



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Inducción a linaje condrogénico de células troncales
mesenquimales de dos tejidos bucales para su potencial uso en
el tratamiento de la osteoartritis”**

TESIS QUE PRESENTA:

GONZÁLEZ GONZÁLEZ ARELY MONTSERRAT

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JUAN BAUTISTA KOURI FLORES

DR. RAÚL ROSALES IBÁÑEZ

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO, 2018

El conocimiento, si no se sabe aplicar, es peor que la ignorancia.

Charles Bukowski

CRÉDITOS A LAS INSTITUCIONES

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para realizar este proyecto, el cual se desarrolló en el laboratorio de Patología osteoarticular bajo la tutoría del Dr. Juan Bautista Kouri Flores, en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) y bajo la tutoría del Dr. Raúl Rosales Ibáñez, jefe del Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, (FES-Iztacala, UNAM) con apoyo del proyecto FESI-DIP-PAPCA-2016-14. Este trabajo fue asesorado el Dr. Marco Antonio Vega y por el Dr. Mario Alberto Rodríguez, ambos profesores e investigadores del CINVESTAV.

TUTORES:

Dr. Kouri Flores Juan Bautista

Dr. Raúl Rosales Ibáñez

ASESORES:

Dr. Mario Alberto Rodríguez

Dr. Marco Antonio Vega

índice

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Osteoartritis.....	1
1.1.1. Epidemiología.....	2
1.1.2. Patogenia.....	2
1.1.3. Tratamiento.....	4

2. ANTECEDENTES

2.1 Células Troncales Mesenquimales (MSCs).....	6
2.1.1 MSCs en la reparación del cartílago hialino.....	8
2.1.2 Heterogeneidad de las MSCs.....	9

3. JUSTIFICACIÓN.....13

4. HIPÓTESIS.....13

5. OBJETIVOS..... 13

5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos específicos.....	13

6. Materiales y métodos14

6.1. Obtención de las muestra.....	14
6.1.1. Criterios de inclusión.....	15
6.1.2. Criterios de exclusión.....	15
6.1.3. Criterios de eliminación.....	15

6.2. Cultivos celulares.....	15
6.2.1. Procesamiento de las muestras.....	15
6.2.2. Generación de cultivos primarios.....	16
6.2.3 Cosecha y siembra de las células, generación de pases.....	16
6.3. Ensayo de viabilidad y proliferación.....	17
6.4. Caracterización de las MSCs.....	18
6.4.1. Citometría de flujo.....	18
6.4.2. Inmunofluorescencia.....	19
6.5. Ensayo de diferenciación tri-linaje de las MSCs.....	20
6.5.1. Evaluación de linaje adipogénico.....	20
6.5.2. Evaluación de linaje osteogénico.....	21
6.5.3. Evaluación de linaje condrogénico.....	21
6.5.3.1. Azul alciano.....	22
6.5.3.2 Safranina O.....	22
6.6. Ensayo de RT-PCR de células inducidas a linaje condrogénico.....	22
6.7. Ensayo de inmunofluorescencia de células inducidas a linaje condrogénico.....	24

7. RESULTADOS.....	25
7.1. Aislamiento de las MSCs de pulpa dental y ligamento periodontal.....	25
7.2. Evaluación y comparación de la proliferación de las células obtenidas de pulpa dental y ligamento periodontal.....	25
7.3. Caracterización de marcadores de superficie de las MSCs.....	26
7.3.1. Genotipificación de MSC mediante citometría de flujo.....	26
7.3.2. Fenotipificación de MSC mediante microscopía de epifluorescencia.....	29
7.4. Evaluación de diferenciación tri-linaje.....	30
7.4.1. Inducción a linaje adipogénico.....	30
7.4.2. Inducción a linaje osteogénico.....	31
7.4.3. Inducción a linaje condrogénico.....	32
7.5. Evaluación de la expresión de colágeno tipo II y SOX-9 como marcadores específicos para cartílago hialino.....	35
7.5.1. Mediante microscopía de epifluorescencia....	36
7.5.2. Mediante RT-PCR.....	36
8. DISCUSIÓN.....	37

