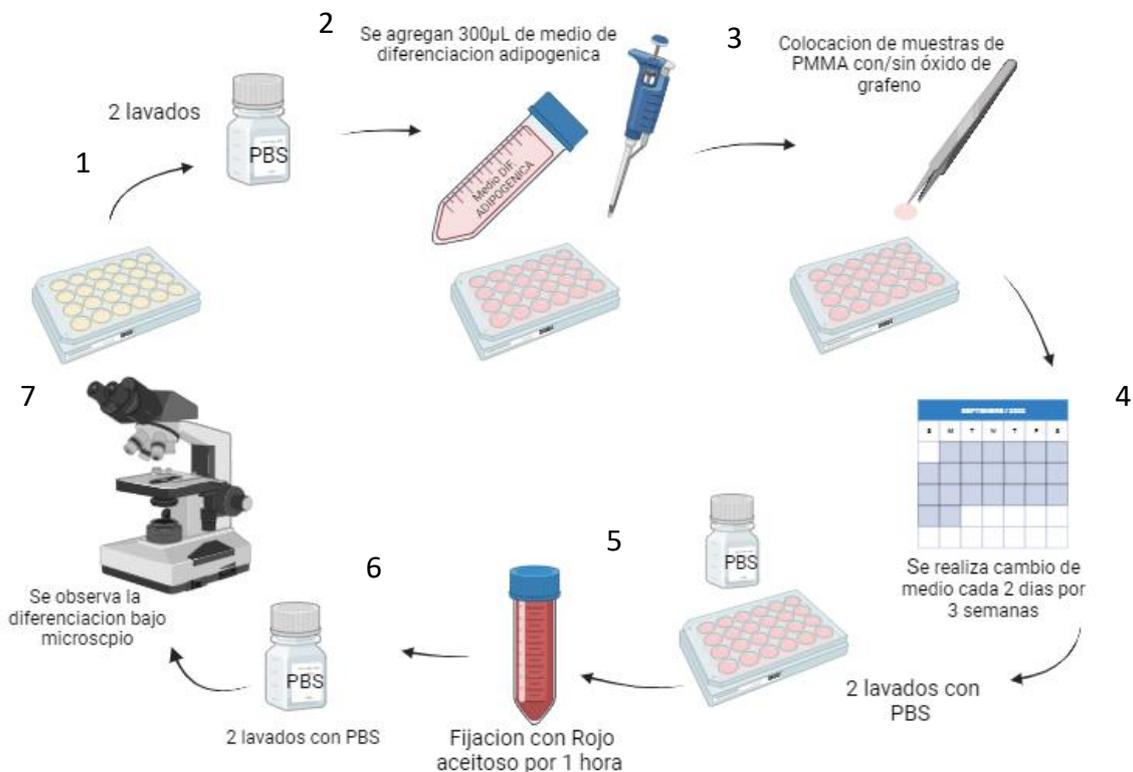
Pasadas las 24 horas se eyecto el medio de cultivo, posteriormente se llevaron a cabo dos lavados con PBS (1) para agregar 600 µL de medio de diferenciación adipogénica a con α -MEM [SFB 10%, penicilina y estreptomicina (1%), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/mL)] adicionado con insulina y L-glutamina (2), posteriormente se colocaron las muestras de PMMA (3).

Este se reemplazó cada segundo día durante 4 semanas, las placas se mantuvieron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ y 95% de humedad (4).

Pasadas las 4 semanas se detuvo la diferenciación con una tinción de rojo aceitoso (0.3 g) en isopropanol 60% v/v (100mL) por 1 hora, a temperatura

ambiente (5). Las células se lavaron dos veces con PBS (6), por último se observó la diferenciación en el microscopio (7) (**Figura 11**).

Figura 11. Diferenciación adipogénica. Fuente: Propia.



Método de diferenciación celular de hDPSC hacia linaje condrogénico

En placas de 24 pocillos se realizó el sembrado celular en una densidad celular 2.4×10^5 cel/mL. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ y 95% de humedad durante 24 horas, posteriormente se observaron las células mediante un microscopio de contraste de fases con el objetivo de corroborar la adhesión a los múltiples pocillos

