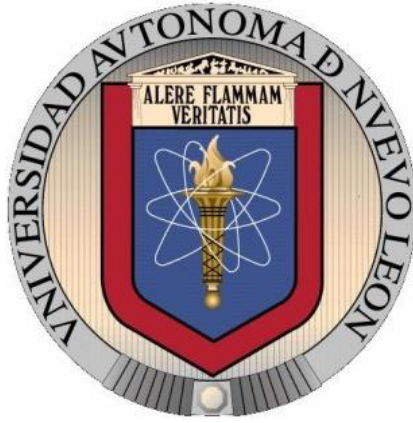


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**COMPARACIÓN *IN VITRO* DE DOS MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN  
OSTEOGÉNICA EN CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL HUMANA  
PARA SU APLICACIÓN EN REGENERACIÓN ÓSEA PERIODONTAL**

**POR**

**DELIA EUNICE GUTIÉRREZ RIVAS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN PERIODONCIA  
CON IMPLANTOLOGÍA**

**NOVIEMBRE, 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
POSGRADO DE PERIODONCIA**



**COMPARACIÓN *IN VITRO* DE DOS MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN  
OSTEOGÉNICA EN CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL HUMANA  
PARA SU APLICACIÓN EN REGENERACIÓN ÓSEA PERIODONTAL**

**POR**

**DELIA EUNICE GUTIÉRREZ RIVAS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA  
EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN PERIODONCIA  
CON IMPLANTOLOGÍA**

**2015**

COMPARACIÓN *IN VITRO* DE DOS MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN  
OSTEOGÉNICA EN CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL HUMANA PARA SU  
APLICACIÓN EN REGENERACIÓN ÓSEA PERIODONTAL.

**Comité de tesis.**

---

Director de Tesis.

---

Secretario

---

Vocal

## AGRADECIMIENTOS

La realización de ésta tesis fue, como todo trabajo de maestría, una lucha constante al recorrer un camino poco explorado aquí en Monterrey y sin embargo, gracias a la ayuda de las personas que me rodearon a lo largo de mis 3 años de estudio, fue posible culminar éste trabajo.

La lista es interminable, quisiera comenzar primero agradeciéndole a Dios por mandarme señales y fuerza para continuar motivada en éste proyecto. A mi familia, principalmente, mis papás, Delia Rivas y Eduardo Gutiérrez que siempre creyeron en mí y a pesar de no tener conocimientos en el área, estuvieron apoyándome incondicionalmente. A ellos les debo todo lo que soy, ojalá algún día tenga un poco de esa fortaleza y perseverancia que los caracteriza. A mis abuelos Eudelia y Francisco, Juanita y Francisco por darme ánimos en los momentos más complicados. Los admiro a sobremano, quisiera llegar a tener ésa inteligencia emocional que los caracteriza. A mis tíos, principalmente Elizabeth, Iris y Paco que siempre estuvieron al pendiente de mí.

Mis hermanos, Elida, Eduardo y Victoria, quienes fueron mi salida en los momentos difíciles. A mi novio, Sergio Albarrán, quien fue una de las personas que me estuvo impulsando, aportando ideas y haciendo críticas constructivas sobre el proyecto.

A la Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera, directora de la facultad de Odontología en la UANL, la Dra. Gloria Martínez Sandoval, coordinadora del posgrado de Periodoncia y mi directora de tesis, la Dra. Myriam De La Garza, directora del área de odontología en el CIDICS y codirectora de éste trabajo, el Dr. Casiano del Ángel Mosqueda, asesor de laboratorio, gracias por su paciencia, cooperación y disposición para que ésta investigación se llevara a cabo. Especialmente quisiera agradecer a la Dra. Andrea Alcázar Pizaña, quien tuvo la paciencia y dedicó su tiempo valioso para esclarecer todas

las dudas que tuve, especialmente en materia de proteómica, así mismo, con la revisión del escrito.

A la Dra. Belinda Beltrán Salinas, coordinadora del posgrado de Cirugía Maxilofacial de la facultad de Odontología en la UANL, por proporcionarme las instalaciones de su posgrado para realizar las extracciones.

Al Dr. Víctor Francisco Martínez Rodríguez, director del Centro de Especialidades Dentales y al Dr. Arturo Gutiérrez, instructor clínico de Periodoncia tanto del posgrado como del Centro de Especialidades Dentales, quienes contribuyeron a éste trabajo al facilitar el uso de sus instalaciones para realizar las extracciones dentales.

A mis maestros del posgrado por su aportación al proyecto, ya sea con unas palabras o enviándome artículos clave para la redacción de ésta tesis. Gracias a la Dra. Gabriela Chapa, subcoordinadora del posgrado de Periodoncia de la UANL, a la Dra. Brenda Garza, al Dr. Rubén Lozano, al Dr. Jesús Gavito y al Dr. Omar Elizondo coordinador del área de Periodoncia en pregrado de la facultad de Odontología de la UANL.

A la Dra. Erandi Escamilla García por sus recomendaciones durante toda la parte experimental de éste trabajo.

A mis amigos Alicia Laredo y Rubén Romero, les agradezco su cooperación y contribución a éste proyecto, pues sin su ayuda, la obtención de las células madre dentales no hubiera sido posible. Ellos, junto con Marienkys Martínez, Rosalba González, Yadira Cantú, Ana Sofía Salazar y Alma Cantú, fueron los residentes del posgrado de Ortodoncia de la UANL quienes me refirieron a los pacientes que necesitaban extracciones de los primeros premolares, de donde se obtuvo el tejido para la extracción de las células madre pulpares. Alicia y Rubén, gracias por su apoyo incondicional y sus consejos son detalles que siempre tendré presentes.

A mi mejor amigo Benjamín, quien me enseñó a dar mi mayor esfuerzo no importando las circunstancias.

A mis amigos y compañeros de generación, Rogelio Cordero, Luis Ernesto González, Isabella Meza y Dania Santamaría, con quienes viví la experiencia de estudiar una

maestría, les agradezco su amistad, apoyo, tolerancia y comprensión durante todos estos 3 años de estudio.

A mis compañeros de las demás generaciones del Posgrado, les agradezco también su cooperación e interés en mi estudio. Ricardo, Andrea, Andrés, Lucía, Isis, César, María Fernanda, Alexandra, Carolina, Rocío, César y Paulina.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>X</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	<b>4</b>
<b>3.2 Objetivos particulares</b> .....	<b>4</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
<b>4.1 La enfermedad periodontal y los defectos intraóseos</b> .....	<b>5</b>
<b>4.1.1 Periodontitis crónica</b> .....	<b>5</b>
<b>4.1.2 Lesiones óseas periodontales: el defecto óseo.</b> .....	<b>6</b>
<b>4.1.2.1 Clasificación de los defectos óseos.</b> .....	<b>6</b>
<b>4.1.3 Tratamiento de los defectos intraóseos</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1.3.1 Objetivos del tratamiento periodontal.</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1.3.2 Cicatrización de defectos periodontales.</b> .....	<b>9</b>

<b>4.1.3.3 Opciones terapéuticas para la regeneración de los defectos intraóseos periodontales: La ingeniería tisular.....</b>	<b>11</b>
<b>4.1.3.3.1 Los injertos óseos: materiales para relleno óseo. ....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.3.3.2 La Regeneración Tisular Guiada.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.3.3.3 Factores de crecimiento y de diferenciación.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2 La terapia celular como alternativa en los tratamientos de defectos óseos periodontales.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2.1 La pulpa dental .....</b>	<b>14</b>
<b>4.2.2 Célula madre: conceptos básicos.....</b>	<b>16</b>
<b>4.2.3 Tipos de células madre .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2.3.1 Células Madre Embrionarias .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.3.2 Células madre del adulto. ....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.3.2.1 Células madre pluripotenciales inducidas (iPS) .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.3.2.2 Células madre derivadas del fluido amniótico .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.3.2.3 Células madre del cordón umbilical.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.3.2.4 Células madre de la médula ósea .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.3.2.5 Células madre derivadas del tejido adiposo.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2.3.2.6 Células madre dentales.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2.4 Cualidades de las células madre que las hace una opción de tratamientos para su aplicación en el área dental.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.5 Células madre mesenquimales de la pulpa dental (CMMMPD): Genotipo y fenotipo.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Diferenciación osteoblástica de células provenientes de la pulpa dental. ....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.1 El osteoblasto: morfología celular y funciones.....</b>	<b>24</b>



4.3.2. El proceso de osteodiferenciación <i>in vitro</i> .....	26
4.3.2.1. La expresión de proteínas óseas durante la osteodiferenciación <i>in vitro</i> .....	27
4.3.2.1.1 Fase proliferativa.....	27
4.3.2.1.2 Fase de maduración de la matriz ósea.....	28
4.3.2.1.3 Fase de mineralización propiamente dicha.....	29
4.3.2.1.3.1 Formación de nódulos minerales.....	30
4.3.3 Medios de cultivo para diferenciación osteoblástica .....	31
4.3.3.1 Medio tradicional para diferenciación osteoblástica. ....	31
4.3.3.2 Medio de osteodiferenciación de patente: Osteodiff.....	33
5. MÉTODOS.....	34
5.1 Diseño del estudio.....	34
5.2 Descripción de procedimientos.....	34
5.2.1 Obtención del tejido.....	34
5.2.2 Obtención de las células madre mesenquimales de la pulpa dental. ....	35
5.2.2.1. Descongelamiento, sembrado y proliferación. ....	37
5.2.2.1.1 Protocolo de descongelamiento de células mesenquimales de la pulpa dental.....	37
5.2.2.3 Inducción osteogénica.....	38
5.2.2.3.1 Protocolo de Tripsinización.....	38
5.2.2.3.2 Conteo celular por medio de la cámara de Neubauer.	39
5.6.2.4 Tinciones.....	41
5.2.2.4.1. Protocolo de tinción con Alizarina Roja.....	41
5.2.2.4.2 Protocolo de tinción con autofluorescencia. ....	42

5.2.2.5 Cuantificación de proteínas con el método de Bradford y electroforesis .....	43
5.2.2.5.1 Protocolo de electroforesis.....	44
5.2.2.5.2 Protocolo de tinción de nitrato de plata.....	44
5.2.2.5.3 Protocolo de fijación de gel de acrilamida.....	45
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
6.1 Proliferación .....	46
6.2 Osteodiferenciación: tinciones y morfología.....	47
6.2.1 Tinción de Alizarina Roja.....	48
6.2.2 Autofluorescencia con Eosina y DAPI como contraste.....	51
6.3 Electroforesis bidimensional .....	54
6.3.1 Proteínas con un peso molecular similar a aquéllas que participan en el proceso de mineralización ósea.....	55
6.3.2 Proteínas expresadas cuyos pesos moleculares no corresponden a aquéllas que participan en la mineralización ósea.....	56
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>58</b>
<b>8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>65</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** *Comparación de los sitios de extracción de las células madre.....20*

**Tabla 2.** *Proteínas que constituyen al marcador de peso molecular.....55*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>El proceso de diferenciación celular en tejidos periodontales</i> .....	23
<b>Figura 2:</b> <i>Extracción y transporte de la muestra</i> .....	35
<b>Figura 3:</b> <i>Obtención y disgregación del tejido pulpar</i> .....	36
<b>Figura 4:</b> <i>Frasco para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup></i> .....	38
<b>Figura 5:</b> <i>Cámara de Neubauer o Hemocitómetro</i> .....	39
<b>Figura 6:</b> <i>Esquema que muestra los componentes de una Cámara de Neubauer</i> .....	40
<b>Figura 7:</b> <i>Agitador empleado para la tinción de Rojo Alizarina</i> .....	42
<b>Figura 8:</b> <i>Invertoscopio con fluorescencia</i> .....	43
<b>Figura 9:</b> <i>Fotomicrografía en microscopio invertido, 10x</i> .....	46
<b>Figura 10:</b> <i>Vista macroscópica de los pozos a los 6, 12 y 18 días, en el grupo control, medio de osteodiferenciación tradicional y el medio de patente</i> .....	47
<b>Figura 11:</b> <i>Cultivo de células madre de la pulpa dental en 3 medios de cultivo, Técnica de Rojo Alizarina, 10x</i> .....	48
<b>Figura 12:</b> <i>Cultivo de células madre de la pulpa dental en 3 medios de cultivo para diferenciación, Técnica de Autofluorescencia (Eosina con DAPI) , 10x</i> .....	51
<b>Figura 13:</b> <i>Gel de poliacrilamida al 10%</i> .....	54

## NOMENCLATURA

ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ALP:	Fosfatasa Alcalina
ARN:	Ácido ribonucleico.
BMP-2:	Proteína Morfogenética Ósea.
BrdU:	Bromodeoxiuridina
CD105:	Marcador de superficie de membrana.
CD13:	Marcador de superficie de membrana.
CD144:	Marcador de superficie de membrana.
CD146:	Marcador de superficie de membrana.
CD166:	Marcador de superficie de membrana.
CD24:	Marcador de superficie de membrana.
CD29:	Marcador de superficie de membrana.
CD34:	Marcador de superficie de membrana.
CD44:	Marcador de superficie de membrana.
CD45:	Marcador de superficie de membrana.
CD73:	Marcador de superficie de membrana.
CD90:	Marcador de superficie de membrana.
CMM:	Células Madre Mesenquimales.
CMMLP:	Células Madre Mesenquimales del Ligamento Periodontal.
CMMMO:	Células Madre Mesenquimales de la Médula Ósea.
CMMPD:	Células Madre Mesenquimales de la Pulpa Dental

CO <sub>2</sub> :	Dióxido de Carbono.
DAPI:	Tinción utilizada para dar contraste en técnica de autofluorescencia.
DMEM:	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco.
DPSCs:	Células madre de pulpas de dientes permanentes.
GentleMACS:	Disgregador de tejido.
HCL:	Ácido clorhídrico.
HLA-DR:	Marcador de superficie de membrana.
IGF-1:	Factor de Crecimiento 1 derivado de la Insulina.
IGF-2:	Factor de Crecimiento 2 derivado de la Insulina.
integrina $\beta$ -2:	Marcador de superficie de membrana.
iPS:	Células madre pluripotenciales inducidas.
MUC-18:	Marcador de superficie de membrana.
NH <sub>4</sub> OH:	Hidróxido de amonio.
OCN:	Osteocalcina.
Oct4:	Marcador de superficie de membrana.
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	Buffer Fosfato Salino
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa. (Polymerase Chain Reaction)
PDGF:	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
PDLSCs:	Células madre del ligamento periodontal.
PLA:	Polímero poly-L-láctico
PLGA:	Polímero poly-L-láctico-co-glicólido.
RT-PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa.
SFB:	Suero Fetal Bovino

SHED CELLS: Células madre de pulpas de dientes temporales.

STRO-1: Marcador de superficie de membrana.

TGF-  $\beta$ : Factor  $\beta$  de crecimiento tumoral.

TGF-1: Factor 1 de crecimiento tumoral.

## RESUMEN

**Introducción.** Las enfermedades periodontales que llevan a la destrucción de los tejidos de soporte, son la principal causa de la pérdida dental en adultos. La pulpa dental, contiene células progenitoras que contribuyen a la regeneración de dichas estructuras.

**Objetivo.** Observar *in vitro* el potencial osteogénico de las células madre de la pulpa dental (CMMPD) empleando dos medios de osteodiferenciación, con la finalidad de aplicar la terapia celular como una opción en la regeneración de los defectos intraóseos periodontales.

**Métodos.** Se obtuvieron CMMPD de 20 premolares extraídos por motivos ortodónticos. Se evaluaron 2 medios de osteodiferenciación: uno tradicional (MT) y otro de patente (MP) a los 6, 12, y 18 días, teniendo un cultivo de CMMPD en medio de crecimiento como un grupo control (GC). Las células se tiñeron con Rojo Alizarina y eosina con DAPI a los días 6, 12 y 18, para observar que acúmulos de mineralización y su morfología. Los sobrenadantes de los tres grupos fueron recolectados para ser analizados por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

**Resultados.** El MP registró pequeños nódulos de mineralización desde el día 6 siendo más evidente en el día 18, donde abundaba material calcificado, mientras que en la autofluorescencia se observó el cambio morfológico característico de osteoblastos a partir del día 6. El MT registró pequeños nódulos hasta el día 18. La electroforesis demostró que el MP ya no presentaba liberación protéica a diferencia del resto de los grupos lo que significa que las proteínas óseas ya se encontraban incluidas dentro de la matriz ósea en formación, es decir, tejido mineralizado. El grupo control no presentó mayores cambios además de la proliferación.

**Discusión y conclusiones.** El medio de patente (OsteoDiff, Miltenyi Biotec), resultó ser más eficiente debido a que las CMMPD registraron una formación más rápida de tejido óseo comparado con el medio tradicional de osteodiferenciación con dexametasona. Éste medio agiliza tiempos de cultivo de células osteoprogenitoras, por lo tanto, permitirá que la terapia celular en los defectos intraóseos periodontales sea una alternativa accesible y se sume a los tratamientos existentes.