9. CONCLUSIÓN.....38

10. PERSPECTIVAS.....39

11. REFERENCIAS.....40

Resumen

La osteoartritis (OA) es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por una destrucción gradual y progresiva del cartílago hialino que recubre las articulaciones. Es una enfermedad muy dolorosa e incapacitante y hasta la fecha no existe una cura. La ausencia de estrategias efectivas para restaurar el cartílago articular de pacientes con OA ha ocasionado un problema de salud pública internacional, por lo que se ha motivado la exploración e investigación de alternativas regenerativas. Desde hace algunos años, las investigaciones se han centrado en las terapias basadas en células, en donde las células troncales mesenquimales (MSCs, mesenchymal stem cells), han jugado un papel relevante ya que tienen la capacidad de diferenciación hacia diversos tipos de células, incluyendo a los condrocitos. Sin embargo, uno de los retos a superar es que estas células en realidad constituyen una población heterogénea, ya que dependiendo de su fuente de origen presentan capacidades de proliferación y diferenciación distintas, que pudieran estar relacionadas con la etapa de diferenciación o con su destino funcional final. Es por ello, que resulta esencial evaluar las MSCs de distintas fuentes y determinar cuál pudiera ser la más adecuada para las terapias en la osteoartritis. Por lo tanto, El objetivo de nuestro estudio fue caracterizar y evaluar la multipotencialidad de las MSCs derivadas de tejidos orales, específicamente de la pulpa dental y el ligamento periodontal.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disease, characterized by a gradual and progressive destruction of the hyaline cartilage of the joints. It is a painful and disabling disease and to date there is no cure. The absence of effective strategies to restore the articular cartilage in OA patients, has caused an international public health problem, which has motivated the research in regenerative alternatives. For years, research has focused on cell-based therapies, where mesenchymal stem cells (MSCs) have played an important role due to their ability to differentiate into different cell types, including the chondrocytes. However, the challenge to overcome is the heterogeneity of these cells. Depending on the source, they have different proliferation and differentiation rates, which might be related to the differentiation stage or to their final functional destination. That is why it is essential to evaluate MSCs from different sources and determine which could be the most suitable for osteoarthritis therapies. Then, the goal of this study was to characterize and evaluate the multipotentiality of MSCs derived from oral tissues, specifically those from dental pulp and the periodontal ligament.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Osteoartritis

La osteoartritis (OA) es una enfermedad crónico-degenerativa principalmente inducida por fuerzas mecánicas, aunque con una etiología compleja (Lories y Luyten 2011). Se caracteriza por una destrucción gradual y progresiva del cartílago hialino de las articulaciones, especialmente de la columna lumbar, la rodilla, la mano y la cadera (Courties y Sellam 2016). Además, hay daño en los meniscos, los tendones, los músculos, así como inflamación de la membrana sinovial, hipertrofia del hueso subcondral y formación de osteofito (Figura 1) (Li *et al.*, 2013). Como consecuencia se presenta dolor, rigidez, deformidad y pérdida de la movilidad y función de las articulaciones afectadas, lo que reduce la calidad de vida de quien la padece (Warner y Valdes, 2016).