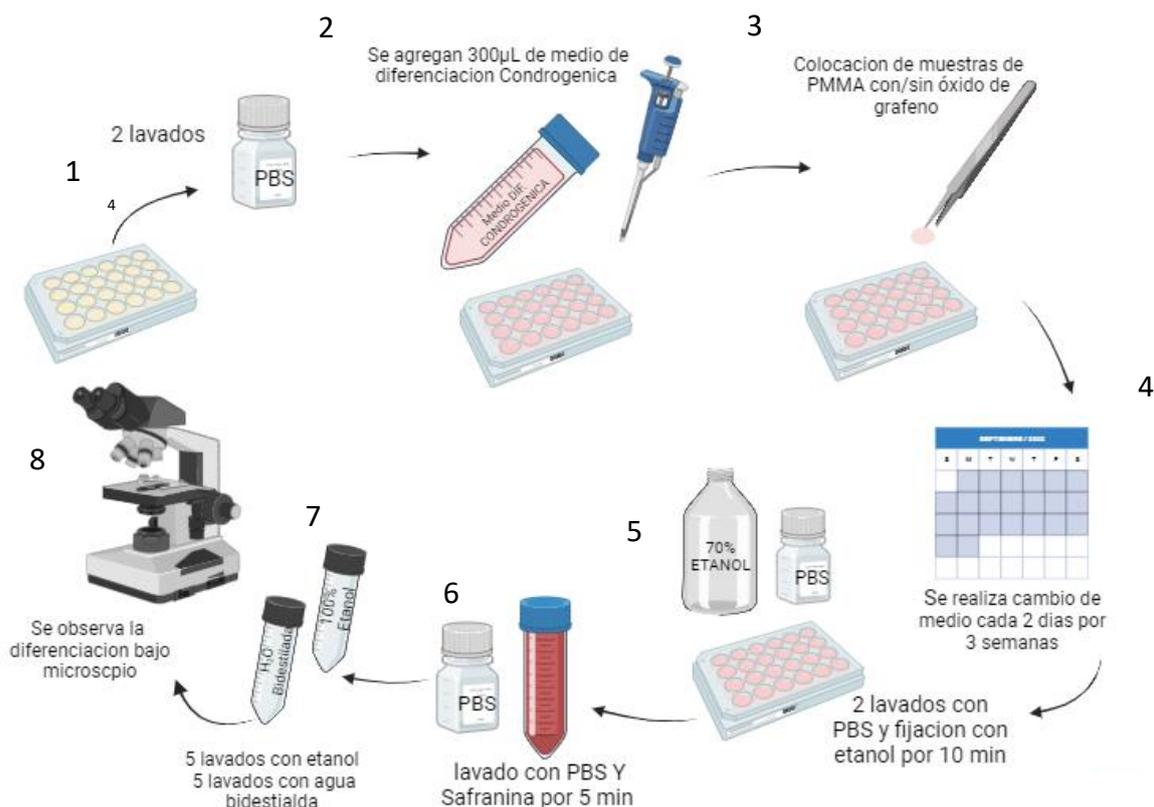
Pasadas las 24 horas se eyecto el medio de cultivo, posteriormente se llevaron a cabo dos lavados con PBS (1) para agregar 600 µL de medio de diferenciación condrogénica con α -MEM [SFB 10%, penicilina y estreptomicina (1%), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/mL), proteína morfogenética ósea (BMP-1 o 4)] (2), posteriormente se colocaron las muestras de PMMA (3).

Este se reemplaza cada segundo día durante 2 semanas, las placas se mantuvieron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ y 95% de humedad (4).

Pasadas las 2 semanas se detuvo la diferenciación, se realizaron 2 lavados con PBS y se fijó con etanol al 70% v/v por 10 minutos (5), se lavó una vez más con PBS y se colocó una tinción de safranina 0.15 ml O (0.1%) (6)

Las células se lavaron 5 veces con agua bidestilada (7) y se observaron en el microscopio (8) (**Figura 12**).

Figura 12. Diferenciación condrogénica. Fuente: Propia.



Método de diferenciación celular de hDPSC hacia linaje osteogénico

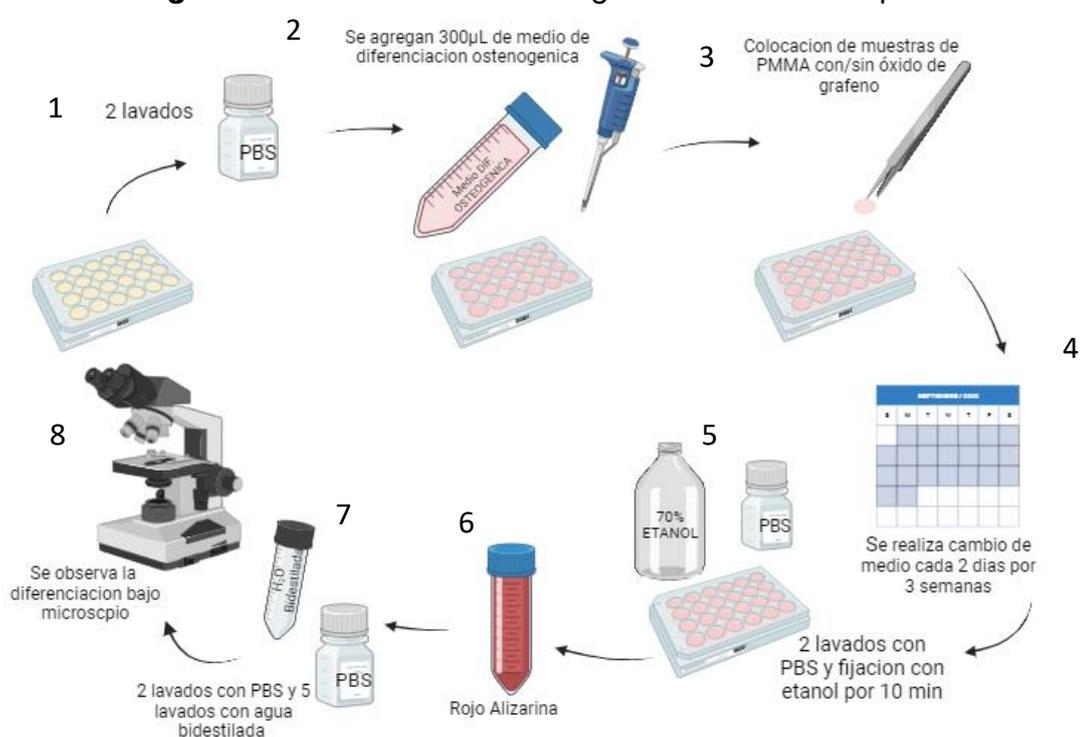
En placas de 24 pocillos se realizó el sembrado celular en una densidad celular 2.4×10^5 cel/mL. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ y 95% de humedad durante 24 horas, posteriormente se observaron las células mediante un microscopio de contraste de fases con el objetivo de corroborar la adhesión a los múltiples pocillos