## ABSTRACT

**Background:** Periodontal diseases that lead to destruction of the supporting tissues are the main cause of dental loss in adults. Dental pulp contains stem cells that take part in the regeneration of such structures. **Purpose:** To observe *in vitro* the osteogenic potential of dental pulp stem cells (DPSC's) using 2 osteogenic media in order to apply the cell therapy as a treatment option of periodontal intraosseous defects. **Methods.** DPSCM's were obtained of 20 extracted human premolars due to orthodontic reasons. 2 osteogenic media were evaluated: a traditional media (TM) and a commercial media, OsteoDiff by Miltenyi Biotec (CM) at days 6, 12 and 18 of osteogenic differentiation. A regular DPSC culture was chosen as a control group (CG). The 3 groups were stained with Alizarin Red and autofluorescence microscopy with eosin and DAPI as counterstaining; and the supernatant of the 3 groups was collected to analyze the protein expression by gel electrophoresis at days 6, 12 and 18. **Results.** CM presented small mineralized nodules since day 6, being increased on day 18, where the calcified material was abundant and also, a distinctive change to an osteoblast-like morphology was observed. TM exhibited small nodules until day 18. The electrophoresis analysis indicated that unlike the other media, CM did not liberate proteins on an active way, instead, probably they were already incorporated in the bone matrix in formation. Besides proliferation, nothing changed in CG. **Discussion and conclusion.** The CM (OsteoDiff, Miltenyi Biotec) resulted in an efficient osteogenic media because DPSC's registered a rapid cell differentiation thus, a faster formation of mineralized nodules compared with TM. CM reduces the timing of osteogenic differentiation, and in consequence, cell therapy could be an attainable option to treat intraosseous periodontal defects.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los gobiernos de los países desarrollados y en vías de desarrollo están conscientes de que la pérdida dental asociada tanto a caries, como a enfermedades periodontales, es un problema que afecta la calidad de vida de los ciudadanos y que conlleva a otras enfermedades tanto físicas como psicológicas. Según la OMS, alrededor del 15% de los adultos en todo el mundo tienen enfermedad periodontal avanzada, es decir, una profundidad de bolsa periodontal de 6 mm o más.

La formación de una lesión periodontal se considera resultado del crecimiento apical de la placa subgingival con una resorción concomitante de hueso dentro de un radio de 2 mm. de la superficie radicular. (Papapanou y Tonetti, 2000)

Se han aplicado dos filosofías al momento de tomar una decisión terapéutica: a) colocar un material de “relleno” con la finalidad de inducir la regeneración ósea y b) estimular a los componentes celulares del periodonto para participar en los procesos regenerativos. (Bartold et al, 2000)

Investigaciones anteriores se han enfocado a encontrar el material óseo regenerativo más predecible y seguro. Por lo tanto, en la actualidad, teniendo como respaldo la literatura, se busca emplear la terapia celular, con la finalidad de utilizar células madre de origen dental como injerto autólogo en el que, por medio de un andamiaje, se coloquen en las áreas dañadas. (Gronthos et al, 2000; d’Aquino et al, 2009)

Los estudios realizados *in vitro* sobre células madre mesenquimales se dirigen principalmente a la evaluación de la formación mineral, debido a que, propiciar un medio parecido a la parte interna de un defecto periodontal es complicado para estudiar la formación de tejidos distintos en un solo cultivo, pues son diversas situaciones las que se deben reproducir, como la circulación sanguínea, células adyacentes al defecto,

señalización, entre otras. (Nagatomo et al, 2006; d'Aquino et al, 2009; Gronthos et al, 2000)

En ésta investigación se evaluó el potencial osteogénico de las células madre obtenidas de tejido pulpar utilizando dos medios de osteodiferenciación, uno tradicional con dexametasona y uno de patente con la finalidad de observar *in vitro* el potencial osteogénico de las células madre de la pulpa dental empleando dos medios de osteodiferenciación, para aplicar ésta terapia celular como una opción en el tratamiento regenerativo de los defectos intraóseos periodontales.

## **2. HIPÓTESIS**

El medio de patente de osteodiferenciación es más eficiente que el medio tradicional para ser utilizado como una opción en el tratamiento regenerativo de los defectos intraóseos periodontales, pues se obtendrá una mayor producción de nódulos minerales.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Examinar *in vitro* el potencial osteogénico de las células madre de la pulpa dental empleando dos medios de osteodiferenciación, con la finalidad de aplicar la terapia celular como una opción en el tratamiento regenerativo de los defectos intraóseos periodontales.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- Obtener la pulpa dental de premolares extraídos a pacientes de 11 a 25 años, sin enfermedades sistémicas o condiciones que complicaran su exodoncia.
- Cultivar y proliferar las células madre del vial que fue congelado.
- Diferenciar las células madre mesenquimales a células osteoprogenitoras utilizando dos medios de osteodiferenciación, el medio tradicional y OsteoDiff.
- Analizar, mediante microscopio de fluorescencia la osteodiferenciación de las células madre en un medio de patente y tradicional, a los 6, 12 y 18 días.
- Evaluar la expresión de proteínas en los medios de osteodiferenciación, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), a 6, 12 y 18 días.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1 La enfermedad periodontal y los defectos intraóseos.**

#### **4.1.1 Periodontitis crónica**

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa que causa inflamación en los tejidos de soporte dental, pérdida progresiva de la inserción y pérdida ósea. Está asociada con la presencia de placa dentobacteriana. (AAP, 2001; Haffajee et al, 1994; Page et al 1997)

Los tejidos marginales engrosados y fibrosos pueden ocultar los cambios inflamatorios subyacentes, puesto que la progresión de la periodontitis crónica es de lento avance. Como signos clínicos se observan la hemorragia gingival, ya sea espontánea o reactiva al sondeo, la profundidad al sondeo es variable y se encuentran pérdidas óseas horizontales o verticales. La movilidad dentaria es común en casos avanzados de pérdida ósea. (AAP, 2001)

Los datos epidemiológicos disponibles en la Organización Mundial de la Salud muestran que la prevalencia de la enfermedad periodontal y la severidad tienden a ser altos en los grupos de mayor edad que en los jóvenes. (Petersen y Ogawa, 2005)

Según la OMS, alrededor del 15% de los adultos en todo el mundo tienen enfermedad periodontal avanzada (profundidad de bolsa periodontal de 6mm o más) siendo el deber de la mayoría de los países el establecer un sistema de vigilancia para medir el progreso

en el control de la enfermedad periodontal y la promoción de la salud oral. (Petersen y Ogawa, 2005)

Si la enfermedad periodontal no es tratada, el resultado es la pérdida de los órganos dentarios, debido a que la destrucción del hueso alveolar progresa a tal grado que se incrementa gradualmente la movilidad dental.

#### **4.1.2 Lesiones óseas periodontales: el defecto óseo.**

La pérdida de soporte dental es una característica de la enfermedad periodontal destructiva y se considera que representa la secuela anatómica a la dispersión apical de la periodontitis. La extensión y severidad de la pérdida de hueso alveolar en la dentición se evalúan clínica y radiográficamente y es importante realizarlo para el correcto diagnóstico, plan de tratamiento y evaluación del pronóstico del paciente.

La presencia de las lesiones óseas se relacionan con la pérdida de soporte dental, a la especificidad de sitio de la destrucción periodontal, y a la posibilidad de que nichos ecológicos (bolsas profundas y lesiones de furca) asociados con algunas lesiones óseas representen factores de riesgo específicos del sitio (Papapanou y Tonetti, 2000)

Independientemente del número y naturaleza de los factores involucrados, la formación de una lesión periodontal se considera resultado del crecimiento apical de la placa subgingival con una resorción concomitante de hueso dentro de un radio de 2 mm. de la superficie radicular. (Papapanou y Tonetti, 2000; Goldman y Cohen, 1958)

##### **4.1.2.1 Clasificación de los defectos óseos.**

La morfología de los defectos óseos se determina por una variedad de factores que incluyen a la localización de los microorganismos en la superficie radicular,



anatomía radicular, grosor del hueso alveolar, posición de la raíz dentro del proceso alveolar y la relación con otras lesiones periodontales. (Papapanou y Tonetti, 2000; Goldman y Cohen, 1958)

- **Defectos supraóseos:** La base de la bolsa periodontal se encuentra coronal a la cresta alveolar.
- **Defectos infraóseos.** La bolsa periodontal se encuentra en su base, localizada apical a la cresta alveolar residual. Los defectos infraóseos afectan sólo a un diente mientras que los cráteres afectan 2 superficies dentales adyacentes a una extensión similar. Éstos se clasifican según las paredes óseas remanentes, el ancho del defecto, la extensión topográfica alrededor del diente.
  - **Defecto de 3 paredes:** Se localizan en áreas interdentes. Superficies linguales de piezas mandibulares y maxilares donde la placa lingual está intacta así como ambas paredes interproximales. Pueden extenderse hasta involucrar 2 ó 3 superficies dentales. 4 superficies: es un defecto de 4 paredes (bucal, lingual, mesial, distal) En la radiografía se observan bolsas en áreas interdentes, colocar puntas de gutapercha, sonda periodontal o una punta de Hirschfield.
  - **Defecto de 2 paredes:** Su localización es en áreas interdentes. En cráter: sólo están paredes lingual y vestibular. Paredes remanentes: bucal y proximal, lingual y proximal.
    - **Cráter:** Defecto en forma de copa o cuenca. Pérdida interdental de 2 piezas contiguas y una posición más coronal de la cresta alveolar lingual y vestibular. Es el resultado de la dispersión hacia apical de la periodontitis a lo largo de dos raíces adyacentes en un área interproximal estrecha mesiodistalmente.
  - **Defecto de 1 pared:** En el área interdental sólo se encuentra la pared proximal remanente. Menos común es la presencia de sólo una pared lingual o bucal.

- **Combinaciones:** La parte apical de la bolsa tiene más paredes remanentes que la porción coronal.
- **Defectos interradiculares.**
  - Horizontales.
  - Verticales.

### **4.1.3 Tratamiento de los defectos intraóseos.**

#### **4.1.3.1 Objetivos del tratamiento periodontal.**

Los gobiernos de los países desarrollados y en vías de desarrollo están consientes de que la pérdida dental asociada tanto a caries dental como a enfermedades periodontales, es un problema que afecta la calidad de vida de los ciudadanos y que conlleva a otras enfermedades tanto físicas como psicológicas.

En la Encuesta Nacional de Salud realizada entre el 2002 y 2003 por el gobierno mexicano en colaboración con la Organización Mundial de la Salud, se encontró que el edentulismo era del 10.2% de las personas encuestadas, de las cuáles 30.6% eran mayores de 65 años y 2.4% eran adultos jóvenes (entre 35 y 44 años). Cabe mencionar que dicha encuesta se realizó sólo en 20 estados de la República, siendo un total de 13,966 encuestados mayores de 35 años que representan a 29,853,607 habitantes. (Medina Solís; 2006)

La encuesta anterior nos demuestra la necesidad de detener dicho problema de salud pública, mediante el desarrollo o mejora de los tratamientos que se ofrecen a los pacientes.

Hoy en día la terapia periodontal cuenta con dos objetivos principales:

- 1) La reducción o eliminación de la inflamación, inducida por bacterias de la placa

y por sus productos,

- 2) La corrección de defectos o problemas anatómicos causados por el proceso de la enfermedad periodontal.

Los procedimientos quirúrgicos que logran alcanzar ambos objetivos han cambiado notablemente la práctica periodontal en las últimas décadas.(Zander, et al. 1976) Desde los 60's, 70's y 80's las terapias consistían en realizar gingivectomía, curetajes, raspados y alisados radiculares, colgajos para acceso quirúrgico y cirugía ósea resectiva. Diferentes investigaciones realizadas en esos años concluyeron que éstos tratamientos tendrían éxito si el clínico removía constantemente los depósitos de placa dentobacteriana de las superficies radiculares y el paciente conservaba su higiene dental. (Kornman y Robertson, 2000)

En los últimos 15 años, se demostró que además de cumplir con los puntos mencionados anteriormente, los sitios afectados responden de manera distinta, especialmente lo que tienen un mayor daño. Así mismo, se desarrollaron nuevas técnicas quirúrgicas que involucran membranas e injertos como una opción para regenerar el tejido duro y blando sin realizar procedimientos resectivos. Entonces, a partir de ese momento, se ha puesto especial atención en las terapias regenerativas y reconstructivas. (Kornman y Robertson, 2000; Bartold et al, 2000)

En lo que a la regeneración de los tejidos destruidos respecta, se han aplicado dos filosofías para el momento de tomar una decisión terapéutica: a) colocar un material de “relleno” con la finalidad de inducir la regeneración ósea y b) estimular a los componentes celulares del periodonto para participar en los procesos regenerativos. (Bartold et al, 2000)

#### **4.1.3.2 Cicatrización de defectos periodontales.**

Los diferentes procedimientos periodontales realizados incluso en un mismo paciente, resultan en distintas formas de cicatrización. Si se desea la regeneración de

los tejidos periodontales, esto es, la restauración del periodonto al estado anatómico y funcional que existía antes de la enfermedad, el sitio de la herida que estaba habitado por las células de los diversos tejidos, debe ser reparado por sus respectivos componentes celulares. (Nyman et al, 1982; Melcher, 1985; Polimeni et al, 2006)

Si las células de otro tejido colonizan un área de la herida en particular, la cicatrización puede distorsionar la anatomía y la función del órgano. Por lo tanto, no habrá ocurrido regeneración, si no una reparación, la cual es una restauración de la continuidad del tejido sin tener en cuenta la forma o función.(Melcher, 1985; Nyman et al, 1982)

La reparación puede manifestarse de distintas maneras, dependiendo de qué grupo celular colonice primero el sitio de la herida. Un ejemplo es la formación de un epitelio largo de unión, el cual se caracteriza por un epitelio delgado que se extiende apicalmente entre la superficie radicular y el tejido conectivo gingival. Una nueva inserción está dada por el tejido conectivo, esto es, fibras de colágeno orientadas de manera paralela o perpendicular a una superficie radicular que estuvo previamente expuesta a la periodontitis o que ha perdido su inserción periodontal. (Polimeni et al, 2006)

La regeneración periodontal requiere una nueva inserción del tejido conectivo a la superficie del diente, un proceso que involucra la formación de nuevo cemento en superficies expuestas, las síntesis de fibras y la inserción dentro de hueso. (Silverio et al. 2010)

La regeneración de los tejidos perdidos, depende de la disponibilidad de los tipos celulares necesarios para ello, así como de la presencia o ausencia de señales que recluten y estimulen a dichos tipos celulares. La matriz extracelular regula esa respuesta celular y las células madre que residen en el ligamento periodontal son los responsables de la regeneración de los tejidos periodontales (Polimeni et al, 2006)

Existen distintos factores que pueden influenciar el resultado regenerativo durante el manejo de los defectos óseos periodontales, tales como la contaminación bacteriana, el potencial innato de cicatrización de heridas, las características del sitio del defecto y la

técnica quirúrgica empleada. (Kornman y Robertson, 2000)

#### **4.1.3.3 Opciones terapéuticas para la regeneración de los defectos intraóseos periodontales: La ingeniería tisular.**

En el pasado se consideraba el dejar la raíz lo más limpia y lisa posible para crear un ambiente estable para que las células la repoblaran, para lograr esto, se han utilizado sustancias como ácidos o de recubrimiento como la fibronectina. Sin embargo, éstos procedimientos no producen los resultados esperados. (Polimeni et al, 2006; Melcher, 1985; Nyman et al, 1982)

El concepto de ingeniería tisular en la periodoncia comenzó con la regeneración tisular guiada, un enfoque mecánico que empleaba membranas no reabsorbibles para regenerar los defectos periodontales. En el área de implantología, la regeneración ósea guiada sigue el mismo principio, agregando mayor soporte a las membranas con la ayuda de injertos óseos, con la finalidad de aumentar el tejido óseo para la correcta colocación de un implante dental. (Kao et al, 2009; Nyman et al, 1982)

Dentro de la variedad de tratamientos que existen actualmente para lograr la regeneración de los defectos periodontales, se enumeran: la colocación de injertos óseos, y la ingeniería tisular, dentro de la cual, se encuentra la regeneración tisular guiada y la colocación de materiales de origen biológico como los factores de crecimiento, proteínas, células, empleando medios de transporte o andamios como las esponjas de colágeno.

#### 4.1.3.3.1 Los injertos óseos: materiales para relleno óseo.

A través del tiempo, se han practicado procedimientos quirúrgicos para mejorar la respuesta tisular del periodonto y que lleve a la regeneración. En respecto a la formación de tejido óseo, se han utilizado distintos injertos, tales como los alógenos, entre ellos el aloinjerto óseo desecado, congelado y desmineralizado y los injertos congelados y desecados; los xenoinjertos como los que provienen del hueso bovino; los injertos aloplásticos, como la cerámica para uso biológico,  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), e hidroxiapatita. (Polimeni et al, 2006; Melcher, 1985; Nyman et al, 1982)

Se requieren tres propiedades para un injerto óseo ideal:

- 1) **Osteoconducción:** Que funcione como un “andamio” para la regeneración ósea.
- 2) **Osteoinducción:** Promueve el reclutamiento de células formadoras de hueso, como las células indiferenciadas y los preosteoblastos y la producción ósea por parte de éstas.
- 3) **Osteoproliferación:** Inducción de las células contenidas en el injerto para promover la regeneración ósea.

Los aloinjertos carecen de osteoproliferación y los xenoinjertos e injertos aloplásticos han demostrado sólo osteoconducción. Los autoinjertos son los únicos que presentan las tres propiedades, por tal motivo, se han considerado como el mejor material. Comúnmente se usa la cresta ilíaca como injerto autógeno, sin embargo, hay ciertos problemas con el injerto del tejido autógeno, como el riesgo de infección en el sitio donador, cantidad limitada de volumen óseo disponible y una marcada resorción del tejido injertado. (Kornman et al, 2000; Kao et al, 2009; Nampo et al, 2010)

#### 4.1.3.3.2 La Regeneración Tisular Guiada

Se propuso en los años ochenta, consiste en introducir una barrera física como una membrana, entre el tejido conectivo del colgajo periodontal y la superficie dental

alisada. La membrana previene la migración de epitelio gingival y células de tejido conectivo a la superficie radicular hacia la superficie para facilitar la migración de células del ligamento periodontal, con la finalidad de que éstas generen hueso, cemento y ligamento periodontal.