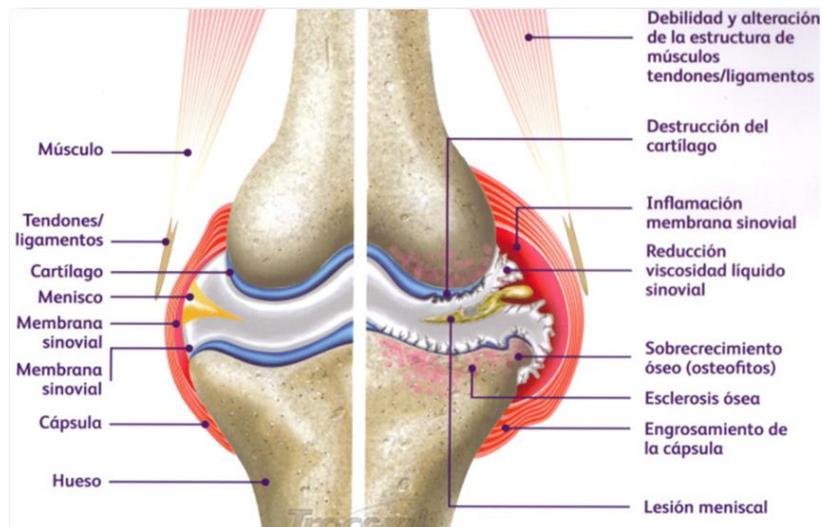


Figura 1. Características de la patología de la osteoartritis. Representación gráfica de la destrucción gradual y progresiva del cartílago hialino de las articulaciones (rodilla), características propias de la osteoartritis.

1.1.1. Epidemiología

En los últimos años, la incidencia y prevalencia de la OA ha ido en aumento debido principalmente al incremento de la obesidad y la esperanza de vida de la población humana (Warner y Valdes, 2016). Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2017) afecta a más de 30 millones de adultos estadounidenses, en Europa se calcula que la padecen más de 40 millones de personas, y estimando que afecte a 130 millones para el año 2050 (Musumeci, 2017). En México, la prevalencia es del 10.5% y es más frecuente en mujeres (11.7%) que en hombres (8.71%)(Morales *et al.*, 2013). La OA también tiene un impacto económico negativo ya que, por ejemplo, en los Estados Unidos, la incapacidad funcional asociada a la OA ha llegado a tener un costo estimado de \$4,728,425 dólares anuales en cuidados médicos y gastos indirectos, incluyendo la pérdida de ingresos y productividad, (Arnold *et al.*, 2007).

1.1.2. Patogenia

Una de las características patológicas relevantes de la OA es la degradación progresiva del cartílago articular. El cartílago articular es un tejido conectivo, avascular, aneural y alinfático, constituido por los condrocitos y por la matriz extracelular (MEC) (Musumeci, 2017) (Figura 2), formada por una red de proteínas colágenas (tipo II, V, VI, IX, X y XI), proteoglicanos (PG, principalmente agregano), glicoproteínas y moléculas de adhesión como fibronectina y laminina (Buckwalter y Mankin, 1998).

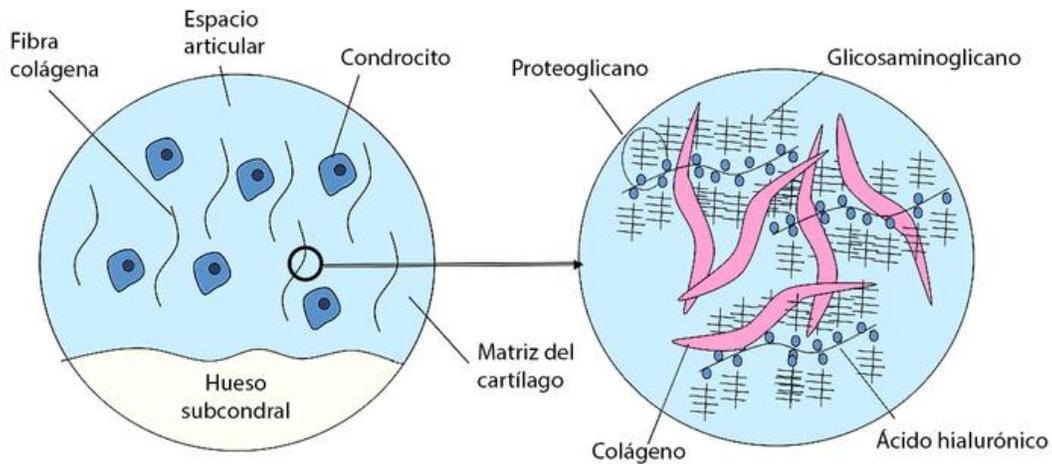


Figura 2. Componentes del cartílago articular. El cartílago articular está constituido por los condrocitos y por la matriz extracelular (MEC), formada por una red de proteínas colágenas (tipo II, V, VI, IX, X y XI), proteoglicanos, glicoproteínas y moléculas de adhesión como fibronectina y laminina, (Buckwalter y Mankin 1998).