Pasadas las 24 horas se eyecto el medio de cultivo, posteriormente se llevaron dos lavados con PBS (1) para agregar 600 µL de 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]] (2). Se colocaron las muestras de PMMA (3) medio fue remplazado cada segundo día por 4 semanas o hasta que se observaran cúmulos de minerales y cristales birrefringentes en microscopio (4), las células se mantuvieron incubadas a 37°C con 5% CO₂ y 95% de humedad (5).

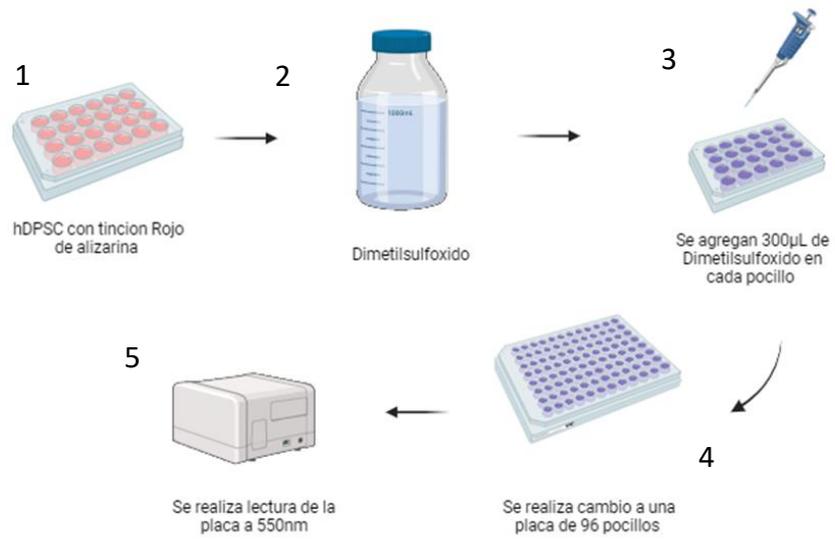
Pasadas las 4 semanas se detuvo la diferenciación con una tinción de rojo de Alizarina 40 mM) en NaH₂PO₄ (0.1 M) y un pH de 4,3. Las células se enjuagaron dos veces con PBS y fueron fijadas con etanol al 70% (v/v) por 30 minutos a temperatura ambiente (6), se volvieron a realizar dos lavados con PBS y se agregaron 250 µL de rojo de Alizarina por 10 minutos a temperatura ambiente (7). Las células se lavaron 2 veces con PBS (8) y para terminar 5 veces con agua bidestilada (9) (**Figura 13**).

Figura 13. Diferenciación osteogénica. Fuente: Propia.



En el caso de la diferenciación osteogénica se realizó una lectura en un espectrofotómetro con el objetivo de cuantificar los minerales presentes, para lo cual posterior a la toma de fotomicrografías en el microscopio (1), se colocó en cada pocillo 300µL de dimetilsulfóxido (2), se pipetea los pocillos abundantemente (3) y se llevó a un plato de 96 pocillos (4) posteriormente se realizó una lectura a 550 nm (5) (**Figura 14**).

Figura 14: Lectura en espectrofotómetro. **Fuente:** Propia.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Diferenciación adipogénica

La presencia de adipocitos al ser una variable cualitativa se determinó mediante la tinción de depósitos de lípidos, se observaron 18 muestras por cada ensayo independiente, a las cuales se les aplicó rojo aceitoso con el que se observaron depósitos de lípidos de coloración rojiza, se observó un mayor cúmulo de depósitos de lípidos en las muestras que estuvieron en contacto directo con el PMMA adicionado con óxido de grafeno, en comparación con las muestras que estuvieron en contacto indirecto y las muestras que no contaban con OG.

Diferenciación Condrogénica

Durante el proceso de diferenciación condrogénica se tiñe la matriz secretada por estas células, permite detectar glucosaminoglicanos y proteoglicanos esto mediante una tinción de safranina, en esta diferenciación se observó un aumento de diferenciación condrogénica en el grupo que estuvo en contacto directo con el PMMA adicionado con óxido de grafeno, en comparación con las muestras, que se permanecieron en contacto indirecto y las muestras que no contaban con OG.

Diferenciación osteogénica

La diferenciación osteogénica se evaluó mediante la detección de la enzima fosfatasa alcalina, un marcador del fenotipo osteoblástico, y la mineralización de la matriz extracelular, que sirve como marcador de funcionalidad, se observaron 18 muestras por cada ensayo independiente, bajo microscopía de contraste de fases y se identificaron cúmulos de minerales y cristales birrefringentes al microscopio, mediante la tinción rojo de alizarina, en las muestras modificadas con óxido de grafeno que permanecieron en contacto indirecto además de las muestras en contacto directo sin modificar, en cambio las muestras modificadas con óxido de grafeno pertenecientes al grupo directo, además de las muestras en contacto indirecto que no habían sido modificadas con óxido de grafeno no mostraron una diferencia significativa (**Figura 14 y 15**).