Los estudios clínicos a largo plazo han demostrado que son mínimas las mejoras a éste procedimiento, como la infección de la membrana y la incapacidad de cerrar de primera intención el colgajo. Por lo tanto, tiene una predictibilidad clínica muy limitada. (Nyman et al, 1982; Melcher, 1985; Kornman y Robertson, 2000)

#### **4.1.3.3 Factores de crecimiento y de diferenciación.**

Se aplican a las superficies radiculares para estimular la repoblación celular de los defectos periodontales y subsecuentemente, inducir la regeneración. Un grupo prometedor es el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas y el Factor -1 similar a Insulina que mejoran la regeneración en perros y monos con periodontitis experimental. (Cochran y Wozney, 1999; Bartold et al, 2000)

Una de las desventajas de utilizar factores de crecimiento para la regeneración de defectos periodontales es que no está comprendida del todo la forma en la que las células periodontales se diferencian, las células sobre las que éstos factores de crecimiento actúan específicamente, así como la estabilidad de los tejidos que serán regenerados por dichos factores. (Bartold et al, 2000)

Las proteínas óseas morfogenéticas estimulan la formación ósea ya sea en un defecto intraóseo, en un sitio con periimplantitis, en el seno maxilar o en un reborde óseo edéntulo además de que estimulan la regeneración de cemento. Actualmente, no existen estudios sólidos que establezcan su efectividad a largo plazo, el tratamiento con éstas puede ser poco satisfactorio, debido a su elevado costo, la dificultad de su obtención, el manejo, su aislamiento en la cavidad oral, etc. (Cochran y Wozney, 1999; Bartold et al, 2000)

## **4.2 La terapia celular como alternativa en los tratamientos de defectos óseos periodontales.**

La terapia celular forma parte de la ingeniería tisular y es un área de reciente aplicación clínica. Las células madre de una pequeña cantidad de tejido, como de la pulpa dental, se pueden multiplicar o expandir a una cantidad suficiente para tratar defectos grandes, clínicamente significativos. La capacidad de éstas células de diferenciarse a múltiples linajes, brinda la posibilidad de que en un mismo paciente, se regeneren distintos tejidos. Éstas células pueden colocarse en andamios o medios de transporte de la forma de la estructura anatómica a ser reemplazada. Dichos andamios deberán brindar soporte y deben ser reabsorbidos cuando se complete la cicatrización. (Mao et al., 2006)

### **4.2.1 La pulpa dental**

La pulpa dental es un tejido conectivo suave y su principal función es producir dentina y mantener la vitabilidad biológica y fisiológica de la dentina. Además, posee un sistema nervioso sensorial que genera dolor insoportable cuando el diente es dañado por trauma mecánico, irritación mecánica o invasión microbiana.

La pulpa dental se origina de la papila dental que se forma del mesénquima que se condensa alrededor del órgano del esmalte, otro tejido que se origina a partir de la misma estructura es la dentina. (Thesleff y Tummers, 2008)

Se han encontrado tipos de células de la pulpa denominadas células madre posnatales (DPSCs), las cuales muestran las características de células madre



mesenquimales y más importante, la habilidad de formar un complejo pulpa-dentinal así como estructuras para formar dentina las cuales existen en la superficie dentinal humana, esto, en ratones inmunocomprometidos. (Huang, 2009)

Estudios previos señalan que los osteoblastos que se diferencian de las DPSCs, secretan abundante matriz extracelular y pueden formar hueso entretejido (woven bone) in vitro. Además, las DPSCs son capaces de formar un hueso laminar completo y bien vascularizado luego de injertarlas en ratas inmunosuprimidas. (D'Aquino et al, 2009)

Las células madre mesenquimáticas (CMM) pueden proliferar rápidamente y diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, condrocitos y posiblemente, en células musculares.

Las CMM expresan marcadores celulares en su superficie celular, incluyendo a CD105, y CD166. Se identificó a STRO-1 originalmente en una colonia formadora de precursores celulares osteogénicos, aislados de la médula ósea. (Nagatomo, et al 2006)

Por lo tanto gracias a numerosos estudios, se ha demostrado que las CMM expresan los marcadores positivos: STRO-1, CD13, CD44, CD24, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, Oct4, Nanog e integrina  $\beta$ -2; y los marcadores negativos: CD14, CD34, CD45, y HLA-DR. (Huang, 2009)

Así como sucede en las células madre mesenquimales, las células madre de origen dental, son también heterogéneas y los distintos marcadores enumerados pueden expresarse por subpoblaciones de éstas células. (Huang, 2009)

En el estudio realizado por Nagatomo y colaboradores, se cuantificaron las células del ligamento periodontal para definir sus propiedades de células madre, incluyendo su

autorenovación, multipotencialidad y su marcador celular. Aproximadamente 30% de 400 células del ligamento periodontal tenían potencial replicativo y formaban colonias de una sola célula, 30% de estas colonias desarrollaron tinción positiva a STRO-1, 20% se diferenciaron en adipocitos, 30% en osteoblastos. Presentaron marcadores CD105, CD166 y STRO-1. Determinaron que las células del ligamento periodontal pueden usarse para procedimientos regenerativos. (Nagatomo, et al 2006)

#### **4.2.2 Célula madre: conceptos básicos.**

Stem cell (célula madre) es una célula que puede hacer réplicas exactas de sí misma indefinidamente. Además, dicha célula tiene la capacidad de producir líneas celulares especializadas para varios tejidos del cuerpo.

Los vertebrados se derivan de 3 capas germinales; ectodermo, mesodermo y endodermo y de las células de la cresta neural, la cuarta capa, cuyas células han demostrado multipotencialidad y se han diferenciado en células mesenquimáticas de mesodermo, a pesar de ser del ectodermo. Muestran una alta capacidad de auto regeneración y persisten en los tejidos del adulto. (Nampo, 2010; Bartold et al, 2006; Mao et al 2006)

Los tejidos derivados de la cresta neural incluyen a los huesos maxilofaciales (excluyendo al occipital, esfenoides, temporal, y etmoides), cartílago, dientes, nervios y células gliales. (Nampo, 2010) En 1916, Danchakoff describe la presencia de una célula como precursora de otras en la médula ósea. (Danchakoff, 1916)

El primer dato del uso de las células madre se remonta a casi un siglo cuando médicos administraron médula ósea rica en células madre por la boca a pacientes con anemia o leucemia.

Las células madre mesenquimales se describen como multipotenciales por su habilidad, incluso como células aisladas clonadas, de exhibir el potencial para diferenciarse en una variedad de linajes celulares y tisulares. (Nampo, 2010; Bartold et al, 2006; Mao et al 2006)

Existe una falta de unificación en la definición así como en la información de marcadores específicos que definen a los tipos celulares caracterizados como células madre mesenquimales, con la sola definición de tener la habilidad de diferenciarse en linajes celulares específicos cuando son inducidas a ello. (Bartold et al, 2006; Mao et al 2006)

En relación al medio sobre el cual transportar dichas células para que lleven a cabo su acción regenerativa, un número de vehículos de entrega han sido utilizados en matrices celulares a base de resina in vivo, tales como las cerámicas porosas de hidroxiapatita y  $\beta$ -fosfato tricálcico cargado con células madre mesenquimáticas autólogas. Estos son capaces de cicatrizar defectos óseos segmentados de tamaño crítico que no eran capaces de cicatrizar por las células residentes o la adición de algún medio osteoconductor solo. (Bartold et al, 2006; Mao et al 2006)

Un estudio in vitro reciente que comparaba los polímeros biodegradables poly-L-lactico (PLA) y poly-L-lactido-co-glicolido (PLGA) en base a la adherencia y la proliferación de las células osteoprogenitoras derivadas del hueso trabecular, mostraron que PLGA fue el mejor sustrato para la inserción y la diferenciación osteogénica subsecuente de éstas células progenitoras. (Nampo, 2010)

#### 4.2.3 Tipos de células madre

Existen distintos tipos de células madre. Las **totipotenciales** son aquellas que en las condiciones apropiadas, forman un individuo completo, pues pueden producir tejido embrionario y extraembrionario. **Pluripotentes** son las células que tienen la habilidad

de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias. Una célula **multipotente** puede diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes pero no todos. (Bartold et al, 2006; Mao et al 2006)

Las células madre **multipotenciales** consisten en 3 grupos principales: *ectodérmico* (piel y nervios), *mesodérmico o mesenquimal* (hueso, cartílago y adiposo) y *endodérmico* (intestinos y otros).

Las 2 categorías principales de células madre son células madre embriológicas y del adulto definidas por su origen. (Nampo, 2010; Bartold et al, 2006; Mao et al 2006)

#### **4.2.3.1 Células Madre Embrionarias**

Se derivan de las células de las capas internas del blastocito durante el desarrollo embrionario, tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular y la habilidad de la autoreplicación. Su desventaja potencial es la capacidad de diferenciarse en cualquier linaje celular y proliferar sin control. Se obtiene sólo de embriones, por lo que trae problemas éticos. (Bartold et al, 2006)

#### **4.2.3.2 Células madre del adulto.**

Las fuentes de éstas células incluyen: cordón umbilical, fluido amniótico, médula ósea, tejido adiposo, cerebro y dientes. No se relacionan con problemas éticos, pueden ser autólogas y aisladas del paciente en tratamiento, mientras que las células embrionarias no tienen esa característica. (Bartold et al, 2006; Mao et al., 2006)

#### **4.2.2.2.1 Células madre pluripotenciales inducidas (iPS)**

Recientemente descubiertas, son células madre adultas o somáticas que se comportan como células madre embrionarias, tienen la capacidad de generar una larga cantidad de células madre. Como fuente autóloga, pueden utilizarse para regenerar tejidos específicos del paciente. Se debe investigar su potencial cancerígeno. (Bartold et al, 2006; Mao et al., 2006)

#### **4.2.2.2.2 Células madre derivadas del fluido amniótico**

Pueden ser aisladas de aspirados de la amniocentesis. Tienen una distinguida capacidad de proliferación y diferenciación a múltiples linajes, como condrocitos, adipocitos, osteoblastos, miocitos, células endoteliales, células parecidas a neuronales. Su potencial terapéutico no se ha indagado. (Bartold et al, 2006; Mao et al., 2006)

#### **4.2.3.2.3 Células madre del cordón umbilical**

Existe el creciente interés en su capacidad de autoreplicación y diferenciación multilínea, como a células del hígado, músculo esquelético, tejido neuronal, células pancreáticas, células del sistema inmune, tejido neuronal, pancreático, células mesenquimáticas. Su única desventaja es que sólo hay una oportunidad de recolectarlas y es al momento del nacimiento. (Bartold et al, 2006; Mao et al., 2006)

#### **4.2.3.2.4 Células madre de la médula ósea**

Consisten en células que generan todos los tipos de células sanguíneas y estromales (mesenquimales) que generan hueso, cartílago otros tejidos y grasa. Se pueden aislar por medio de aspirados o recolección de células madre periféricas luego de la estimulación química de la médula ósea por medio de inyección subcutánea. (Bartold et al, 2006; Mao et al., 2006)

#### 4.2.3.2.5 Células madre derivadas del tejido adiposo

Se aíslan de una lipectomía o liposucción. Se han diferenciado en condrocitos, miocitos, linajes osteoblásticos y neuronales. Proveen soporte hematopoyético. Todavía no han sido estudiadas completamente. (Bartold et al, 2006; Mao et al., 2006)

#### 4.2.3.2.6 Células madre dentales

Pueden obtenerse de distintas estructuras. Pueden extraerse de dientes permanentes o deciduos. Sus ventajas son la disponibilidad, la obtención fácil (Mao et al., 2006)

	Problemas éticos	Tiempo de recolección limitado	Opción autógena	Invasivo
<b>Células madre embrionarias</b>	Si	Si	No	Si
<b>Células madre del adulto</b>				
<i>iPS</i>	No	No	Si	Si
<i>Del fluido amniótico</i>	No	Si	Si	Si
<i>Del cordón umbilical</i>	No	Si	Si	Si
<i>Del la médula ósea</i>	No	No	Si	Si
<i>Del tejido adiposo</i>	No	No	Si	Si
<i>Del tejido dental</i>	No	No	Si	No

**Tabla 1.** Comparación de los sitios de extracción de las células madre.

Un nicho de células madre mesenquimales, se refiere a la localización exacta de nichos de células madre específicas, aunque para éste tipo celular todavía está indefinido, no es así con las células madre hematopoyéticas, pues ya se determinó su ubicación.

Se ha encontrado información limitada acerca de que la localización de las células madre mesenquimales se encuentran sobretodo en áreas perivasculares. (Huang et al.,2009)

Por medio de la ubicación de marcadores de superficie para el nicho de las células de la pulpa dental, esto es, con STRO-1, CD146 y antígeno asociado al pericito (3G5), se encontró que se distribuyen áreas perivasculares y cercanas a vainas neurales. Mientras que las células madre del ligamento periodontal se encontraron en regiones extra y paravasculares, utilizando los marcadores STRO-1,CD146 y CD144. (Huang et al.,2009)

Se han identificado 4 grupos principales de células madre en la cavidad bucal. (Nagatomo, et al 2006)

- Células madre en pulpas de dientes temporales (SHED CELLS).
- Células madre en pulpas de dientes permanentes (DPSCs).
- Células madre presentes en el ligamento periodontal (PDLSCs).
- Células madre de la mucosa bucal.

#### **4.2.4 Cualidades de las células madre que las hace una opción de tratamientos para su aplicación en el área dental**

Los pacientes acuden al dentista debido a infecciones, trauma, anormalidades genéticas o enfermedades como el cáncer orofacial o desórdenes de las glándulas salivares.

Las principales razones de la efectividad de las células madre son:

- A diferencia de las células con linaje único, las células madre pueden ser expandidas *ex vivo* (fuera del cuerpo). Por esto, un pequeño número de células puede ser suficiente para regenerar defectos grandes o tratar enfermedades.
- Las células madre pueden elaborar y organizar tejidos *in vivo*, especialmente en presencia de vasos sanguíneos.
- Éstas células pueden regular y controlar las reacciones del sistema inmune del huésped de manera que favorezca a la regeneración tisular.
- Las células madre pueden proveer una reserva renovable de células formadoras de tejido. (Mao et al., 2006)

#### **4.2.5 Células madre mesenquimales de la pulpa dental (CMMPD): Genotipo y fenotipo.**

Estudios que involucran la expansión o proliferación de las CMMPD han manifestado distintos puntos en común. En la investigación de Gronthos et al, se evaluó la presencia de células madre mesenquimáticas en la pulpa, comparando aquéllas provenientes de la médula ósea (CMMMO). Se encontró que ambas presentaban una morfología similar a la del fibroblasto (ahusada), incluso, formaron colonias celulares más rápido que las CMMO, de acuerdo con los resultados obtenidos luego de la colocación de Bromodeoxiuridina (BrdU). (Gronthos et al, 2000).

En lo que respecta a la presencia de marcadores en la superficie celular, CMMPD y CMMO mostraron una expresión similar para los siguientes marcadores.

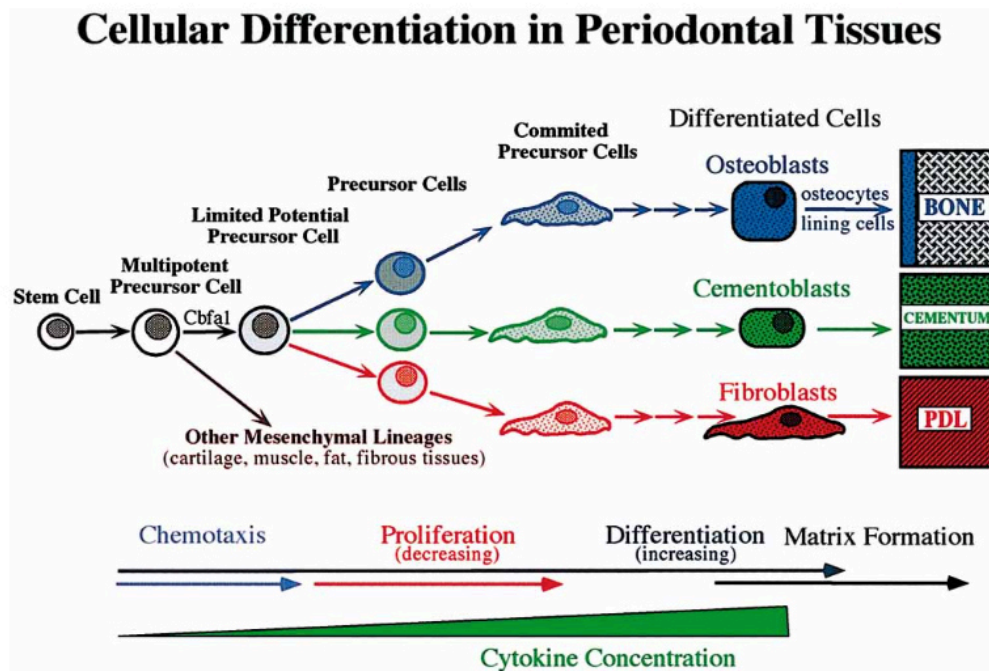
- Asociados al endotelio: ***Molécula 1 de Adhesión Celular Vascular, MUC-18***
- Músculo liso:  ***$\alpha$ -actina de músculo liso.***
- Hueso: ***fosfatasa alcalina, colágeno tipo I, osteonectina, osteopontina y osteocalcina.***
- Fibroblastos: ***colágeno tipo III y Factor Tipo 2 de Crecimiento de Fibroblasto.***



La proteína de matriz ósea, *la sialoproteína ósea*, estuvo ausente en los cultivos de CMMPD pero presente a bajos niveles de cultivos de CMMMO. (Gronthos et al, 2000).