Estos componentes de la MEC se renuevan continuamente en un equilibrio entre su producción y su degradación por las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). En la OA, la degeneración del cartílago está relacionada a factores como la edad, predisposición genética, ejercicios de alto impacto, traumatismos, mala alineación articular, entre otros desencadenantes del desequilibrio fisiológico (Cimmino y Parodi, 2004). El daño molecular a la MEC ocurre debido a la actividad creciente de las MMPs -2, -3, -13 y de las agrecanasas, principalmente las ADAMTs-4 y -5 (Burrage, Mix y Brinckerhoff, 2006), que son inducidas por moléculas inflamatorias como la Interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Kapoor *et al.*, 2011). Además, su patogénesis engloba cambios biomecánicos y bioquímicos, como la incapacidad para soportar tensiones mecánicas normales, una disminución en

el suministro de nutrientes y oxígeno, así como la síntesis inadecuada de sus componentes, que en su conjunto desencadenan la muerte celular programada de los condrocitos (Charlier *et al.*, 2016). La muerte celular de los condrocitos fue descrita por primera vez por nuestro grupo de investigación (Kouri *et al.*, 1997) y posteriormente validada en otros trabajos (Blanco *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 1998) y, que de acuerdo a diferentes estudios, presenta características particulares que involucran una combinación de apoptosis y autofagia (Almonte-Becerril *et al.*, 2010), por lo que se ha denominado condroptosis (Kouri y Lavalle, 2006). En cartílago de pacientes con OA se han descrito diferentes sub-poblaciones de condrocitos (Kouri *et al.*, 1996) que se pueden relacionar con las diferentes etapas de la enfermedad y que han permitido establecer una hipótesis de activación y transdiferenciación del condrocito (Kouri y Lavalle, 2006), que plantea que al recibir las señales nocivas, los condrocitos normales sufren cambios morfo-funcionales para convertirse en condrocitos con capacidad reparativa (aumento en retículo endoplásmico y aparato de Golgi), pero que al continuar las señales nocivas desencadenan su proceso de muerte (Kouri y Lavalle, 2006). Al ser los condrocitos el único tipo celular en el cartílago, su supervivencia es fundamental para mantener la integridad de la MEC y en general del tejido.

1.1.3. Tratamiento

Actualmente no existe una terapia para prevenir la destrucción del cartílago articular, revertir los daños o detener su progreso. El uso de analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINES) no modifican el curso de la enfermedad, al igual que los cambios de

la actividad física y pérdida de peso, por lo que solo se prescriben para aliviar el dolor. Dentro de las técnicas paliativas utilizadas está el lavado articular, debridamiento y sinovectomía, procedimientos que proporcionan resultados efectivos contra el dolor durante el primer año postquirúrgico, y cuyos beneficios se pierden con el tiempo, ya que la OA sigue avanzando (Lee y Wang, 2017). La técnica reparativa que se aplica actualmente es la microfractura u osteoplastia, en la que se provoca una hemorragia en el hueso subcondral, que induce que se formen coágulos de fibrina y con ello la formación de tejido fibrocartilaginoso. Sin embargo, ese procedimiento solo se recomienda para las lesiones condrales focales (Lützner *et al.*, 2009) y solo hay una mejora funcional efectiva a corto y medio plazo ya que el tejido formado eventualmente se pierde (Kaul *et al.*, 2012). Por otra parte, las técnicas sustitutivas como la mosaicoplastia y el implante de condrocitos autólogos aportan un tejido de reparación de mayor calidad, pero implican la escisión de cartílago sano que se obtiene de las zonas de menor carga, para conseguir una elevada cantidad de condrocitos o para extraer cilindros osteocondrales que se implantan en el defecto (Lee y Wang, 2017). Además, varios estudios de seguimiento han demostrado la reabsorción de la capa de injerto y la degeneración de la superficie condral. Un tratamiento radical para la OA es el reemplazo quirúrgico total de la articulación dañada, que pueden tener complicaciones significativas como la muerte, la embolia pulmonar e infecciones que requieren readmisión al hospital (2%); además de una limitada funcionalidad de la prótesis en comparación con una articulación sana (Freitag *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1 Células troncales mesenquimales (MSCs)