Las muestras de este ensayo fueron llevadas a un lector de microplaca (Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finlandia) en el cual se realizó una lectura a 550 nm, los datos correspondientes fueron analizados con ANOVA encontrando un valor de $p < 0.05$, donde se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa en las muestras que permanecieron en contacto indirecto con grafeno y en contacto directo sin grafeno (**Figura 16**).

Figura 14. Fotomicrografías de diferenciación a linajes celulares en hDPSC en contacto con biopolímero sin óxido de grafeno. Fuente: Directa.

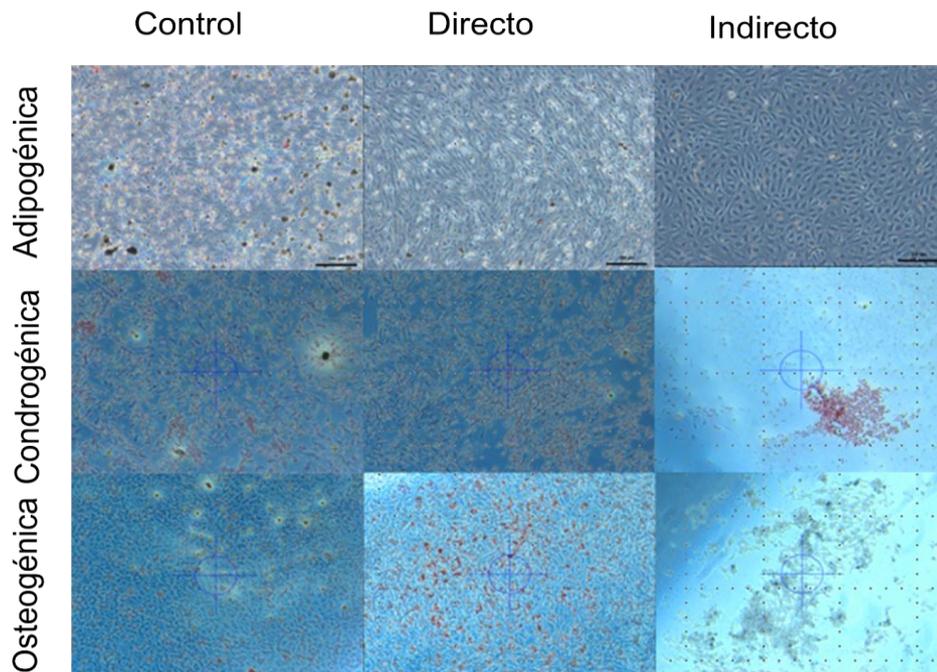


Figura 15. Fotomicrografías de diferenciación a linajes celulares en hDPSC en contacto con biopolímero con óxido de grafeno. Fuente: Directa.