### 4.3 Diferenciación osteoblástica de células provenientes de la pulpa dental.

Como se mencionó anteriormente, las células madre mesenquimales de origen dental son capaces de diferenciarse y regenerar diversos tejidos como cemento, fibras colágenas, tejido óseo, tejido cartilaginoso, neuronal y adiposo. Es posible por lo tanto, implantarlas en algún sitio que requiera la reconstitución de múltiples tejidos, como en el caso de los defectos periodontales intraóseos, en los cuales se carece principalmente de tejido óseo, ligamento periodontal y cemento dental. (Gronthos et al, 2000)



**Figura 1:** El proceso de diferenciación celular en tejidos periodontales. La expresión del gen *cbfa1* induce a la diferenciación de las células madre a distintos linajes: osteoblástico, cementoblástico y fibroblástico (ligamento periodontal)(Tomado de Sodek & McKee; 2000)

Las células madre participan en el proceso de formación de tejido óseo, pues son éstas quienes proliferan y se diferencian al linaje que origina a los osteoblastos. El proceso de la diferenciación celular está controlado por varias hormonas, citocinas y factores de crecimiento. La expresión del gen maestro osteogénico llamado “factor de unión central” o core binding factor 1 (cbfa1), es un evento importante que orienta a las células multipotentes a los linajes osteoblásticos, cementoblásticos y fibroblásticos. (Sodek & McKee; 2000)

El proceso de mineralización propiamente no está totalmente definido hasta la fecha, sin embargo, la expresión de proteínas en un tiempo determinado, junto con la morfología celular, nos da la oportunidad de suponer los eventos. Luego de asentarse en un cultivo celular para osteodiferenciación, las células madre comienzan a expresar colágeno tipo I, II y III, así como fosfatasa alcalina y osteopontina. Es importante enumerar que la expresión de la fosfatasa alcalina y del colágeno tipo I son características del linaje osteogénico. (Sodek y McKee, 2000)

La formación de un sustrato de colágeno parece desencadenar la diferenciación de células pre-osteoblásticas en osteoblastos por medio de interacciones con el receptor  $\alpha_2\beta_1$ . (Sodek y McKee, 2000)

El surgimiento de los osteoblastos está dado por la expresión subsecuente de sialoproteína ósea, la cual se correlaciona con el inicio de la mineralización *in vitro* e *in vivo*. A diferencia de la osteopontina, pues es variable su presencia. (Sodek y McKee, 2000)

La osteopontina generalmente disminuye antes de la diferenciación osteoblástica, y junto con la osteocalcina, se expresa a altos niveles luego de que la mineralización ha comenzado, manteniendo sus altos niveles hasta que los osteoblastos se convierten en osteocitos. (Sodek y McKee, 2000)

#### **4.3.1 El osteoblasto: morfología celular y funciones.**

Durante el desarrollo embrionario, el hueso intramembranoso del maxilar y la mandíbula se forman de osteoblastos que surgen del mesénquima que se condensa en la región facial. (Sodek y McKee, 2000)

Los osteoblastos son células mononucleares cuboidales (si están en su fase activa) o ligeramente elongadas, que revisten un gran porcentaje de superficies óseas y son responsables de la producción de la matriz orgánica del hueso, secretando colágeno y proteínas no colágenas. Algunos de éstas proteínas se acumulan inicialmente como una matriz no mineralizada, llamada *osteoides*, compuesta principalmente de colágeno que servirá como un andamio para la aposición de cristales de apatita. (Sodek y McKee, 2000; Nanci y Ten Cate, 2008)

Los osteoblastos se originan de células pluripotenciales, las cuales, son de origen mesenquimal, cuando se diferencian completamente y secretan la matriz ósea de manera activa, se consideran células post-mitóticas que contienen un citoplasma rico en organelos para síntesis y secreción, como el retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, gránulos secretores y microtúbulos. También contienen otros organelos asociados con el metabolismo celular como mitocondrias, elementos lisosomales o endosomales y un extenso citoesqueleto. (Sodek y McKee, 2000)

Tanto los preosteoblastos como los osteoblastos, exhiben altos niveles de fosfatasa alcalina en su superficie celular. Se cree que ésta enzima permite una adhesión a los enlaces del fosfato, el cual, ya liberado, contribuye al inicio y crecimiento progresivo de cristales del hueso mineral. Sin embargo, la función de la fosfatasa alcalina no está definida completamente. (Nanci y Ten Cate, 2008)

Los osteoblastos forman una capa celular sobre la superficie ósea en formación y se ha propuesto que actúan como una barrera que controla el flujo de iones dentro y fuera del hueso. Cuando ya no se produce el tejido óseo, los osteoblastos se aplanan, se extienden a lo largo de la superficie ósea y reciben el nombre de *células de*

**recubrimiento óseo**, las cuales, contienen pocos organelos sintéticos. (Nanci y Ten Cate, 2008)

A medida que los osteoblastos forman el tejido óseo, algunos se quedan atrapados en la matriz que se secreta, ya sea mineralizada o no mineralizada, éstas células ahora se denominan **osteocitos**. Entre más rápida sea la formación de hueso, más osteocitos estarán presentes por volumen de unidad, son ejemplos el hueso entretejido (embrionario) y el de reparación. (Nanci y Ten Cate, 2008)

#### **4.3.2. El proceso de osteodiferenciación *in vitro***

Al tener un cultivo proliferado de CMMPD, es posible colocarlas en medios que las inducen a expresar fenotipos y genotipos propios de células que se derivan de la misma capa embrionaria, esto es, células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas, miogénicas, entre otras.

Cuando se emplea un medio para osteodiferenciación, es posible observar 3 etapas del desarrollo de un osteoblasto: **proliferación activa, maduración de la matriz y mineralización**. (Owen et al, 1990)

Además, se ha encontrado evidencia de que ocurren dos transiciones durante las etapas del desarrollo de los osteoblastos *in vitro*. La primera transición sucede al inhibirse el periodo de proliferación y la segunda, al registrarse altos niveles en la expresión de genes correspondientes a la osteocalcina y osteopontina, al comienzo de la mineralización. (Owen et al, 1990)

La formación de fibrillas de colágeno en el hueso se inicia cuando los filamentos de colágeno, que son liberados por los osteoblastos, se distribuyen extracelularmente para

formar el osteoide, un término que se le da a la matriz ósea no mineralizada que está cerca del osteoblasto. Esto se realiza gracias a vesículas provenientes del Aparato de Golgi. Las proteínas no colágenas se liberan hacia la superficie externa del osteoblasto, donde participan en la regulación de la aposición mineral. (Nanci y Ten Cate, 2008)

A medida que la mineralización progresa, es posible observar nódulos minerales así como proteínas no colágenas como osteopontina y sialoproteína ósea, que se acumulan entre los nódulos. (Sodek y McKee, 2000, Nanci y Ten Cate, 2008)

Además de secretar a las proteínas de la matriz, los osteoblastos o sus precursores, secretan citocinas y factores de crecimiento que ayudan a regular la función celular y la formación ósea, como las proteínas morfogenética ósea (BMP-2, BMP-7) y el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PGF) y el factor de crecimiento derivado del fibroblasto (FGF). (Nanci y Ten Cate, 2008)

#### **4.3.2.1. La expresión de proteínas óseas durante la osteodiferenciación *in vitro*.**

Los procesos que se observan durante la osteodiferenciación tienen un orden específico que resulta en la creación de las condiciones necesarias para que suceda la mineralización de la matriz ósea.

##### **4.3.2.1.1 Fase proliferativa**

La fase proliferativa, que es la primera, tiene como objetivo la producción de una matriz de colágeno que contribuye a la madurez del fenotipo del osteoblasto, del día 1 al 7. (Owen et al, 1990)

**Runx2** es un factor de transcripción esencial para la diferenciación osteoblástica de los precursores mesenquimáticos y la transferencia de éste a células mesenquimáticas multipotenciales provoca la inducción de fosfatasa alcalina. Así mismo, el ácido ascórbico, incrementa la expresión de fosfatasa alcalina, osteocalcina y Runx2. (Mimori et al, 2007)

**IGF-1** y **IGF-2** se expresan en los osteoblastos y facilitan su crecimiento, diferenciación y función, regulando primero la síntesis de **colágeno tipo I** y luego incrementando la expresión de **fosfatasa alcalina** al nivel de mRNA y optimizando la actividad de ésta. (Nagata et al, 2008; Owen et al, 1990)

Se cree que la **fosfatasa alcalina** permite una adhesión a los enlaces del fosfato, el cual, ya liberado, contribuye al inicio y crecimiento progresivo de cristales del hueso mineral. Sin embargo, su función no está definida completamente. (Nagata et al, 2008)

La **osteopontina** se expresa, en un 25% de sus niveles máximos, al inicio, durante el periodo de proliferación activa (días 5 a 7); y posteriormente, en el periodo de mineralización (días 16 a 20). La doble expresión de la **osteopontina**, primero, durante la fase proliferativa, está relacionada con la estimulación de los fibroblastos que se encontraban previamente inactivos. (Owen et al, 1990)

#### **4.3.2.1.2 Fase de maduración de la matriz ósea**

Luego, en el día 7 al 10, ocurre la primera transición o cambio en el medio de osteodiferenciación: la inhibición de la proliferación celular, seguida por un aumento en la expresión de la fosfatasa alcalina en los días 12 a 18. Estos eventos corresponden a la fase de la **maduración de la matriz ósea**. A medida que continúa la fase de mineralización, los niveles de fosfatasa alcalina disminuyen. (Owen et al, 1990)

Se piensa que la *fosfatasa alcalina* llega a su actividad máxima al inicio de la mineralización debido al incremento de las concentraciones locales de ácido fosfórico y la eliminación de inhibidores de la calcificación. Investigaciones han sugerido que el incremento de la fosfatasa alcalina puede estar relacionada con la preparación de la matriz extracelular para la deposición de mineral, así como la coexpresión de *osteocalcina* y *osteopontina* impulsan el comienzo y progresión de la mineralización de la matriz ósea. (Owen et al, 1990; Nagata et al, 2008)

La *osteonectina*, también llamada Proteína Ácida Secretada y Rica en Cisteína (SPARC, en inglés) o proteína 40 de membrana de base (BM-40, en inglés), está normalmente unida a la hidroxiapatita. Se ha caracterizado por ser una proteína que modula las interacciones celulares con la matriz extracelular. (Sodek y McKee, 2000)

#### **4.3.2.1.3 Fase de mineralización propiamente dicha**

La alta expresión de la *osteocalcina* se registra en los días 16 a 20 coincidiendo con el acúmulo de tejido mineral en los cultivos, esto es, la mineralización. A menudo, se utiliza como marcador de tejido óseo debido a que es una proteína que se sintetiza por los osteoblastos, se une a la Hidroxiapatita, se incorpora a la matriz calcificada y se secreta cuando se forma la matriz ósea. Ésta también se confirma mediante análisis de inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-osteocalcina. (Nagata et al, 2008)

En el estudio de Nagata, se detectó una expresión aumentada de *BMP-2* y osteocalcina al nivel de m-RNA, lo que sugiere la posibilidad de que la elevación de BMP-2 endógena estimula la inducción de la expresión de osteocalcina en fibroblastos del ligamento periodontal. (Nagata et al, 2008)

La expresión de la *osteopontina* durante la fase de mineralización está relacionada con sus propiedades físicas, pues es una glicoproteína ácida de 60kDa de peso molecular que contiene o-fosfoserina, es decir, contiene varios sitios de unión para el calcio, los cuáles son importantes para la proliferación celular así como para la mineralización de la matriz extracelular ósea. (Owen et al, 1990)

#### **4.3.2.1.3.1 Formación de nódulos minerales.**

Debemos recordar que el tejido óseo maduro consta de componentes celulares y de la matriz ósea. Entre los componentes celulares es posible enumerar a los osteoblastos, osteocitos, células de recubrimiento óseo y osteoclastos. La matriz ósea orgánica está integrada por colágeno, proteínas no colágenas, y la parte inorgánica se compone de minerales como la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6 [\text{OH}]_2$ ) (Sodek y McKee, 2000)

El surgimiento de los osteoblastos está indicado por la expresión inducida de la *sialoproteína ósea*, la cual se correlaciona con el inicio de la mineralización *in vitro* e *in vivo*. Ésta proteína está estrictamente ligada con los tejidos minerales. (Sodek y McKee, 2000)

Al transcurrir la tercera semana de inducción celular, es posible detectar nódulos calcificados, por medio de tinciones como la solución S de Rojo Alizarina y la tinción de von Kossa. (Sodek y McKee, 2000).

El Rojo Alizarina contiene 1,2 dihidroxiantraquinona el cual es un compuesto orgánico de fórmula  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_4$ , se obtiene de las raíces de las plantas de rubia. Es utilizado en ensayos bioquímicos para determinar en forma cuantitativa mediante colorimetría, la presencia de depósitos de calcio en las células de una línea osteogénica. Por lo tanto, es un marcador de las primeras etapas (días 10-16 de un cultivo *in vitro*) de la mineralización de matriz, un paso importante en la formación de matriz extracelular calcificada asociada con un hueso real. (Paul et al, 1983; Sodek y McKee, 2000)



Al observar la tinción Rojo Alizarina, se aprecia un pigmento que va desde un tono rosa a rojo, que actúa sobre cualquier carbonato que reaccione con el ácido disuelto. Por lo tanto, entre más reactivo sea el mineral más intenso se volverá el rojo. Esto se da principalmente cuando se tiñen los minerales del tipo como la calcita, el cual es una forma de carbonato de calcio, (Paul et al, 1983; Sodek y McKee, 2000)

El nitrato de plata forma fosfato de plata insoluble en presencia de iones fosfato, éste método se conoce como *tinción de Von Kossa*. Cuando se somete a un agente reductor, por lo general, hidroquinona, se forma plata elemental de color negro. Éste método se utiliza para el estudio de la formación de partículas de fosfato de calcio durante el crecimiento óseo. (Hempelmann et al., 1984)

En la investigación de Seo y colaboradores, al comparar la formación de nódulos minerales de células madre provenientes de la médula ósea, pulpa dental y ligamento periodontal, encontró que las CMMLP formaron menos nódulos mineralizados comparados con las CMMPD, lo que se correlacionaba con unas concentraciones bajas de calcio en la matriz extracelular. (Seo et al, 2004)

### **4.3.3 Medios de cultivo para diferenciación osteoblástica**

#### **4.3.3.1 Medio tradicional para diferenciación osteoblástica.**

Experimentos sobre diferenciación osteoblástica tienen en común la utilización de un medio de cultivo en el que se agregan sustancias, las cuales, estimularán la diferenciación celular osteoblastos, entre ellas:

- 2-Fosfato-L-ascorbato (vitamina C)
- Dexametasona, un glucocorticoide.
- Fosfato inorgánico.
- Medio basal
- Atmósfera humidificada a 37° C .

- 5% de CO<sub>2</sub>. (Gronthos et al, 2000; Zhou et al, 2008; Isaka, et al. 2001; Kadar et al, 2009)

Como se mencionó anteriormente, la **dexametasona** es un esteroide sintético, el cual se ha visto que promueve la diferenciación osteogénica tanto de células madre adultas como embrionarias. Se cree que es un regulador crucial de la diferenciación osteogénica para las células madre de la médula ósea. Sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción. Ésta estimula diferenciación osteoblástica, la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización ósea. (Kadar et al, 2009)

Generalmente se utiliza la dexametasona en combinación con **L-ácido ascórbico (vitamina C) y  $\beta$ -glicerolfosfato**. Éste último es un donador de fosfato necesario para constituir la fase de mineralización ósea. El ácido ascórbico se requiere como un cofactor para la prolil-4-hidrolasa, una enzima que hidroxila a la prolina, una reacción importante para la síntesis de colágeno, componente principal de las matrices mesenquimales mineralizantes. Además, se ha comprobado que también promueve la proliferación y expresión de la fosfatasa alcalina y la actividad de células osteoblásticas. (Kadar et al, 2009)

Un mecanismo de acción del ácido ascórbico, recientemente descubierto, sugiere que el incremento de la secreción del colágeno tipo II y X en presencia de vitamina C, resultó en un incremento de las interacciones con annexina V, estimulación del influjo de Calcio mediado por annexina V y como consecuencia, el incremento de fosfatasa alcalina, lo que lleva a un aumento en la mineralización. (Kadar et al, 2009)

Regularmente, se indica el cambio del medio de cultivo 2 veces a la semana por 3 semanas. Luego, se observa la morfología de las células, las cuáles, de tener un aspecto ahusado, parecido al fibroblasto, luego de 3 semanas, adquieren una forma cuboidea, su orientación ya no es tan regular como previamente se observaba en las células madre mesenquimales, lo cual es una característica propia de un osteoblasto, que comprueba su

diferenciación. Esto se observa por medio de un microscopio invertido o de campo claro. (Nagata et al 2008)

#### **4.3.3.2 Medio de osteodiferenciación de patente: Osteodiff.**

Osteodiff es un producto comercial que promueve la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales. En su hoja técnica, el fabricante enumera los siguientes componentes:

- L-glutamina.
- Suero fetal bovino.
- Rojo fenol
- Sin antibióticos.

Éste medio de osteodiferenciación de patente, debe ser almacenado en un lugar donde se encuentre protegido de la luz, a -20° C. Es empleado para la diferenciación de células mesenquimales, o en estudios in vitro que involucren la diferenciación de células madre mesenquimales a osteoblastos, incluyendo la expresión de genes o perfiles protéicos.