La ausencia de estrategias efectivas para restaurar el cartílago articular en pacientes con OA ha ocasionado un problema de salud pública internacional, por lo que se ha motivado y justificado la exploración e investigación de alternativas regenerativas (Freitag *et al.*, 2016) como la ingeniería tisular (IT) (Wyles *et al.*, 2015; Berebichez-Fridman *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017), en la cual los principales componentes requeridos para obtener una regeneración funcional de los tejidos pueden incluir andamios biodegradables, fármacos o factores de crecimiento y diferentes tipos de células (Correia *et al.*, 2014), entre las más utilizadas se encuentran las células troncales mesenquimales (MSCs). Estas células se identificaron por primera vez en médula ósea y posteriormente en muchos otros tejidos (Weissman, Anderson y Gage, 2001), como el líquido y membrana sinovial, periostio, hueso trabecular, tejido adiposo, músculo esquelético y tejidos bucales (Berebichez-Fridman *et al.*, 2017).

En la actualidad sabemos que estas células son las encargadas del mantenimiento de los tejidos adultos, con la propiedad de dividirse simétrica o asimétricamente, para producir una célula troncal idéntica y una célula progenitora parcialmente comprometida. De manera general, un balance dinámico entre señales de proliferación, sobrevivencia y diferenciación asegura que se mantenga un equilibrio apropiado de células troncales y células diferenciadas (Rao y Mattson, 2001; Santiago *et al.*, 2007).

En el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT (*International Society Cellular Therapy*) estableció tres criterios mínimos para definir a las MSCs, independientemente de su origen y método de aislamiento: deben tener la capacidad de adherirse al plástico en condiciones de cultivo estándar, deben expresar las moléculas CD105, CD73 y CD90 y no expresar a CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 y HLA de clase II y finalmente, deben diferenciarse *in vitro* en osteocitos, adipocitos y condrocitos, en respuesta a estímulos inductores específicos, lo que se conoce como diferenciación tri-linaje (Figura 3)(Dominici *et al.*, 2006).