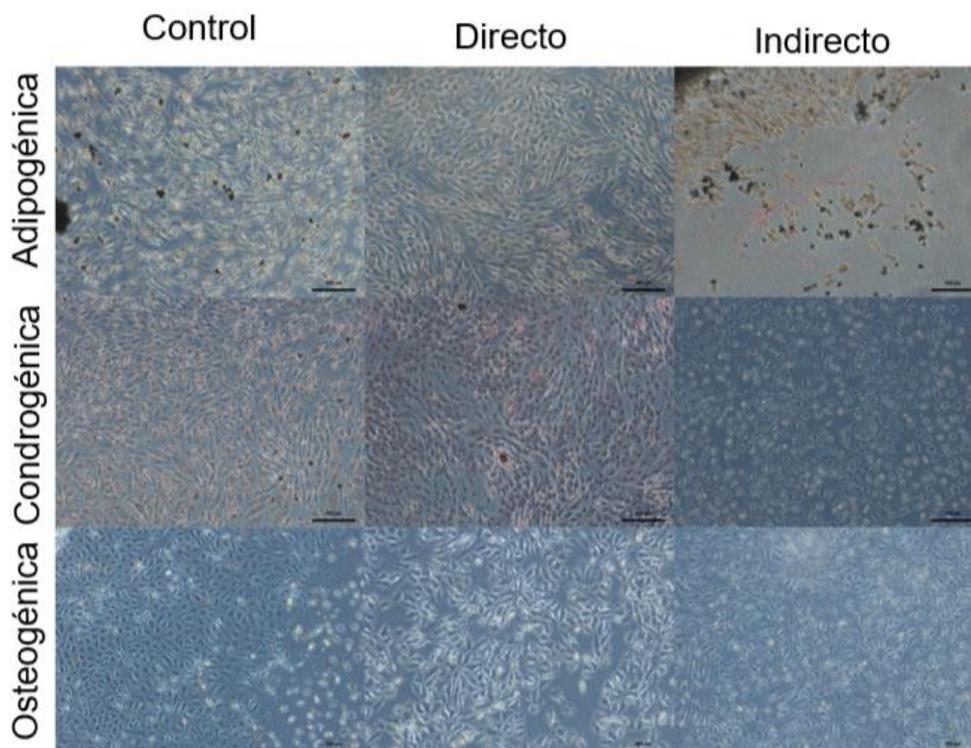
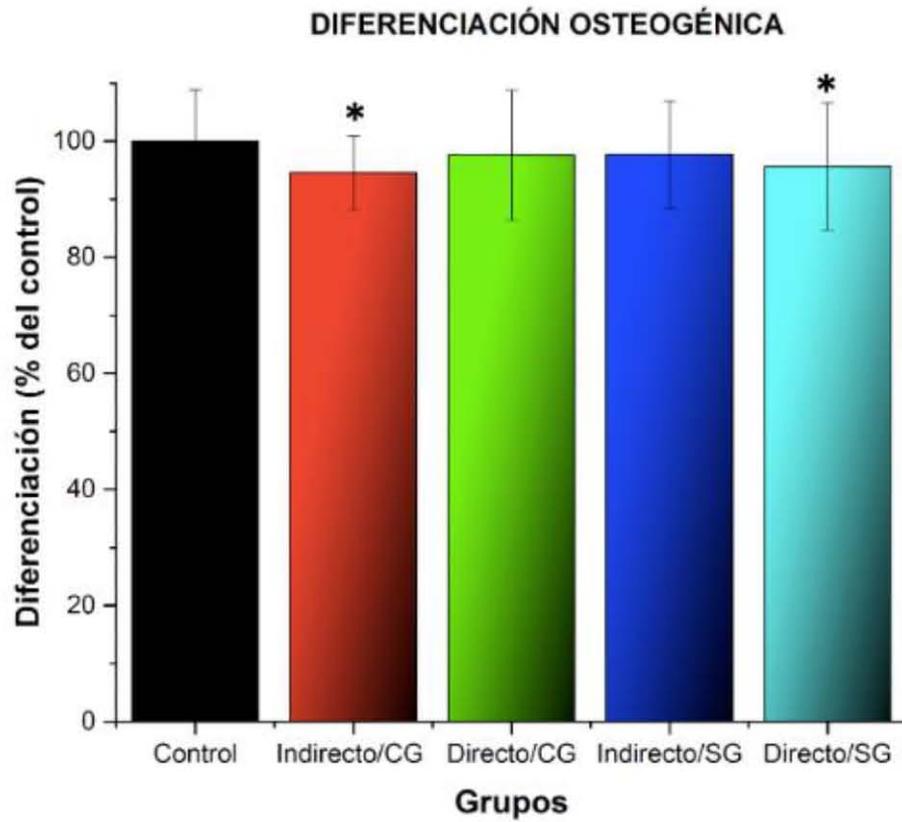


Figura 16. Diferenciación osteogénica. Los datos representan promedio y desviación. Prueba ANOVA * $P < 0,05$ Pos hoc de Tukey, $n=9$ Fuente: Directa.



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron un aumento de diferenciación celular en el grupo expuesto a PMMA enriquecido con óxido de grafeno, esto se debe a los grupos funcionales presentes en el OG permiten una unión covalente con otras moléculas lo que ocasiona una plataforma de preconcentración.

Dichos resultados concuerdan con lo reportado en un estudio realizado en 2011 donde se evaluó el potencial de diferenciación celular de CMM en sustratos de óxido de grafeno, donde se observó un aumento en la diferenciación celular a linaje adipogénico y condrogénico ya que este material actúa como plataformas de preconcentración de inductores químicos, lo que aceleró la diferenciación celular (Lee *et al.*, 2011).

Posteriormente en el año 2016 se evaluó el potencial de diferenciación en un sustrato de óxido de grafeno en células troncales de la pulpa dental humana, este estudio evaluó la presencia de MSX-1 y RUNX2 los cuales son genes presentes en células capaces de secretar depósitos minerales. Los resultados de este estudio fueron bastante alentadores ya que no se agregaron inductores químicos durante la diferenciación celular.

Una investigación realizada en el año 2020 evaluó la diferenciación osteogénica de hDPSC inducida por un PMMA modificado con óxido de grafeno, donde se tuvo como resultado un incremento en la diferenciación a linaje osteogénico en comparación con el PMMA sin modificar, ya que el grupo modificado con óxido de grafeno mostró un aumento en los marcadores ALP, SPARC y BMP-2, de esta manera se concluyó que el PMMA al cual se le había añadido óxido de grafeno, puede ser un compuesto prometedor en la ingeniería de tejidos.

Estos estudios concuerdan parcialmente con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que en este estudio no se observó un aumento significativo hacia linaje osteogénico por parte del grupo modificado con óxido de grafeno sin embargo se observó un aumento de diferenciación celular adipogénica y condrogénica, en el grupo expuesto a PMMA enriquecido con óxido de grafeno, esto se debe a los grupos funcionales presentes en el OG, los cuales permiten una unión covalente con otras moléculas lo que ocasiona una plataforma de preconcentración a la cual se ven unidos los inductores químicos,

La atracción de inductores químicos se puede explicar gracias a la capacidad que presenta el óxido de grafeno de unión de electrones no covalentes. Sumado a esto se ha demostrado cierta afinidad del grupo –OH hacia el ácido ascórbico debido a que se forman enlaces de hidrógeno entre estas moléculas. Una vez unidos estos inductores químicos se tiene una plataforma capaz de acelerar la diferenciación celular.