En el estudio de Rodríguez-Lozano donde se compararon 3 medios de osteodiferenciación, el Osteodiff mostró altos niveles de concentración de la tinción para identificar nódulos minerales, esto es, una alta concentración de Rojo Alizarina, confirmando que éste medio es el más osteoinductivo. Los otros dos medios consistían en: un preparado tradicional para osteodiferenciación con dexametasona y otro medio con FBS al 20%, el cual, aunque se ha comprobado que contiene factores de crecimiento, no es tan específico como la dexametasona para la osteodiferenciación de CMMPD (Rodríguez-Lozano et al, 2012)

## **5. MÉTODOS**

### **5.1 Diseño del estudio**

Es un estudio comparativo, abierto, experimental, prospectivo y transversal

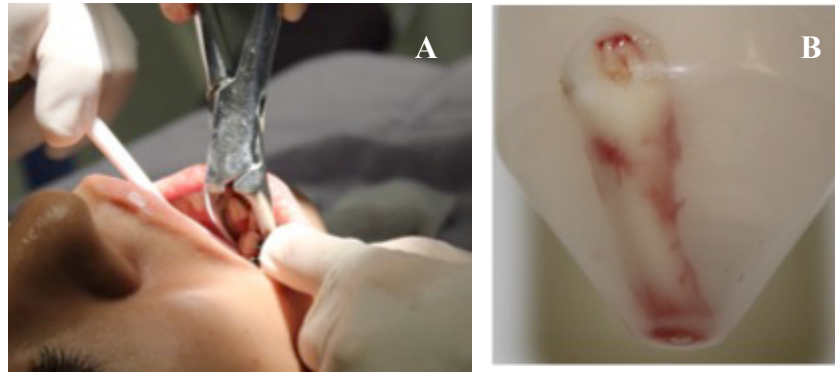
### **5.2 Descripción de procedimientos**

#### **5.2.1 Obtención del tejido.**

De acuerdo con el tratamiento planeado en el posgrado de Ortodoncia de la facultad de Odontología de la UANL, se realizó la valoración de los pacientes candidatos a la extracción de los primeros premolares. Una semana antes del procedimiento, se les realizó un detartraje, fisioterapia, se les indicó un enjuague con digluconato de clorhexidina al 0.12% después del cepillado durante 1 minuto cada 8 horas.

Antes de comenzar la extracción, el paciente realizó un enjuague con Digluconato de Clorhexidina al 0.12%, se instrumentó la pieza para eliminar cualquier residuo de placa o cálculo dental y posteriormente se desinfectó con una gasa impregnada con Clorhexidina al 0.12%.

Durante la extracción, se procuró aislar la pieza dental del resto utilizando una gasa estéril para disminuir el contacto con la saliva. Una vez extraído el premolar, se lavó con una jeringa y suero fisiológico estéril para remover coágulos de sangre y restos de tejido gingival. Posteriormente, se colocó en un tubo de 50 ml que contenía una solución de transporte: DMEM, suero fetal bovino, 250µg/ml de gentamicina, 5µ/ml de anfotericina B y penicilina con estreptomina al 1%. (Figura 1 A y B)



**Figura 2.** Extracción y transporte de la muestra **A.** Extracción de premolar por indicación ortodóntica. **B.** Premolar inmerso en su solución de transporte: DMEM, suero fetal bovino, 250 $\mu$ g/ml de gentamicina, 5 $\mu$ /ml de anfotericina B y penicilina con estreptomicina al 1%.

### 5.2.2 Obtención de las células madre mesenquimales de la pulpa dental.

Las piezas dentales fueron trasladadas al CIDICS, a la Unidad de Odontología Integral y especialidades, donde se realizó el procedimiento para obtener las Células Madre Mesenquimales de la Pulpa Dental (CMMPD).

Se inició con el corte a nivel de la unión cemento-esmalte con un disco dentado de carburo para motor de baja velocidad (Figura 2A). Se obtuvo la pulpa dental por medio de limas de endodoncia.

Luego de recolectar la pulpa, se procedió a la disgregación del tejido obtenido. Primero, se determinó el peso aproximado de éste. Se colocaron 4.75 ml de PBS dentro de un tubo C GentleMACS, se insertó en el disgregador asegurándose que la muestra haga contacto con las aspas del tubo. (Figura 2B) Seleccionar el programa A o B (los cuáles son los indicados por el fabricante para disgregar tejidos de la consistencia de la pulpa dental). Una vez finalizado el programa, se colocó el tejido en una solución para digestión enzimática. Dicha solución contenía colagenasa tipo I, 3 mg/ml y dispasa, 4mg/ml. (Se dejó incubar por una hora a 37° C en baño de agua). Al finalizar la incubación, seleccionar el programa B o C en el disgregador.

Una vez concluido lo anterior, se observó al microscopio para comprobar la disgregación de tejido. Posteriormente, las células mesenquimales se separan del resto. Finalmente, la fracción positiva resultante, (células mesenquimales de la pulpa dental), se colocó en sulfóxido de dimetil a 10% a lento enfriamiento para ser almacenada a  $-80^{\circ}$  C. (Hunt, 2011)



**Figura 3.** Obtención y disgregación del tejido pulpar. **A.** Corte a nivel de la unión cemento-esmalte con un disco dentado de carburo e irrigación con suero fisiológico estéril. **B.** Disgregador (GentleMACS Dissociator)

### **5.2.2.1. Descongelamiento, sembrado y proliferación.**

Se descongeló la muestra calentándola en agua a 37° C hasta que los cristales de hielo desaparecieron. (Hunt, 2011)

#### **5.2.2.1.1 Protocolo de descongelamiento de células mesenquimales de la pulpa dental.**

1. Retirar los crioviales del Ultra-Congelador de -85° y descongélalos parcialmente agitando en baño de agua a 37°C
2. Durante exactamente 2 minutos. No deben descongelarse por completo a temperatura ambiente. Una vez que se hayan descongelado parcialmente deberán colocarse en hielo.
3. Añadir 5mL de medio de cultivo en un tubo Corning de 50mL.
4. Permitir que el criovial con las células se termine de descongelar por completo bajo hielo e inmediatamente decantar el contenido del criovial al tubo de 50mL.
5. Enjuagar el criovial cuantas veces sea necesario con medio de cultivo y pasar el contenido al tubo de 50mL con el objeto de recuperar la mayor parte de las células criopreservadas.
6. Centrifugar el tubo de 50mL a 1200 RPM por 10 minutos.
7. Desechar el sobrenadante por decantación directa a un frasco de descontaminación con NaOCl al 0.5%.
8. Resuspender las células en 5mL de medio de cultivo
9. Pasar a frasco T25 para su activación.

Se procedió a colocar dichas células en un frasco de 25cm<sup>2</sup> (Figura 3), con medio estándar (CO<sub>2</sub> a 5%, en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina L al 1% y penicilina con estreptomycin al 1%) hasta que se alcanzó la confluencia, esto es, la proliferación o llenado total del frasco.

Previo a alcanzar la confluencia, se cambió el medio cada tercer día hasta llegar al día 10 de cultivo celular. El cambio de medio se realizó aspirando el sobrenadante, es decir, el medio de cultivo, con una micropipeta de 1000 µL; y lavando 3 veces con PBS la

monocapa (la base del frasco), posteriormente, se colocaron 5000  $\mu\text{L}$  del medio estándar y se colocaba nuevamente en la incubadora de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ \text{C}$ .



*Figura 4. Frasco para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (Corning®)*

### **5.2.2.3 Inducción osteogénica.**

Al presentar confluencia, (día 10 de cultivo en medio estándar), se procede a la inducción osteogénica, esto se realizó aspirando el sobrenadante, y lavando las células con PBS estéril. Se continuó con la tripsinización de la monocapa, lo que consistió en despegar las células adheridas a la base del frasco por medio de la enzima tripsina.

#### **5.2.2.3.1 Protocolo de Tripsinización.**

1. Retirar el medio de cultivo del frasco a procesar.
2. Lavar la monocapa de células con PBS 1X (3 veces) tomando cuidado de adicionar el buffer en una pared del frasco, para posteriormente contactar la monocapa celular.
3. Agregar 1 mL de Tripsina/EDTA 0.25% sobre la monocapa de células e incubar durante 10 minutos en Cámara de  $\text{CO}_2$ .
4. Pasado el tiempo observar al microscopio las células despegadas en suspensión (morfología redondeada).
5. Agregar medio de cultivo para inactivar el proceso de Tripsinización



6. El volumen del medio de cultivo se determinara de acuerdo a la confluencia celular y dimensiones del frasco o frascos a los que serán pasadas y sembradas las células, o, en su defecto si serán criopreservadas.
7. Pipetear el volumen del medio con las células en suspensión, para mezclar homogéneamente.
8. Retirar 10 ml de la suspensión celular para contabilizar en Cámara de Neubauer.
9. Una vez determinado el número de células, sembrar o criopreservar.

#### 5.2.2.3.2 Conteo celular por medio de la cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer, también conocida como hemocitómetro, consta de un cubreobjetos de cuarzo y un portaobjetos de un grosor mayor a los de uso común (Figura 4). En la parte superior del portaobjetos se encuentran cuatro canales longitudinales y uno transversal central. En la parte superior e inferior del canal transversal están grabadas dos rejillas de  $9 \text{ mm}^2$  de superficie, las cuales están a su vez subdivididas en una cuadrícula más pequeña.

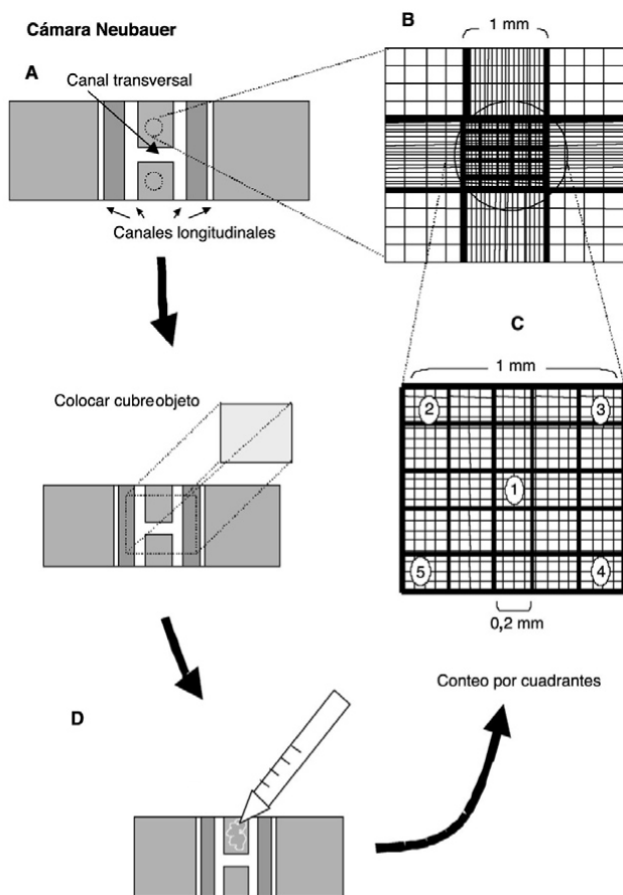


**Figura 5.** Cámara de Neubauer o Hemocitómetro.

Se requiere un microscopio óptico con un objetivo de 10x, se enfoca el cuadro central de  $1 \text{ mm}^2$ , que se encuentra subdividida en 25 cuadrados. Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0.1 mm de forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes será  $0.1 \text{ mm}^3$  ( $1,0 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3$ ).

1. Limpiar con algodón y alcohol o papel de arroz la cámara de Neubauer.
2. Colocar el cubreobjetos sobre los canales.
3. Agitar manualmente el tubo con la dilución celular necesaria.

4. Con una pipeta automática de 100 $\mu$ L, tomar 0.1mL de la suspensión celular y coloque la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos; deje que la solución ingrese a la cámara por capilaridad, sin que pase a los canales laterales.
  5. Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10x.
  6. Localizar el cuadro central de la rejilla (ubicando la cuadrícula de 25 cuadros), hacer un cambio de lente al objetivo de 40x y contar las células que se encuentran sobre el mismo.
  7. Contar el número de células en el cuadro central evitando contar dos veces la misma célula u omitir alguna.
  8. Se recomienda tener un conteo entre doscientas y trescientas células por muestra.
  9. Si el número de células es muy elevado, se recomienda diluir la suspensión en una proporción conocida, que deberá ser tenida en cuenta en la estimación final.
- (Figura 5 A-D).



**Figura 6.** Esquema que muestra los componentes de una Cámara de Neubauer. **A.** Se observan los 4 canales longitudinales y el canal transversal central (flechas). **B.** Vista a mayor aumento de la rejilla superior, donde se observa una cuadrícula de 9mm<sup>2</sup> de superficie. **C.** Enfoque a mayor aumento de la superficie de la cuadrícula central, en donde se observan números que corresponden a la secuencia sugerida para el conteo celular. **D.** Se observa una pipeta colocando la solución en la rejilla superior para

Terminada la tripsinización, se realizó un conteo de las células obtenidas, por medio de la Cámara de Neubauer, se determinó que en cada pozo debían sembrarse 10,000 células colocando 31.2 $\mu$ L de las células tripsinizadas, utilizando 3 placas de 24 pozos. En dichas placas se destinó la primera fila para las CMMPD sembradas en un medio estándar. En la segunda fila, se utilizó con un medio tradicional de osteodiferenciación (DMEM con 10% de SFB, 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico, 10mM de  $\beta$ -glicerolfosfato, 10<sup>-5</sup>M de dexametasona). En la tercera fila, se empleó un medio de osteodiferenciación comercial llamado StemMACS OsteoDiff Media (Miltenyi Biotec). En la última fila, se dejaron pozos con medio estándar, tradicional de osteodiferenciación y OsteoDiff para ser observados mediante técnicas de autofluorescencia con eosina como contraste.

Los cambios de medio se realizaron cada 3 días. Los sobrenadantes se aspiraron y se guardaron esta vez en tubos de 15ml.

#### **5.6.2.4 Tinciones**

Las 3 placas de 24 pozos fueron destinadas para observar, por medio de la tinción Rojo Alizarina y autofluorescencia, la presencia de nódulos de calcio a los 6, 12 y 18 días de osteodiferenciación. Así, la **placa 1** correspondía al día 6; la **placa 2** al día 12 y la **placa 3**, al día 18.

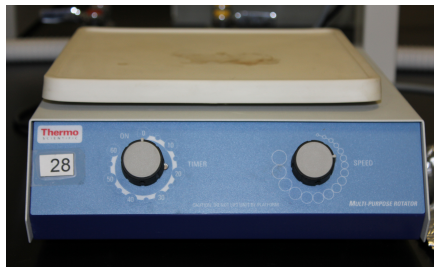
##### **5.2.2.4.1. Protocolo de tinción con Alizarina Roja.**

Al llegar al día 6, se lavó y cambió el medio de las placas 2 y 3, recolectando el sobrenadante de éstas, se realizó esto a los días 12 y 18 días.

El procedimiento para la tinción con Alizarina Roja es el siguiente:

1. Para preparar la solución de tinción, se disolvieron 2gr de Alizarina Roja en 100ml de agua destilada, se mezcló y ajustó el pH a 4.1-4.3 con HCl o NH<sub>4</sub>OH.

2. Se sacó el cultivo de la incubadora y con cuidado se aspiró el medio con PBS sin tocar la monocapa.
3. Se aspiró el PBS y se colocó formalina al 10% hasta cubrir la monocapa celular. Luego de 30 minutos, se aspiraron las células y se lavaron con agua destilada.
4. Se aspiró con cuidado el agua destilada y se colocó la suficiente Alizarina Roja como para cubrir la monocapa celular. Se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 45 minutos colocándose en el agitador a velocidad lenta. (Figura 6)
5. Transcurrido dicho tiempo, se aspiró la tinción de Alizarina Roja y se lavó la monocapa celular 4 veces con agua destilada. Con cuidado se aspiró el agua destilada y se colocó PBS.
6. Se observaron las células en el microscopio.



*Figura 7. Agitador donde se colocó la placa de 24 pozos, durante la tinción de Rojo Alizarina.*

#### **5.2.2.4.2 Protocolo de tinción con autofluorescencia.**

Luego de realizar la tinción con Rojo Alizarina, se tiñeron algunos pozos con DAPI y eosina, para ser observados en el microscopio de luz ultravioleta. Los mismos procedimientos se realizaron a los días 12 y 18 de osteodiferenciación.

1. Se aspiró el PBS y se colocó formalina al 10% hasta cubrir la monocapa celular. Luego de 30 minutos, se aspiraron las células y se lavaron con agua destilada.

2. Se aspiró con cuidado el agua destilada y se colocó la suficiente Eosina como para cubrir la monocapa celular (300  $\mu$ L), por 30 minutos.
3. Transcurrido dicho tiempo, se aspiró la Eosina y se lavó la monocapa celular 4 veces con agua destilada. Con cuidado se aspiró el agua destilada y se colocó PBS.
4. Se diluyó la solución DAPI en 300 nM con PBS. Se agregó aproximadamente 300  $\mu$ L de esa solución diluida con DAPI asegurándose de que las células queden cubiertas completamente.
5. Incubar por 1 a 5 minutos.
6. Lavar de 3 a 4 veces con PBS. Aspirar el exceso de la solución y observar en el microscopio invertido de fluorescencia (Figura 7).



*Figura 8. Invertoscopio con fluorescencia (Zeiss)*

#### **5.2.2.5 Cuantificación de proteínas con el método de Bradford y electroforesis**

La concentración de proteína de los sobrenadantes fue cuantificado por medio del método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando Albumina de suero bovino como estándar. Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, con el sistema de buffer propuesto por Laemmli (1970).

Se determinó el peso molecular de las proteínas expresadas, calculando la distancia de migración, mediante una gráfica semilogarítmica.

#### **5.2.2.5.1 Protocolo de electroforesis.**

1. Realizar mezcla en tubos pequeños en un volumen de 20-30  $\mu$ L
2. Perforar tapas para liberar la presión
3. Preparar el baño maría 96°C (agua hirviendo, depende de la altitud)
4. Colocar las muestras por 5 min
5. Centrifugar a 10,000 rpm
6. Colocar el gel en la cámara e inundar con el buffer de corrida (quitar burbujas de los pozos)
7. Con el gel inundado, cargar el gel con las muestras
8. Cargar marcador de peso molecular
9. Se programa la fuente de poder a 40mA/gel (debe mantenerse constante), y 200V (variante).

Posteriormente, se tiñe el gel con nitrato de plata, para observar la migración protéica.