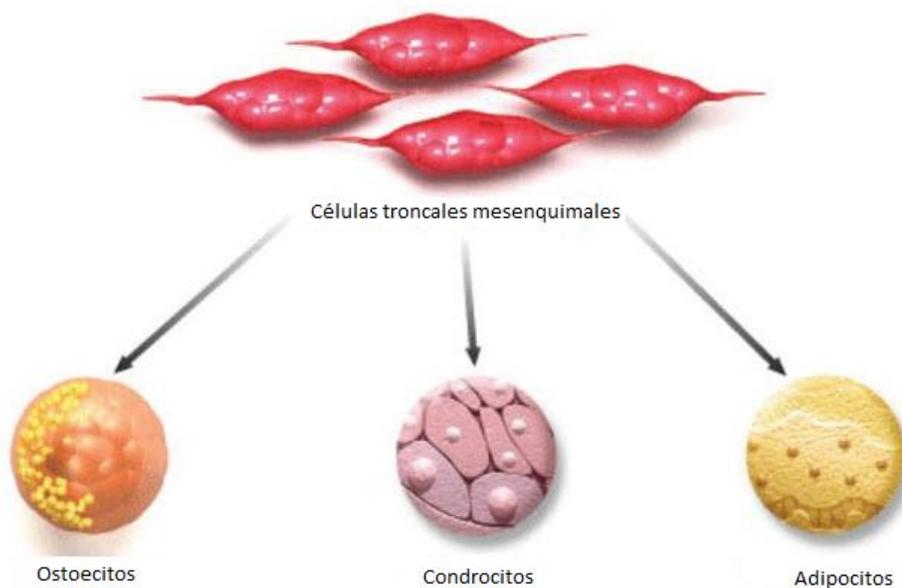


Figura 3. Diferenciación de las células troncales mesenquimales (MSCs). Las MSCs pueden diferenciarse en osteocitos, condrocitos y adipocitos, esta potencialidad puede variar de acuerdo con el tejido de obtención.

2.1.1. MSCs en la reparación del cartílago hialino

Aplicar a las MSC en la reparación y regeneración del cartílago articular enfrenta desafíos sustanciales, ya que este tejido tiene un alto grado de complejidad morfológica y biomecánica intrínseca asociado con su MEC (Somoza *et al.*, 2014). Además, durante años de investigación se ha observado que las MSCs tienen un programa de diferenciación intrínseca que finaliza con la hipertrofia, mineralización y muerte de los condrocitos, por lo que no se ha logrado mantener el fenotipo de cartílago hialino, aun después de la exposición a reactivos específicos que son parte de los protocolos de diferenciación condrogénica (Scotti *et al.*, 2010; Lee y Wang, 2017). Por lo tanto, para tener éxito en la reparación del cartílago articular se requiere imitar la arquitectura tridimensional del tejido y de comprender los eventos moleculares involucrados en la diferenciación hacia condrocitos que mantengan el fenotipo hialino (Somoza *et al.*, 2014).

En el humano no se han podido llevar a cabo ensayos clínicos, principalmente porque estos andamios tienen que presentar biocompatibilidad y biodegradabilidad regulada conforme se va generando nuevo cartílago; además, deben de ser inductivos para optimizar un microambiente adecuado, entre otras características que son difíciles de aplicar de manera óptima (Wyles *et al.*, 2015). En espera del avance en el diseño de soportes biológicos adecuados para el tratamiento de la OA, se han utilizado MSCs inyectadas en la articulación de pacientes, demostrando una mejora en la función de la articulación, aunque los estudios se han realizado a corto plazo (Lee y Wang,

2017). Por otro lado, las MSCs presentan una ventaja significativa comparada con los enfoques quirúrgicos actuales, ya que potencialmente pueden sustituir a los condrocitos autólogos y obtener tejido con propiedades histológicas consistentes con el cartílago hialino (Diekman y Guilak, 2013).

2.1.2 Heterogeneidad de las MSCs

Uno de los retos a superar es que, aunque las MSCs cumplen con las normas mínimas de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, en realidad constituyen una población celular heterogénea, ya que dependiendo de la fuente de origen (Figura 4) muestran capacidades de proliferación y diferenciación distintas (Wyles *et al.*, 2015), que pudieran estar relacionadas a la etapa de diferenciación o a su ubicación física y su destino funcional final (Somoza *et al.*, 2014). Se han reportado diferencias en la expresión relativa de los mRNA de los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105 (Somal *et al.*, 2016), por lo que no pueden ser consideradas como equivalentes (Wyles *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017). Además, las MSCs presentan diferentes respuestas ante estímulos inductivos; por ejemplo, TGF- β por sí solo puede inducir a las MSCs de médula ósea a su diferenciación condrogénica, lo que no ocurre con las MSCs aisladas de tejido adiposo, que además requieren de BMP-6 (Somoza *et al.*, 2014). No obstante, los mecanismos celulares y moleculares detallados de las variaciones de las MSCs dependiendo de la fuente de obtención no se entienden por completo (Huang *et al.*, 2017) y poco se sabe de la expresión de los marcadores moleculares que puedan ayudar en su caracterización (Chen *et al.*, 2015).