Limitaciones del estudio

A lo largo de la realización de este estudio se presentó una limitación ya que como se mencionó anteriormente existen diferentes vías para la obtención del óxido de grafeno, cada una presenta características diferentes, siendo unas más biocompatibles e inductoras a diferenciación que otras. Por lo que, al emplear un material disponible en el mercado y no realizar una caracterización de dicho material no contamos con la información sobre la cantidad y el tipo de grafeno presente en el PMMA, lo que nos podría ayudar a interpretar de mejor manera los resultados obtenidos.

Perspectivas a futuro

Con la realización de este estudio se espera el desarrollo de nuevas investigaciones dentro de la Escuela Nacional De Estudios Superiores Unidad León, con el objetivo de enriquecer esta línea de investigación pudiendo estudiar diferentes líneas celulares para así determinar cuál presenta una mayor diferenciación celular, además de estudiar la interacción de este material sobre células en estado de inflamación, lo que nos podría brindar información sobre el comportamiento de este material al ser empleado posterior a una intervención quirúrgica.

CONCLUSIÓN

El óxido de grafeno ha despertado gran interés debido a la gran cantidad de oportunidades para el diseño de materiales bioactivos y su uso prometedor en ingeniería de tejidos, el PMMA modificado con óxido de grafeno ha demostrado efectos favorables en la interacción con hDPSC en la diferenciación a linajes celulares osteogénico, adipogénico y condrogénico, lo que convierte a este biopolímero en un material óptimo para la diferenciación multilínea. Basándonos en estos resultados, se plantea la posibilidad de llevar a cabo estudios *in vivo* para observar el comportamiento de este material. De obtener resultados favorables, este material podría representar una contribución significativa tanto para la medicina regenerativa como para los materiales dentales. Además de ser bioactivo, se ha demostrado que mejora las propiedades físicas del PMMA.

REFERENCIAS

1. Luengas-Aguirre, M., Sáenz-Martínez, L., Tenorio-Torres, G., Garcilazo-Gómez, A., & Díaz-Franco, M. (2015). Aspectos sociales y biológicos del edentulismo en México: un problema visible de las inequidades en salud. *Ciencias Clínicas*, 16(2), 29-36.
2. Vizcaíno, K., & Armas, A. (2022). Prevalencia de edentulismo en adultos mayores en América Latina. Revisión de literatura. *Revista Estomatológica Herediana*, 32(4), 420
3. Basso, M. (2019). Conceptos actualizados en cariología. *Rev Asoc Odontol Argent*, 107(1), 25-32.
4. López, R., Smith, PC, Göstemeyer, G. y Schwendicke, F. (2017). Envejecimiento, caries dental y enfermedades periodontales. *Revista de periodoncia clínica* , 44 , S145-S152..
5. Rüggeberg, FA (2002). De la vulcanita al vinilo, una historia de resinas en odontología restauradora. *Revista de odontología protésica* , 87 (4), 364-379.
6. González, D. W., Castañeda, A. O., Esparza, S. C., López, L. I., & Galindo, A. S. (2021). Poli (metacrilato de metilo): Un termoplástico biocompatible. Diversas aplicaciones. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 22(3), 140-146.
7. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529. PMID: 8493529.
8. Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Bhatt, VD y Dhot, PS (2019). Ingeniería de tejidos; estado actual y alcance futurista. *Revista de medicina y vida* , 12 (3), 225.
9. Rendón, J., Jiménez, L. P., & Urrego, P. A. (2011). Células madre en odontología.(Stem cells in dentistry). *CES Odontología*, 24(1), 51-58.
10. Escorcía, V. S., & Polo, J. A. R. (2020). Estrategias de ingeniería tisular de la pulpa dental: revisión de literatura. *Ciencia y Salud Virtual*, 12(2), 113-126.
11. Casagrande, L., Cordeiro, M. M., Nör, S. A., & Nör, J. E. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 99, 1-7.
12. Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(10), 589-601.

13. Rosales Ibáñez, R., Alvarado Estrada, K. N., & Ojeda Gutiérrez, F. (2012). Ingeniería tisular en Odontología. *Revista ADM [internet]*. Julio-agosto, 164-67.
14. Guadarrama Plata, O., Guadarrama Quiroz, L. J., & Robles Bermeo, N. L. (2018). Aplicaciones odontológicas de las células madre pulpaes de dientes temporales y permanentes. Revisión de estudios in vivo. *Revista ADM*, 75(3).
15. García-Torres, L. V., Flores-Hernández, F. Y., & Santibáñez-Escobar, L. P. (2018). Células madre de la pulpa dental (DPSC): perspectivas terapéuticas en enfermedades crónico degenerativas. *Salud Jalisco*, 4(3), 168-177.
16. 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
17. Flores-Figueroa, E., Montesinos, J. J., & Mayani, H. (2006). Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de investigación clínica*, 58(5), 498-511.
18. Socarrás-Ferrer, B. B., del Valle-Pérez, L. O., de la Cuétara-Bernal, K., Marsán-Suárez, V., Segura, M. S., & Macías-Abraham, C. (2013). Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica en la medicina regenerativa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(1), 16-23.
19. Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
20. Sloan, A. J., & Waddington, R. J. (2009). Dental pulp stem cells: what, where, how?. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 19(1), 61-70.
21. Guadarrama Plata, O., Guadarrama Quiroz, L. J., & Robles Bermeo, N. L. (2018). Aplicaciones odontológicas de las células madre pulpaes de dientes temporales y permanentes. Revisión de estudios in vivo. *Revista ADM*, 75(3).
22. Sánchez-Gómez, I., Gonzáles-Pelayo, G. L., Santibáñez-Escobar, L. P., Gaona-Bernal, J., Torres, L. V. G., Márquez-García, E., ... & Flores-Hernández, F. Y. (2022). Celulas troncales aisladas de piezas dentales provenientes de población mexicana el Estado de Jalisco. *Salud Jalisco*, 9(1), 16-27.