#### **5.2.2.5.2 Protocolo de tinción de nitrato de plata.**

1. Lavar el gel con agua bidestilada (5 min en agitación)
2. Fijar el gel con solución de Fijación (5 min en agitación)
3. Lavar el gel con agua bidestilada (5 min en agitación)
4. Colocar el gel de acrilamida en Tiosulfato (solución de trabajo) durante 1 min
5. Lavar con agua milli Q. (3 veces 20 segundos cada lavado)
6. Incubar en solución de Nitrato de plata durante 10 min (cubrir con aluminio y mantener en agitación)
7. Lavar nuevamente como en paso 5
8. Colocar Solución Reveladora (Observar aparición de bandas)
9. Lavar con H<sub>2</sub>O
10. Colocar solución de Fijación (10-20 min)

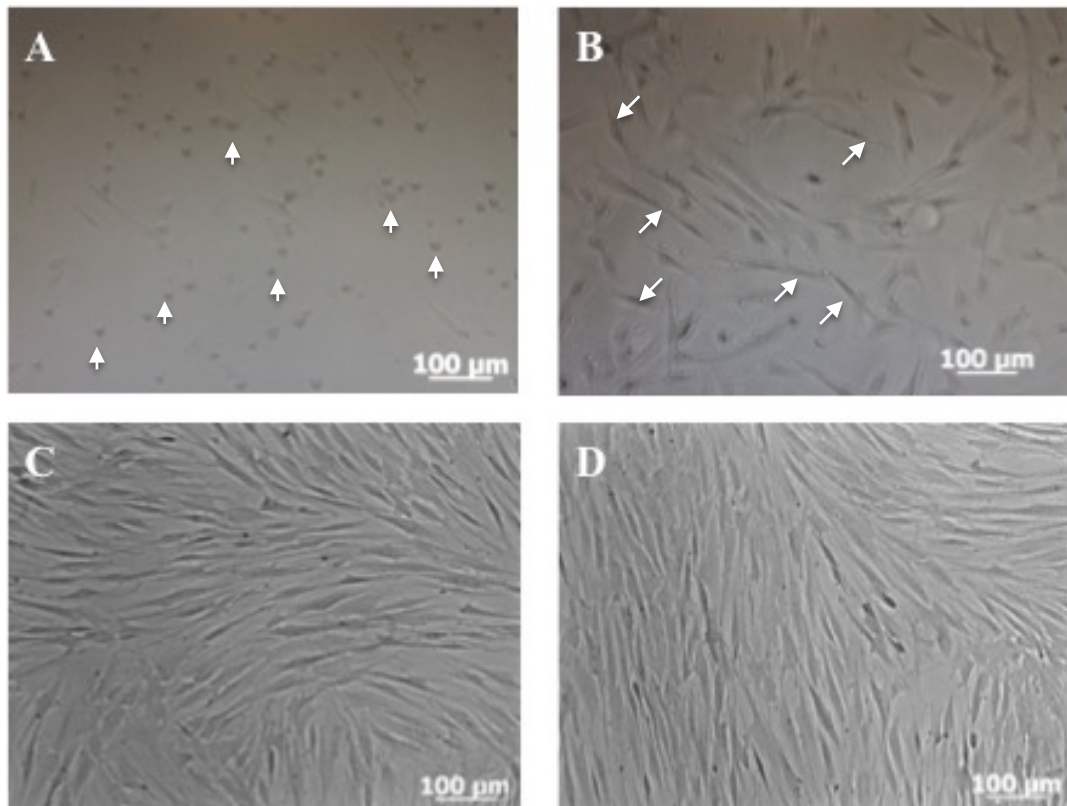
### **5.2.2.5.3 Protocolo de fijación de gel de acrilamida.**

1. Incubar en Metanol durante 1hr en agitación.
2. Lavar con H<sub>2</sub>O durante 1hr en agitación.
3. Incubar en Metanol durante 30 min en agitación.
4. Lavar con H<sub>2</sub>O durante 1hr en agitación.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Proliferación

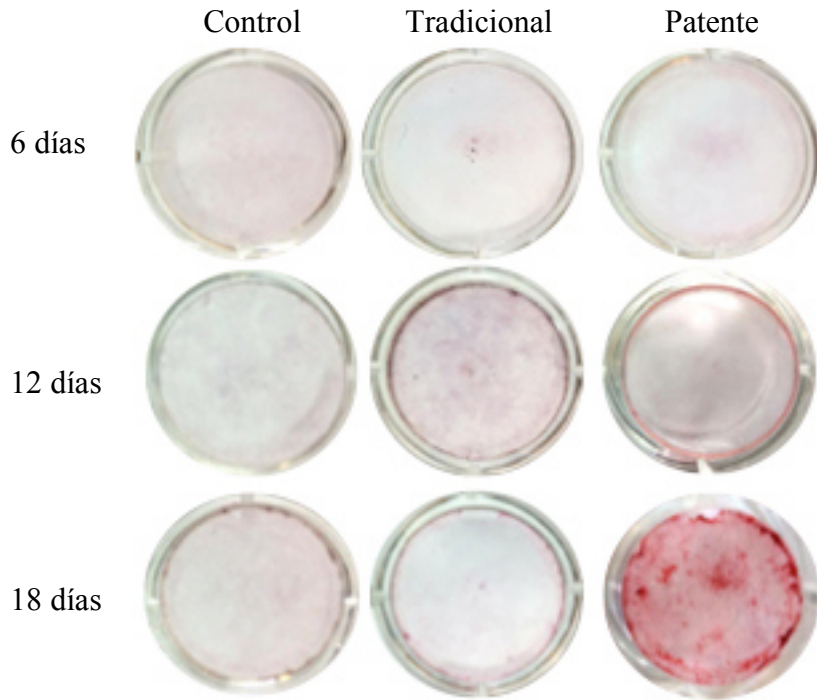
Inmediatamente después de descongelar la muestra y sembrarla, la morfología celular de las CMMPD era esferoidal y no estaban asentadas en la monocapa. A los 3 días se observaron células alargadas y fusiformes, asentadas en el fondo del frasco, adheridas a la monocapa y formando colonias. Al cuarto día éstas colonias ya no se discernían una de otra pues se alcanzó la confluencia celular, por lo que se procedió a tripsinizar el frasco y se hizo un conteo en la cámara de Neubauer para determinar la cantidad de células que se colocarían en cada uno de los 24 pozos de las placas de cultivo celular con el medio de osteodiferenciación. (Figura 8 A-D)



**Figura 9.** Fotomicrografía en microscopio invertido, 10x. **A.** CMMPD al momento del sembrado. Nótese la morfología celular esferoidal **B.** CMMPD a los 3 días de incubación. Se observa un cambio morfológico característico de las células mesenquimales: citoplasma ahusado y núcleo céntrico (flechas blancas) **C y D.** CMMPD al 4° día de incubación. Se observa una mayor confluencia celular.

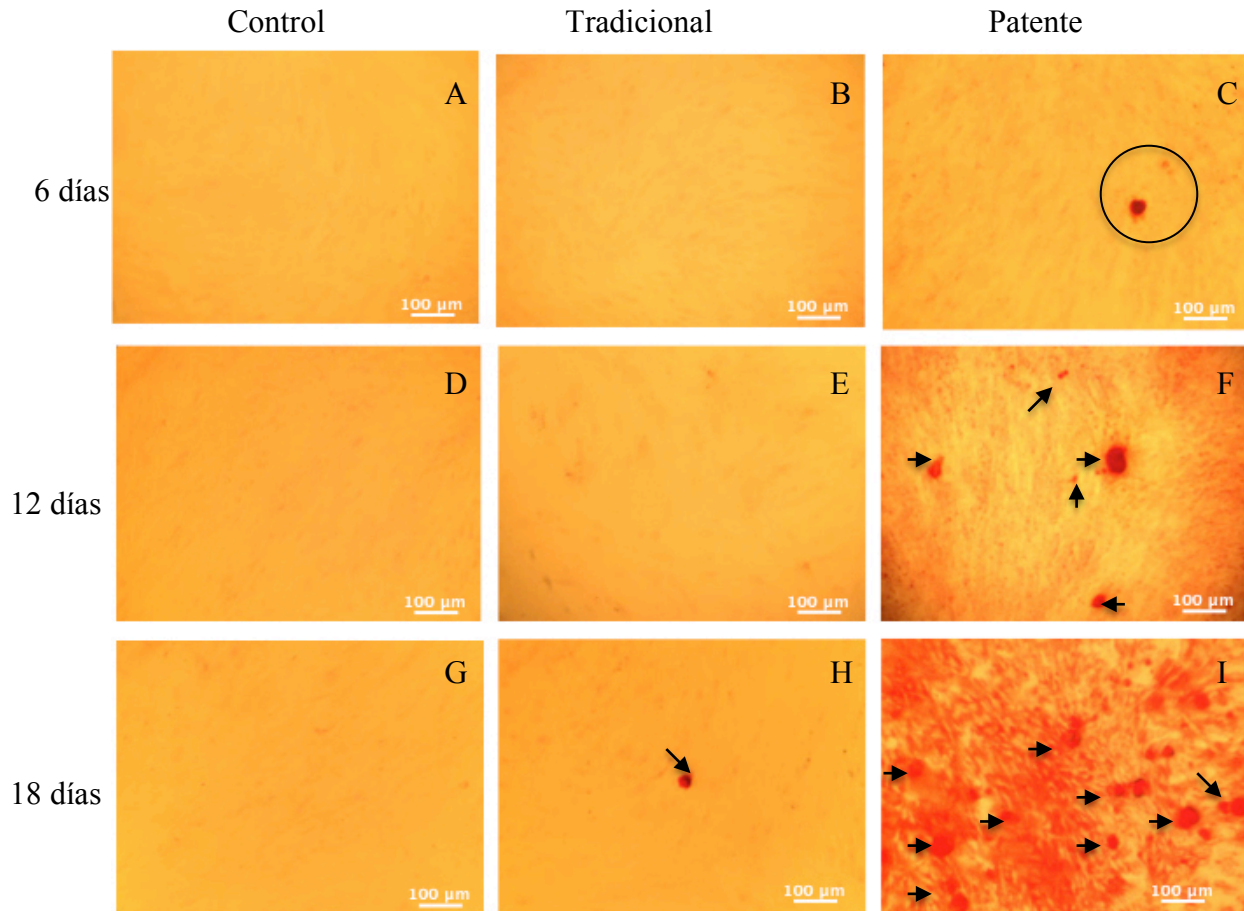


## 6.2 Osteodiferenciación: tinciones y morfología.



**Figura 10 .** Vista macroscópica de los pozos a los 6, 12 y 18 días, en el grupo control, medio de osteodiferenciación tradicional y el medio de patente. Tinción de Alizarina Roja.

### 6.2.1 Tinción de Alizarina Roja.



**Figura 11.** Cultivo de células madre de la pulpa dental en medio estándar para diferenciación (CONTROL); medio tradicional de osteodiferenciación (TRADICIONAL); y el medio de osteodiferenciación de patente: Osteodiff (PATENTE) a los 6, 12 y 18 días. Técnica de Rojo Alizarina, 10x. **A y B.** No se observaron cambios. **C.** Se aprecia un nódulo de mineralización grande y un esbozo de otro pequeño (círculo). **D.** Se notó un incremento en la población celular, a diferencia de la figura 11-A. **E.** Se distingue levemente un aumento de la concentración de carbonato en los citoplasmas de algunas células, que se observaron de un tono más rosado. **F.** Para el día 12, en el medio de patente, se distinguieron nódulos de mayor intensidad en su color y tamaño (flechas negras). Aumentó el número de células cuyo citoplasma contenía un incremento en la densidad de carbonato, por lo que se apreciaban de un color ligeramente más rojizo en comparación de lo observado a los 6 días. **G.** A los 18 días, el grupo control no presentó cambios. **H.** El grupo tradicional presentó un acúmulo de calcio aislado de un tono más intenso, (flecha negra). Se apreciaron concentraciones de carbonato en los citoplasmas de una mayor cantidad de células. **I.** En el medio de patente, fue evidente el incremento en la cantidad de depósitos de calcio en todos los pozos correspondientes al osteoDiff (flechas negras).

Durante el día 6 tanto en el grupo control como en el tradicional, no se observó ninguna concentración de calcio, sólo se distinguió levemente el citoplasma de las CMMPD, en el cual, probablemente se encontraba algún compuesto carbonatado (**Figuras 10-A y 10-B**). Sin embargo, en el grupo del medio de patente, fue notable el surgimiento de pequeños nódulos de mineralización redondos, pero escasos. Así mismo, en el citoplasma de algunas células osteoprogenitoras, se aprecian condensaciones de lo que serían esbozos de acúmulos de calcio. (**Figura 10-C**)

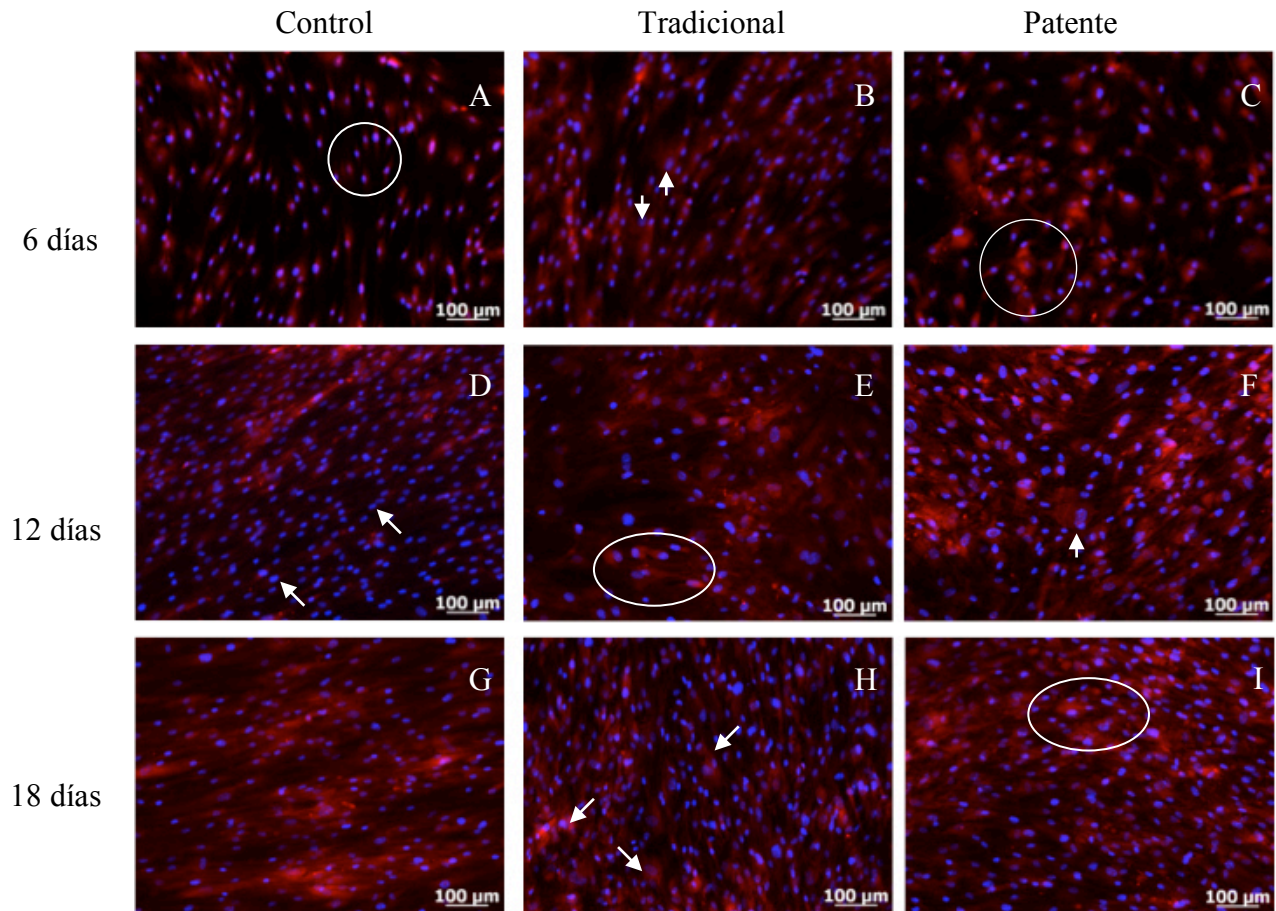
En el día 12, en el grupo control se observó mayor población celular en comparación del día 6 sin la formación de acúmulos cálcicos. (**Figura 10-D**) Con respecto al medio tradicional, se apreciaron ciertos aumentos de concentraciones de carbonato en los citoplasmas de algunas células, los cuales se observaron de un tono más rosado. No se distinguieron acúmulos de calcio de un tono más intenso (**Figura 10-E**). Se observó que en el medio de patente, se distinguieron nódulos de mayor intensidad en su color, tamaño, y cantidad que a los 6 días. Aumentó el número de células cuyo citoplasma contenía un incremento en la densidad de carbonato, por lo que se apreciaban de un color ligeramente más rojizo en comparación de lo observado a los 6 días. (**Figura 10-F**).

Finalmente, en el día 18, en el grupo control no se detectaron acúmulos de calcio. (**Figura 10-G**). El grupo tradicional presentó un acúmulo de calcio aislado de un tono más intenso, se apreciaron concentraciones de carbonato en los citoplasmas de una mayor cantidad de células, ligeramente más condensadas que en el día 12. (**Figura 10-H**). En el medio de patente, fue evidente el incremento en la cantidad de depósitos de calcio en todos los pozos correspondientes al osteoDiff. Incluso, algunos acúmulos eran redondeados, de un rojo más intenso, uniéndose o confluyendo.

A su vez, en ése mismo día, se observaron los citoplasmas de algunas células con una saturación total de calcio, pero que aún conservaban la morfología celular. Ésa saturación de calcio fue desde tonos ligeramente anaranjados, hasta llegar al rojo propiamente dicho, lo cual representó el grado de concentración de calcio dentro de la

célula. Algunas presentaban una morfología alargada, asemejando a fibras, que pueden corresponder tal vez a las fibras de colágeno que fueron producidas al inicio de la osteodiferenciación, quienes en ésta etapa de mineralización, fueron revestidas de calcio liberado por las vesículas de mineralización. (**Figura 9 y 10-I**)

## 6.2.2 Autofluorescencia con Eosina y DAPI como contraste.



**Figura 12.** Cultivo de células madre de la pulpa dental en medio estándar para diferenciación (CONTROL); medio tradicional de osteodiferenciación (TRADICIONAL); y el medio de osteodiferenciación de patente: Osteodiff (PATENTE) a los 6, 12 y 18 días. Técnica de autofluorescencia (Eosina con DAPI), 10x. **A.** Se observó la morfología alargada o ahusada, con un núcleo céntrico y prominente (círculo blanco), así como agrupaciones celulares, características de las CMMPD.

**B.** Se distinguió una mayor población celular, sus citoplasmas eran más amplios, de una forma más romboide, (flechas blancas). **C.** El medio de patente presentó una morfología celular poliédrica y amplia con un núcleo ligeramente más redondeado y excéntrico (círculo blanco). **D.** Se apreció una morfología forma ahusada, con su núcleo ovalado, céntrico (flechas blancas). **E.** Fue notable la desorganización en la disposición de las células, el cambio en su morfología a un citoplasma poliédrico con un núcleo ovalado y grande (círculo blanco). **F.** La disposición celular seguía siendo desordenada aunque se esbozaban indicios de cierta orientación de las células, su forma era más cuadrangular, con núcleos grandes, céntricos y ovalados (flecha blanca).

**G.** Se notó una mayor organización y población celular con una morfología ahusada y núcleo central, característica de las células mesenquimales. **H.** se observaron algunas células de citoplasma amplio que conservaban la forma cuadrangular, característica de

los osteoblastos (flechas blancas), organizadas de manera reticular. **I.** Debido a la gran confluencia que se observó, la morfología celular se presentó ligeramente más aplanada que en el día 12, los osteoblastos conservaron su citoplasma amplio y núcleo más redondeado (círculo blanco).

Al inicio, durante el **día 6**, en los *pozos control*, la población celular no alcanzaba una confluencia máxima, sin embargo, se observó la morfología alargada o ahusada, con un núcleo céntrico y prominente, así como agrupaciones celulares, características de las CMMPD (**Figura 11-A**). En el *medio tradicional*, se distinguió una mayor población celular, sus citoplasmas eran más amplios, de una forma más romboide, si se comparaba con el grupo control; se observó también cierta organización en la disposición de las células (**Figura 11-B**).

El *medio de patente* presentó una morfología celular poliédrica y amplia con un núcleo ligeramente más redondeado y excéntrico. Existía menor cantidad celular, comparada con el medio tradicional a los 6 días, signo característico de la osteodiferenciación y el comienzo de la mineralización. De la misma manera, se observó una disposición desordenada (**Figura 11-C**).

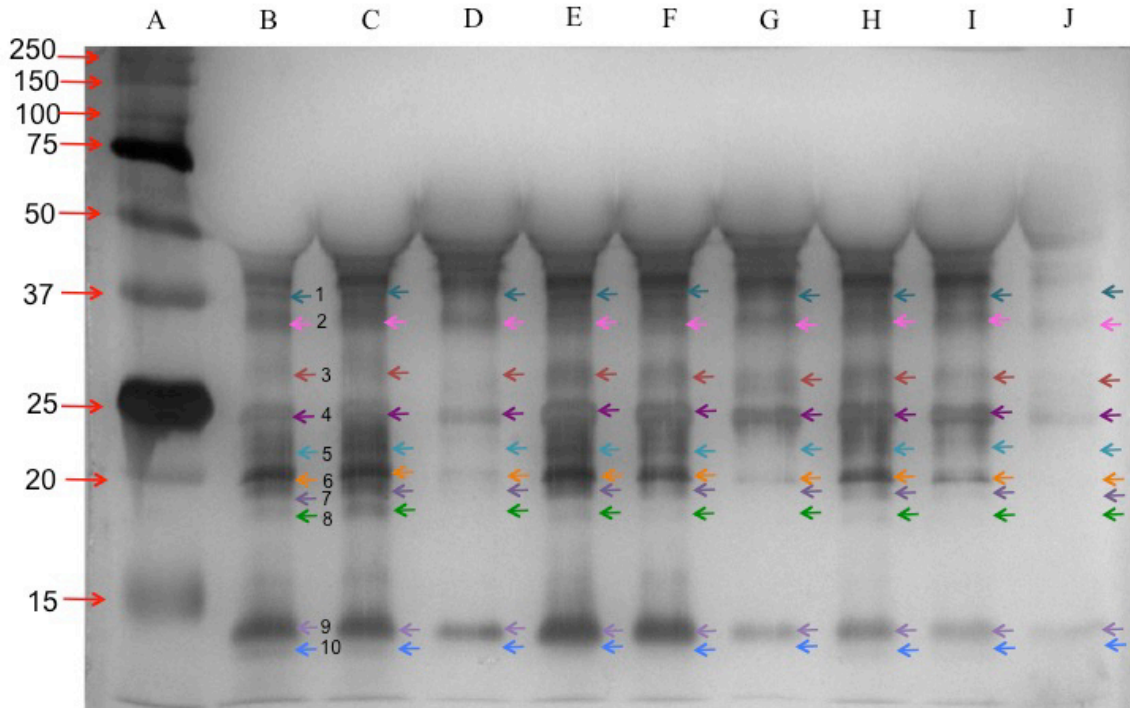
Durante el **día 12**, se observó que en el *medio control* (**Figura 11-D**) se incrementó la cantidad de CMMPD e incluso, las agrupaciones celulares ya no se distinguieron, pues confluyeron. Se observó una mayor organización de las células. Se hizo más característica su forma ahusada, con su núcleo ovalado, céntrico.

En el *medio tradicional* (**Figura 11-E**), fue notable la desorganización en la disposición de las células, el cambio en su morfología a un citoplasma poliédrico con un núcleo ovalado y grande. Se identificó que en el *medio de patente* (**Figura 11-F**), la disposición celular seguía siendo ligeramente desordenada aunque se esbozaban indicios de cierta orientación de las células. Su forma era más cuadrangular, con núcleos grandes, céntricos y ovalados.

Para los **18 días** de osteodiferenciación, en el *medio control*, se notó una mayor organización y población celular con una morfología ahusada y núcleo central, característica de las células mesenquimales (**Figura 11-G**). Por otro lado, el *medio tradicional* (**Figura 11-H**) presentó una mayor cantidad de células con una disposición reticular. Debido a la gran confluencia celular, no fue posible distinguir claramente la morfología celular general, sin embargo, se observaron algunas células de citoplasma amplio que conservaban la forma cuadrangular, característica de los osteoblastos.

Se apreció una mayor cantidad de células en un aparente entrecruzamiento en el *medio de patente* (**Figura 11-I**). Debido a la gran confluencia que se observó, la morfología celular se presentó ligeramente más aplanada que en el día 12, los osteoblastos conservaron su citoplasma amplio y núcleo más redondeado.

### 6.3 Electroforesis bidimensional



**Figura 13.** Gel de poliacrilamida al 10%.

**Carril A:** Marcador de peso molecular de amplio rango (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad). **Carril B:** Medio control a los 6 días. **Carril C:** Medio tradicional de osteodiferenciación a los 6 días. **Carril D:** Medio de osteodiferenciación de patente (OsteoDiff, Mitenyi Biotec) a los 6 días. **Carril E:** Medio control a los 12 días de cultivo. **Carril F:** Medio tradicional a los 12 días. **Carril G:** Medio de patente a los 12 días. **Carril H:** Medio de control a los 18 días. **Carril I:** Medio tradicional a los 18 días. **Carril J:** Medio de patente a los 18 días.

**Línea 1:** Proteína de 40KDa. (Probable osteonectina)

**Línea 2:** Proteína de 36KDa. (Probable sialoproteína ósea)

**Línea 3:** Proteína de 26KDa. (Probable BMP-2)

**Línea 4:** Proteína de 25KDa.

**Línea 5:** Proteína de 23KDa.

**Línea 6:** Proteína de 20KDa. (Probable IGF-2)

**Línea 7:** Proteína de 19KDa.

**Línea 8:** Proteína de 18KDa.

**Línea 9:** Proteína de 14KDa.

**Línea 10:** Proteína de 13KDa.



Se corrió un gel de acrilamida al 10% con los sobrenadantes de cada los 3 tiempos en los que se evaluó el experimento. Se empleó un marcador de peso molecular de 250 a 10 KDa. (Figura 12)

Peso Molecular	Proteína	Fuente
200	Miosina	Músculo esquelético de conejo
116.3	Galactosidasa	<i>E. coli</i>
66.2	Albúmina sérica	Bovino
31	Anhidrasa carbónica	Bovino
21.5	Inhibidor de tripsina	Frijol de soya
14.4	Lisozima	Huevo de gallina
6.5	Aprotinina	Páncreas bovino

**Tabla 2.** Proteínas que constituyen al marcador de peso molecular(SDS-PAGE Kaleidoscope Standards, Bio-Rad).

### 6.3.1 Proteínas con un peso molecular similar a aquéllas que participan en el proceso de mineralización ósea.

Se expresó una proteína de **40 KDa**, (línea 1) de manera tenue para el grupo control y el medio de patente a los 6 días, siendo intensa en el medio tradicional. Se intensificó al día 12 en el medio control y tradicional, siguiendo tenue en el medio de patente. Para el día 18, en el medio control y tradicional la banda continuaba intensa desapareciendo en el medio de patente. Este peso molecular corresponde a la **osteonectina**, la cual está ligada a la fase de maduración de la matriz extracelular en formación u osteoide, pues tiene afinidad con la hidroxapatita.

Una proteína de **36KDa**, (línea 2) se observó de una tonalidad intensa el día 6 para los 3 grupos. Para el día 12 del experimento, se expresó tenue en el medio control y el tradicional pero en el medio de patente desapareció. Para el día 18, sólo permaneció la

banda del medio de control y desaparecieron las correspondientes al medio tradicional y al de patente. El peso se asemeja con el de la **sialoproteína ósea**, 33KDa, la cual tiene su expresión durante todo el proceso de mineralización, está ligada con el surgimiento de los osteoblastos.

Se detectó una proteína de **26 KDa**, (*línea 3*) de manera tenue el día 6 en el medio control, no haciéndose visible en los medios tradicional y de patente. Sin embargo, para el día 12, se observó intensamente en el medio control y tradicional, siendo tenue en el medio de patente. En el día 18, seguía intensa la banda que correspondía para el medio control, tenue para el medio tradicional y se encontraba ausente en el medio de patente. **BMP-2** tiene un peso molecular de 26KDa y se ha comprobado que su elevación induce la expresión de osteocalcina, proteína que aparece en las últimas fases de mineralización.

Una proteína de **20 KDa** (*línea 6*) se observó, la cual se asemeja al peso molecular de **IGF-2** el cual es de 20.149KDa. Junto con IGF-1, aparecen en la fase proliferativa donde contribuyen a la maduración del osteoblasto y la expresión de fosfatasa alcalina.

### **6.3.2 Proteínas expresadas cuyos pesos moleculares no corresponden a aquéllas que participan en la mineralización ósea.**

Una proteína de **25KDa**, (*línea 4*) se expresó de manera intensa el día 6 para el medio de patente, observándose tenue en los demás medios. Después, en el día 12 se intensificó la expresión para los tres grupos. En el día 18, siguió intensa la banda en el grupo del medio control y tradicional. No obstante, la banda del medio de patente se observó tenue.

Se expresó una proteína de **23KDa** (*línea 5*), de manera intensa en los medios control y tradicional los días 6 y 12, mientras que en el día 18, se observaron tenues. Sin embargo, en el medio de patente, la banda no apareció en el día 6, se mostró tenue el día 12 y desapareció nuevamente en el día 18.

Se observó la expresión de una proteína de **19KDa** (*línea 7*) de manera intensa para los grupos control y tradicional los días 6 y 12. En el medio de patente, durante el día 6 se apreció de forma tenue, no apareciendo los días 12 y 18. En el día 18, los medios control y tradicional registraron una banda tenue.

Se detectó una proteína de **18KDa** (*línea 8*), de manera tenue en los medios control y tradicional los días 6 y 12, desapareciendo para el día 18. En el medio de patente no se observó ninguna línea durante los 3 días del experimento.

Una proteína de **14KDa** (*línea 9*) se expresó de manera intensa los días 6 y 12 para los medios control y tradicional siendo tenues el día 18. La banda fue intensa el día 6 para el medio de patente, pero para el día 12 y 18 se apreciaba tenue.

Se detectó una proteína de **13KDa** (*línea 10*) de manera tenue el día 6 en el medio de control y el tradicional, desapareciendo en el día 12 y reapareciendo para el día 18. En el medio de patente no se expresó.

## 7. DISCUSIÓN

Se obtuvo la pulpa dental a partir de premolares extraídos por motivos de tratamiento ortodóntico. A partir de dicho tejido, después de su correspondiente procesamiento, fue posible extraer células madre, cuya morfología coincide con Gronthos y colaboradores (Gronthos et al, 2000).

La morfología encontrada en el medio de cultivo expandido de CMMPD previo a la osteodiferenciación, en éste trabajo, correspondió con lo encontrado en distintas publicaciones, una de ellas es la de Gronthos y colaboradores, la cual reportó que tenían una morfología similar a la del fibroblasto: ahusada, formando colonias y asentadas en la base del frasco. Por lo tanto, en el *medio control*, a los 6, 12 y 18 días sólo se observó un aumento en la población celular y la morfología fue siempre la misma: ahusada con núcleo céntrico. (Gronthos et al, 2000; Nagata et al 2008)

A partir del *día 6 de osteodiferenciación*, tanto en el medio tradicional, como en el de patente, se observó un cambio en la morfología celular, se distinguieron unas células poliédricas, un citoplasma más amplio. Esto corresponde con las características de un osteoblasto en su fase activa descrito por Nanci y Ten Cate. (Nanci y Ten Cate, 2008)

Así mismo, al *sexto día*, se observó una disminución en la población celular en los medios tradicional y de patente, una transición descrita por Owen y colaboradores que consiste en el cese de la proliferación celular para dar paso al comienzo de la secreción de proteínas y la mineralización de la matriz ósea. (Owen et al, 1990)

Mediante la tinción de Rojo Alizarina fue posible observar el surgimiento de pequeños nódulos minerales para el *día 6*, en el medio de patente. En el medio tradicional sólo se apreció una condensación del colorante dentro de las células, lo que correspondería tal vez a las vesículas de mineralización descritas por Ermanno Bonucci

y Clarke Anderson. Según éstos autores, las vesículas de la matriz se ubican extracelularmente, tienen 100nm de diámetro ubicadas estratégicamente en sitios donde inicia la calcificación, como en el cartílago, hueso y predentina. Sin embargo, éstas vesículas tienen su origen en la membrana externa de células diferenciadas como condrocitos, osteoblastos y odontoblastos. La liberación de éstas vesículas a distintas áreas de la matriz tiene la finalidad de distribuir la calcificación.(Bonucci, 1992; Anderson, 2003)

Así mismo, Anderson describió dos fases de la mineralización biológica en la que las vesículas de la matriz desempeñan un papel importante. En la **Fase I** se forman los primeros cristales minerales dentro de las vesículas, lo cual es aumentado por la actividad de las fosfatasa (fosfatasa alcalina, adenosin trifosfatasa y pirofosfatasa) en conjunto con las moléculas de unión al calcio (anexina y fosfatidil serina) los cuáles se encuentran concentrados dentro o cerca de la membrana de las vesículas de la matriz.

La **Fase II** de la mineralización biológica comienza con la liberación de cristales a través de la membrana de las vesículas de la matriz exponiendo los cristales de hidroxiapatita recién formados al fluido extracelular. El fluido extracelular normalmente contiene suficiente calcio y fosfato para mantener la proliferación continua de cristales, sirviendo los cristales preformados como base o núcleos para la formación de nuevos cristales por medio de una nucleación homóloga. Lo que concuerda con los compuestos carbonatados observados dentro y fuera de las células a partir del día 6 en adelante. (Bonucci, 1992; Anderson, 2003)

Al observar la autofluorescencia en el **día 6**, fue notable el cambio morfológico celular del medio de patente, características que correspondían a la descripción de un osteoblasto y fue notable su desorganización comparado con el medio control y el tradicional. Lo anterior puede relacionarse con la actividad osteoblástica secretora, pues se construye una red de fibras de colágeno donde las proteínas y material calcificado será depositado (Sodek y McKee, 2000)

Durante el **día 12**, el aumento de depósitos minerales, principalmente el calcio, fue evidente en el medio de patente teñido con Rojo Alizarina. Se apreciaron de un tono

más intenso y en mayor cantidad que en el día 6. En el medio tradicional sólo se apreciaba levemente algunos compuestos carbonatados dentro del citoplasma y en el medio extracelular, probablemente hecho por las vesículas de la matriz, originadas en los osteoblastos. Este día coincide con la primera transición en el proceso de la mineralización: el aumento de la secreción de la fosfatasa alcalina (día 12 a 18) para continuar con fase de maduración de la matriz ósea descritos por Owen y otros autores. (Owen et al, 1990)

Por medio de la autofluorescencia al **día 12** fue posible observar una desorganización de las células del medio tradicional, situación que se observó en el medio de patente desde el día 6. Como se comentó anteriormente, ésta desorganización corresponde a la preparación de una matriz no mineral, esto es, el osteoide descrito por Sodek, Nanci y Ten Cate, entre otros. (Sodek y McKee, 2000; Nanci y Ten Cate, 2008; Gronthos et al, 2000)

En el medio de patente, para el **día 18**, se incrementó notablemente la cantidad de compuestos de calcio captados por la Alizarina Roja, de un color más intenso. A su vez fue notable la saturación de material cálcico en los citoplasmas de algunos osteoblastos. Se observaron más nódulos minerales de distintos tamaños. Éste día coincide con los descritos por Owen (del 16 al 20) en el que se registra una alta expresión de osteocalcina y otras proteínas como la BMP-2 y osteopontina asociadas con la mineralización propiamente dicha. (Owen et al, 1990; Nagata et al, 2008)

A diferencia del medio de patente, para el **día 18**, el medio tradicional presentó nódulos minerales aislados y pequeños. Se observó que las formaciones minerales del día 18 para el medio tradicional se presentaron desde el **día 6** en el medio de patente, haciendo notable la eficiencia de osteodiferenciación de éste frente al medio tradicional, situación observada por Rodríguez-Lozano y colaboradores, en donde el mismo medio de patente (OsteoDiff, Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany), fue

comparado con 2 medios de osteodiferenciación tradicional (con y sin dexametasona). Los investigadores encontraron que el OsteoDiff mostró niveles altos de concentraciones de Rojo Alizarina demostrando tener mayor eficiencia para la diferenciación de osteoblastos, sin embargo, sus componentes exactos no son dados a conocer al público por el fabricante, por lo que actualmente se desconoce qué lo hace tan eficiente. (Rodríguez-Lozano et al, 2012)

En las imágenes de autofluorescencia del **día 18**, tanto en el medio de patente como en el tradicional, se observó la organización en red de los osteoblastos, como lo establecen Sodek y McKee en su artículo, sin perder su morfología poliédrica así como una mayor confluencia o cantidad de células. (Sodek y McKee, 2000).