23. Sharpe, P. T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143(13), 2273-2280.
24. Li, B., Ouchi, T., Cao, Y., Zhao, Z., & Men, Y. (2021). Dental-derived mesenchymal stem cells: State of the art. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 654559.
25. Brizuela, C., Galleguillos, S., Carrión, F., Cabrera, C., Luz, P., & Inostroza, C. (2013). Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano. *International Journal of morphology*, 31(2), 739-746.
26. (Tandon, R., Gupta, S., & Agarwal, S. K. (2010). Denture base materials: From past to future. *Indian J Dent Sci*, 2(2), 33-9.)
27. Morales, S., & JE, Z. C. Polimetilmetacrilato, una alternativa viable para la fabricación de prótesis craneal
28. Gautam, R., Singh, R. D., Sharma, V. P., Siddhartha, R., Chand, P., & Kumar, R. (2012). Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100(5), 1444-1450.
29. Zafar, M. S. (2020). Prosthodontic applications of polymethyl methacrylate (PMMA): An update. *Polymers*, 12(10), 2299.
30. Ali, U., Karim, K. J. B. A., & Buang, N. A. (2015). A review of the properties and applications of poly (methyl methacrylate)(PMMA). *Polymer Reviews*, 55(4), 678-705.
31. Wang, W., Liao, S., Zhu, Y., Liu, M., Zhao, Q., & Fu, Y. (2015). Recent applications of nanomaterials in prosthodontics. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 3-3.)
32. Liu, C., Tan, D., Chen, X., Liao, J., & Wu, L. (2022). Research on Graphene and Its Derivatives in Oral Disease Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4737.
33. Torres-Silva, H., & López-Bonilla, J. L. (2011). Aspectos quirales del grafeno. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 19(1), 67-75.
34. Qi, X., Jiang, F., Zhou, M., Zhang, W., & Jiang, X. (2021). Graphene oxide as a promising material in dentistry and tissue regeneration: A review. *Smart Materials in Medicine*, 2, 280-291.
35. Xue, D., Chen, E., Zhong, H., Zhang, W., Wang, S., Joomun, M. U., ... & Pan, Z. (2018). Immunomodulatory properties of graphene oxide for

- osteogenesis and angiogenesis. *International journal of nanomedicine*, 5799-5810.
36. Kumar, S., Raj, S., Kolanthai, E., Sood, A. K., Sampath, S., & Chatterjee, K. (2015). Chemical functionalization of graphene to augment stem cell osteogenesis and inhibit biofilm formation on polymer composites for orthopedic applications. *ACS applied materials & interfaces*, 7(5), 3237-3252
 37. Felli, E., Victoria Martínez, E., Campillo Fernández, A. J., & Serrano Aroca, Á. (2016). El grafeno y sus derivados en la ingeniería tisular. *Nereis*, (8), 71-81.
 38. Rosa, V., Xie, H., Dubey, N., Madanagopal, T. T., Rajan, S. S., Morin, J. L. P., ... & Neto, A. H. C. (2016) Graphene oxide-based substrate: physical and surface characterization, cytocompatibility and differentiation potential of dental pulp stem cells. *Dental Materials*, 32(8), 1019-1025
 39. Camargos, J. S. F., de Oliveira Semmer, A., & da Silva, S. N. (2017). Características e aplicações do grafeno e do óxido de grafeno e as principais rotas para síntese. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 3(8), 1118-1130.
 40. 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
 41. Martínez-Guerra, E., Cifuentes-Quintal, M. E., & Coss, R. D. (2009). Grafeno: un paso hacia el futuro. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 2(1), 15-23.)
 42. Gonçalves, G., Marques, P. A., Barros-Timmons, A., Bdkin, I., Singh, M. K., Emami, N., & Grácio, J. (2010). Graphene oxide modified with PMMA via ATRP as a reinforcement filler. *Journal of Materials Chemistry*, 20(44), 9927-9934.)
 43. Kalbacova, M., Broz, A., Kong, J. y Kalbac, M. (2010). Los sustratos de grafeno promueven la adherencia de los osteoblastos humanos y las células estromales mesenquimales. *Carbono*, 48(15), 4323-4329.
 44. Nayak, T. R., Andersen, H., Makam, V. S., Khaw, C., Bae, S., Xu, X., ... & Ozyilmaz, B. (2011). Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS nano*, 5(6), 4670-4678.
 45. Lee, J. H., Jo, J. K., Kim, D. A., Patel, K. D., Kim, H. W., & Lee, H. H. (2018). Nano-graphene oxide incorporated into PMMA resin to prevent microbial adhesion. *Dental Materials*, 34(4), e63-e72.)