En lo observado en la electroforesis del sobrenadante recolectado, entre las proteínas expresadas, 6 de ellas correspondían a los pesos moleculares de aquéllas que están involucradas con la mineralización: *osteonectina*, *sialoproteína ósea*, *BMP-2* y *IGF-2*. Su expresión a lo largo del tiempo de osteodiferenciación corresponde con diversos autores, quienes señalan que las proteínas se expresan de manera intensa al inicio de la osteodiferenciación. (Anderson, 2003; Bonucci, 1992; Nagata et al, 2008)

Al momento de la mineralización, la intensidad de las bandas es menor debido a que las proteínas quedan incluidas en la matriz mineral en formación. Lo anterior se expresó claramente en la **línea 3**, la cual correspondía a una proteína con un peso molecular de 26KDa, similar al de una *BMP-2*. Dicha línea, se observa al inicio de forma tenue y conforme avanzan los días de osteodiferenciación, se intensifica (días 12 y 18, en los medios tradicional y de patente). Su comportamiento coincide con Nagata y colaboradores, quien determinó que la elevación de esa proteína, aumenta la inducción de la expresión de la *osteocalcina*, proteína que desempeña un papel importante en la mineralización de los tejidos. (Anderson, 2003; Bonucci, 1992; Nagata et al, 2008)

Otro ejemplo de la expresión de las proteínas cuyo peso molecular se relaciona con una proteína ósea, es lo observado en la **línea 1**, donde se registra una proteína de 40KDa, un peso que corresponde a la *osteonectina*. Se observó su mayor expresión en el medio de patente, para el día 12 y posteriormente ya no se registró, probablemente debido a que su secreción máxima se dio en ese momento. Lo anterior concuerda con

Sodek y McKee, quienes en su artículo señalan que ésta proteína participa en la fase de maduración de la matriz ósea, donde se prepara a la matriz extracelular para la deposición de mineral, pues su característica principal es que tiene sitios de adhesión al calcio. (Sodek & McKee, 2000; Owen et al, 1990; Nagata et al, 2008)

Otra manera de comprobar las fases de mineralización sobre la electroforesis, es observar principalmente las bandas del medio de patente, pues evidentemente se aprecia la aparición y desaparición de las proteínas a lo largo del experimento. En el día 12, las bandas están intensas, mientras que para el día 18, desaparecen o se ven tenues. Esto significa que las proteínas dejaron de expresarse en el sobrenadante del cultivo porque muy posiblemente ya estaban formando parte de la matriz mineral, esto es, impregnadas en los nódulos minerales.



## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Fue posible extraer células madre a partir de la pulpa dental de premolares extraídos por motivos ortodónticos y se obtuvo un cultivo proliferado de CMMPD. Su morfología, capacidad de formación de colonias y asentamiento en la base del frasco, fueron características propias de una célula madre.

A su vez, se sembraron en 2 medios de osteodiferenciación: uno con los aditivos tradicionales como la dexametasona, (medio tradicional) y otro medio de patente (OsteoDiff, Miltenyi) así como un medio para la crecimiento de células mesenquimales que sirvió como control.

Se obtuvieron mejores resultados con el medio de patente e incluso se constató que es 2 veces más efectivo que el medio tradicional de osteodiferenciación, pues tan sólo desde el día 6 se apreciaban ya pequeños nódulos minerales, cambiando, así mismo, su morfología rápidamente al de un osteoblasto activo.

En la electroforesis fue notable el poco contenido protéico del sobrenadante del medio de patente incluso desde el 6º día, eso evidenció que las proteínas óseas no estaban siendo liberadas de manera constante, sino que formaban parte del osteoide o tejido no mineralizado en formación.

Ésta información es importante si se consideran a las CMMPD para su uso en las terapias regenerativas, pues el OsteoDiff (Miltenyi, Biotec), agiliza los tiempos de diferenciación de células osteoprogenitoras, por lo tanto, permitirá que la terapia celular en los defectos intraóseos periodontales sea una alternativa a los tratamientos existentes.

Una aplicación clínica muy viable sería colocarlas en un andamio de colágeno (una esponja, por ejemplo) y llevarlas a los defectos intraóseos periodontales, proporcionando así la tridimensionalidad necesaria para el asentamiento de los osteoblastos, los cuáles, comenzarán a formar tejido mineral más estable en un menor tiempo.

Conviene realizar distintos estudios en modelos animales donde se evalúe la regeneración periodontal con osteoblastos a 6 días de diferenciación en el medio de patente en defectos periodontales de una, dos, tres paredes y combinados. Realizar, a su vez, pruebas de distintos “carriers” o medios de transporte que resulten económicos pero al mismo tiempo faciliten el asentamiento de los osteoblastos. O simplemente, comparar y estandarizar la tinción de Von Kossa frente al Rojo Alizarina.

La ventaja de la terapia celular con CMMPD es la falta de una respuesta inmune por parte del organismo receptor. Por lo anterior, las CMMPD obtenidas de las piezas extraídas, ya sean premolares o terceras molares sin caries o enfermedad periodontal, pueden ser criopreservadas, situación que permite una viabilidad celular de hasta por 6 meses. Incluso, se debe comparar dicha viabilidad al momento de hacer la obtención celular, a los 6, 12, y 18 meses de criopreservación para estandarizar procesos de almacenaje.

## LITERATURA CITADA

1. American Academy of Periodontology. Glossary of Periodontal Terms. *J. Periodontol.* 2001 4th Edition.
2. Anderson, H. C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports*, 5(3), 222-226.
3. Bartold, P. M., Shi, S., & Gronthos, S. (2006). Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 40(1), 164-172.
4. Bartold, P., Mcculloch, C. A., Narayanan, A. S., & Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000*, 24(1), 253-269.
5. Berz, D., McCormack, E. M., Winer, E. S., Colvin, G. A., & Quesenberry, P. J. (2007). Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *American journal of hematology*, 82(6), 463-472.
6. Bonucci, E. (1992). *Calcification in biological systems*. CRC press.
7. Cochran, D. L., & Wozney, J. M. (1999). Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 19(1), 40-58.
8. d'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., ... & Papaccio, G. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*, 18, 75-83.
9. da Costa, F. L., Taga, R., & Taga, E. M. (2000). Rabbit bone marrow response to bovine osteoinductive proteins and anorganic bovine bone. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 16(6), 799-808.
10. Del Angel-Mosqueda, C., Gutiérrez-Puente, Y., López-Lozano, A. P., Romero-Zavaleta, R. E., Mendiola-Jiménez, A., Medina-De la Garza, C. E., ... & De la Garza-Ramos, M. A. (2015). Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Head & face medicine*, 11(1), 29.

11. Ding, G., Liu, Y., Wang, W., Wei, F., Liu, D., Fan, Z., ... & Wang, S. (2010). Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells*, 28(10), 1829-1838.
12. Feng, F., Akiyama, K., Liu, Y., Yamaza, T., Wang, T. M., Chen, J. H., ... & Shi, S. (2010). Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral diseases*, 16(1), 20-28.
13. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. (2004) An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 329(1):77-84.
14. Gronthos, S., Akintoye, S. O., Wang, C. Y., & Shi, S. (2006). Bone marrow stromal stem cells for tissue engineering. *Periodontology 2000*, 41(1), 188-195.
15. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13625-13630.
16. Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5(1), 78-111.
17. Hara, R., Wato, M., & Tanaka, A. (2005). Marker of cemento-periodontal ligament junction associated with periodontal regeneration. *Journal of periodontal research*, 40(3), 231-238.
18. Heinegård, D., & Oldberg, A. (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *The FASEB Journal*, 3(9), 2042-2051.
19. Hempelmann E, Götze O (1984) Characterization of membrane proteins by polychromatic silver staining. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem*, 365:241-242.
20. Hsiong, S. X., & Mooney, D. J. (2006). Regeneration of vascularized bone. *Periodontology 2000*, 41(1), 109-122.
21. Honda, M. J., Imaizumi, M., Tsuchiya, S., & Morsczeck, C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *Journal of oral science*, 52(4), 541-552.

22. Huang, G. T. (2009). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative medicine*, 4(5), 697-707.
23. Huang, G. J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9), 792-806.
24. Huang, G. T. J., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., & Shi, S. (2008). The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of endodontics*, 34(6), 645-651.
25. Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G., & Martuscelli, G. (2006). Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000*, 41(1), 48-72.
26. Hunt, C. J. (2011). Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. *Transfusion medicine and hemotherapy*, 38(2), 107-123.
27. Isaka, J., Ohazama, A., Kobayashi, M., Nagashima, C., Takiguchi, T., Kawasaki, H., ... & Hasegawa, K. (2001). Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *Journal of periodontology*, 72(3), 314-323.
28. Kadar, K., Kiraly, M., Porcsalmy, B., Molnar, B., Racz, G. Z., Blazsek, J., ... & Varga, G. (2009). Differentiation potential of stem cells from human dental origin-promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol*, 60(Suppl 7), 167-175.
29. Kaigler, D., & Mooney, D. (2001). Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of dental education*, 65(5), 456-462.
30. Kao, R. T., Murakami, S., & Beirne, O. R. (2009). The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. *Periodontology 2000*, 50(1), 127-153.
31. Kawaguchi, H., Hirachi, A., Hasegawa, N., Iwata, T., Hamaguchi, H., Shiba, H., ... & Kurihara, H. (2004). Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of periodontology*, 75(9), 1281-1287.
32. Kiernan, J. A. (1993). | On Chemical Reactions and Staining Mechanisms. *Exp Eye Res*, 56, 601-604.

33. Kornman, K. S., & Robertson, P. B. (2000). Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. *Periodontology 2000*, 22(1), 22-43.
34. Kramer, P. R., Nares, S., Kramer, S. F., Grogan, D., & Kaiser, M. (2004). Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *Journal of dental research*, 83(1), 27-34.
35. Lang, N. P. (2000). Focus on intrabony defects—conservative therapy. *Periodontology 2000*, 22(1), 51-58.
36. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L., & Chen, T. H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5), 1669-1675.
37. Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Fang, D., Zhang, C., Bartold, P. M., ... & Wang, S. (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem cells*, 26(4), 1065-1073.
38. Lu, Z., Roohani-Esfahani, S. I., Kwok, P. C. L., & Zreiqat, H. (2011). Osteoblasts on rod shaped hydroxyapatite nanoparticles incorporated PCL film provide an optimal osteogenic niche for stem cell differentiation. *Tissue Engineering Part A*, 17(11-12), 1651-1661.
39. Maeda, H., Tomokiyo, A., Fujii, S., Wada, N., & Akamine, A. (2011). Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium. *Stem Cell Res Ther*, 2(4), 33.
40. Mao, J. J., Giannobile, W. V., Helms, J. A., Hollister, S. J., Krebsbach, P. H., Longaker, M. T., & Shi, S. (2006). Craniofacial tissue engineering by stem cells. *Journal of dental research*, 85(11), 966-979.
41. Medina Solís, C. E. (2006). Edentulism among Mexican adults aged 35 years and older and associated factors.
42. Melcher, A. H. (1985). Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 67(2), 130.
43. Mimori, K., Komaki, M., Iwasaki, K., & Ishikawa, I. (2007). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 is involved in ascorbic acid-induced osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *Journal of periodontology*, 78(2), 328-334.

44. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(10), 5807-5812.
45. Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T. E., Völlner, F., Galler, K., & Driemel, O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical oral investigations*, *12*(2), 113-118.
46. Nagata, S., Nozaki, T., Ohura, K., & Daito, M. (2008). Analysis of gene expression during differentiation induction of normal human periodontal ligament cells into an osteoblast lineage. *Journal of Oral Tissue Engineering*, *6*(2), 88-96.
47. Nagatomo, K., Komaki, M., Sekiya, I., Sakaguchi, Y., Noguchi, K., Oda, S., ... & Ishikawa, I. (2006). Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal research*, *41*(4), 303-310.
48. Nampo, T., Watahiki, J., Enomoto, A., Taguchi, T., Ono, M., Nakano, H., ... & Maki, K. (2010). A new method for alveolar bone repair using extracted teeth for the graft material. *Journal of periodontology*, *81*(9), 1264-1272.
49. Nanci A, Ten Cate AR. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. St. Louis: Mosby; 2008.
50. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., & Lindhe, J. (1982). The regenerative potential of the periodontal ligament. *Journal of Clinical Periodontology*, *9*(3), 257-265.
51. Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J., & Kornman, K. S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000*, *14*(1), 216-248.
52. Papapanou, P. N., & Tonetti, M. S. (2000). Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions. *Periodontology 2000*, *22*(1), 8-21.
53. Paul, H., Reginato, A. J., & Ralph Schumacher, H. (1983). Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. *Arthritis & Rheumatism*, *26*(2), 191-200.

54. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol* 2005; 76(12):2187–2193.
55. Polimeni, G., Xiropaidis, A. V., & Wikesjö, U. M. (2006). Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology* 2000, 41(1), 30-47.
56. Rodríguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Meseguer, L., Ramírez, M. C., Martínez, S., & Moraleda, J. M. (2012). Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation. *Journal of Craniofacial Surgery*, 23(6), e571-e575.
57. Rosen, P. S., Reynolds, M. A., & Bowers, G. M. (2000). The treatment of intrabony defects with bone grafts. *Periodontology* 2000, 22(1), 88-103.
58. Seo, B. M., Miura, M., Sonoyama, W., Coppe, C., Stanyon, R., & Shi, S. (2005). Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *Journal of dental research*, 84(10), 907-912.
59. Seo, B. M., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuri, T., Akiyama, K., ... & Shi, S. (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral diseases*, 14(5), 428-434.
60. Silverio, K. G., Rodrigues, T. L., Coletta, R. D., Benevides, L., Da Silva, J. S., Casati, M. Z., ... & Nociti Jr, F. H. (2010). Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *Journal of periodontology*, 81(8), 1207-1215.
61. Sodek, J., & McKee, M. D. (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000, 24(1), 99-126.
62. Thesleff, I., & Tummers, M. (2009). Tooth organogenesis and regeneration. *The Stem Cell Research Community*, StemBook. 1-12
63. Trombelli, L. (2005). Which reconstructive procedures are effective for treating the periodontal intraosseous defect?. *Periodontology* 2000, 37(1), 88-105.
64. Tuan, R. S., Boland, G., & Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*, 5(1), 32-45.
65. Ulmer, F. L., Winkel, A., Kohorst, P., & Stiesch, M. (2010). Stem cells--prospects in dentistry. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin= Revue*



*mensuelle suisse d'odonto-stomatologie= Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia/SSO, 120(10), 860.*

66. Wang, Y. H., Liu, Y., Maye, P., & Rowe, D. W. (2006). Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnology progress, 22(6)*, 1697-1701.
67. Weber, K., & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry, 244(16)*, 4406-4412.
68. Woods, E. J., Perry, B. C., Hockema, J. J., Larson, L., Zhou, D., & Goebel, W. S. (2009). Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology, 59(2)*, 150-157.
69. Yu, J., He, H., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, R., ... & Jin, Y. (2010). Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC cell biology, 11(1)*, 32.
70. Zander, H. A., Polson, A. M., & Heijl, L. C. (1976). Goals of Periodontal Therapy\*. *Journal of periodontology, 47(5)*, 261-266.
71. Zhao, Z., Wang, Y., Wang, D., & Liu, H. (2010). The regulatory role of a disintegrin and metalloproteinase 28 on the biologic property of human periodontal ligament stem cells. *Journal of periodontology, 81(6)*, 934-944.
72. Zhou, Y., Huttmacher, D. W., Sae-Lim, V., Zhou, Z., Woodruff, M., & Lim, T. M. (2008). Osteogenic and adipogenic induction potential of human periodontal cells. *Journal of periodontology, 79(3)*, 525-534.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Delia Eunice Gutiérrez Rivas

Candidata para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas con orientación en Periodoncia con Implantología

Tesis: COMPARACIÓN *IN VITRO* DE DOS MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA EN CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL HUMANA PARA SU APLICACIÓN EN REGENERACIÓN ÓSEA PERIODONTAL.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 12 de Marzo de 1988, hija de Eduardo Gutiérrez Estrada y Delia Eunice Rivas Sánchez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en 2010 con mención honorífica.