46. García-Contreras, R., Guzmán-Juárez, H., López-Ramos, D., & Alvarez-Gayosso, C. (2021). Biological and physico-mechanical properties of poly (methyl methacrylate) enriched with graphene oxide as a potential biomaterial. *Journal of Oral Research*, 10(2), 1-9.
47. Krukiewicz, K., Putzer, D., Stundl, N., Lohberger, B., & Awaja, F. (2020). Enhanced osteogenic differentiation of human primary mesenchymal stem and progenitor cultures on graphene oxide/poly (methyl methacrylate) composite scaffolds. *Materials*, 13(13), 2991.
48. Rao, C. E. E., Sood, A. E., Subrahmanyam, K. E., & Govindaraj, A. (2009). Graphene: the new two-dimensional nanomaterial. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(42), 7752-7777.
49. Maleki, M., Zarezadeh, R., Nouri, M., Sadigh, A. R., Pouremamali, F., Asemi, Z., ... & Yousefi, B. (2020). Graphene oxide: a promising material for regenerative medicine and tissue engineering. *Biomolecular Concepts*, 11(1), 182-200.
50. Jiang, T., Amadei, C. A., Lin, Y., Gou, N., Rahman, S. M., Lan, J., ... & Gu, A. Z. (2021). Dependence of graphene oxide (GO) toxicity on oxidation level, elemental composition, and size. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10578.
51. La, W. G., Jung, M. J., Yoon, J. K., Bhang, S. H., Jang, H. K., Lee, T. J., ... & Kim, B. S. (2014). Bone morphogenetic protein-2 for bone regeneration—Dose reduction through graphene oxide-based delivery. *Carbon*, 78, 428-438.
52. Huang, X., Yin, Z., Wu, S., Qi, X., He, Q., Zhang, Q., ... & Zhang, H. (2011). Graphene-based materials: synthesis, characterization, properties, and applications. *small*, 7(14), 1876-1902.
53. Banerjee, A. N. (2018). Graphene and its derivatives as biomedical materials: Future prospects and challenges. *Interface focus*, 8(3), 20170056.
54. Duran, N., Martinez, S. T., P Silveira, C., Duran, M., CM de Moraes, A., B Simoes, M., ... & J Favaro, W. (2015). Graphene oxide: a carrier for pharmaceuticals and a scaffold for cell interactions. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(4), 309-327.
55. Geim, A. K., & Novoselov, K. S. (2007). The rise of graphene. *Nature materials*, 6(3), 183-191.

56. Dubey, N., Bentini, R., Islam, I., Cao, T., Castro Neto, A. H., & Rosa, V. (2015). Graphene: a versatile carbon-based material for bone tissue engineering. *Stem cells international*, 2015.
57. Dawson, J. I., & Oreffo, R. O. (2008). Bridging the regeneration gap: stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 124-131.
58. Goenka, S., Sant, V., & Sant, S. (2014). Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 173, 75-88.
59. Elkhenany, H., Amelse, L., Lafont, A., Bourdo, S., Caldwell, M., Neilsen, N., ... & Dhar, M. (2015). Graphene supports in vitro proliferation and osteogenic differentiation of goat adult mesenchymal stem cells: potential for bone tissue engineering. *Journal of Applied Toxicology*, 35(4), 367-374.
60. Feng, L., & Liu, Z. (2011). Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine*, 6(2), 317-324.
61. Loh, K. P., Bao, Q., Ang, P. K., & Yang, J. (2010). The chemistry of graphene. *Journal of Materials Chemistry*, 20(12), 2277-2289.
62. Pinto, H. P., & Leszczynski, J. (2014). Fundamental properties of graphene. *Handbook Of Carbon Nano Materials (Volumes 5-6)*, 5.
63. Sojod, B., Périer, J. M., Zalcborg, A., Bouzegza, S., El Halabi, B., & Anagnostou, F. (2022). Enfermedad periodontal y salud general. *EMC-Tratado de Medicina*, 26(1), 1-8.
64. Tan, W. L., Wong, T. L., Wong, M. C., & Lang, N. P. (2012). A systematic review of post-extractoral alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clinical oral implants research*, 23, 1-21.

ANEXO

Participación en el 2º Congreso Internacional de BioNano Materiales con el trabajo: “Diferenciación celular de hDPSC en un cultivo con biopolímero enriquecido con óxido de grafeno” en octubre 2023.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

La Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León
a través de la División de Educación Continua e Innovación

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

Agustín Alejandro Reyes Maciel, Benjamin Aranda Herrera, Christian
Andrea López Ayuso, René García Contreras

Por su participación en el
Concurso de Presentación de Poster
con el trabajo

Diferenciación celular de hDPSC en un cultivo con biopolímero enriquecido con óxido de grafeno

llevado a cabo el
23 de octubre de 2023
en el marco del

**2º Congreso Internacional de
BioNano Materiales**

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”
León, Guanajuato, a 27 de octubre de 2023


Dra. Laura Simona Acosta Torres
Directora
ENES Unidad León, UNAM




Esp. Roberto Ruiz Díaz
Jefe de División
Educación Continua e Innovación

ENES/UNAM/DECI-20/025/001

Participación en el XXXI Encuentro Nacional y XXII Iberoamericano de Investigación en Odontología y X Jornadas Internacionales de Investigación en Odontología UAO con el trabajo: "Diferenciación celular de human dental Pulp steam cells en un cultivo con biopolímero enriquecido con óxido de grafeno" en noviembre de 2023.