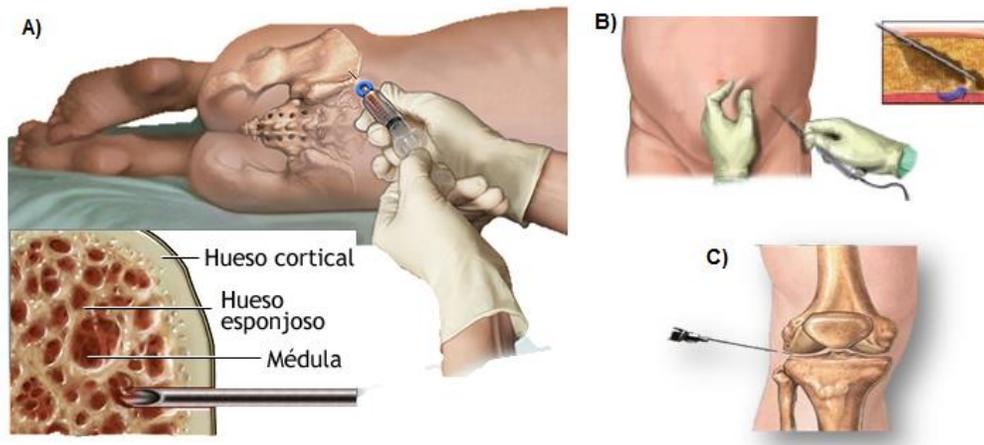


Figura 4. Fuente de aislamiento de células troncales mesenquimales. Representación gráfica de tres diferentes fuentes de MSCs derivadas de A) médula ósea B) tejido adiposo C) y líquido sinovial.

Para poder identificar y explotar mejor el potencial terapéutico de las MSCs, resulta crucial reducir su heterogeneidad, por lo tanto se requiere comparar sus características biológicas, describir marcadores de superficie celular, factores de transcripción, sus patrones de expresión génica y capacidad de proliferación de las MSCs aisladas de diferentes fuentes (Chen *et al.*, 2015; Okolicsanyi *et al.*, 2015), para ir identificando las características moleculares y genéticas de un verdadero progenitor de cartílago hialino. basados en células que tengan propiedades intrínsecas bien definidas, en función de su tejido de origen (Somoza *et al.*, 2014; Wyles *et al.*, 2015), adicionalmente se requiere de una comprensión detallada de las respuestas celulares ante estímulos exógenos que permitan dilucidar el control óptimo del desarrollo de tejidos para la generación de injertos en la IT para la regeneración de cartílago articular (Clause, Liu y Tobita, 2010). Por ejemplo, se ha mostrado que las MSCs derivadas de tejido adiposo, inducidas hacia linaje condrogénico, forman cartílago hialino, pero al ser obtenidas de

pacientes con obesidad mórbida, estas células presentan una mayor senescencia y una tasa de proliferación y diferenciación reducida (Diekman y Guilak, 2013). En comparación, las MSCs de medula ósea poseen mayor capacidad hacia la diferenciación condrogénica (Li *et al.*, 2015), pero no mantienen el fenotipo de cartílago hialino, ya que continúan su diferenciación hipertrófica hacia la osificación endocondral (Huang *et al.*, 2017). Además, la recolección de las muestras es invasiva e involucra procedimientos incómodos, dolorosos, lo cual dificulta su obtención (Figura 4) (Huang, Gronthos y Shi, 2009).

Por su parte, las MSCs derivadas del cartílago articular, de membrana o líquido sinovial, presentan un alto potencial condrogénico y mantenimiento prologando del fenotipo de cartílago hialino al compararlas con MSCs de otras fuentes.

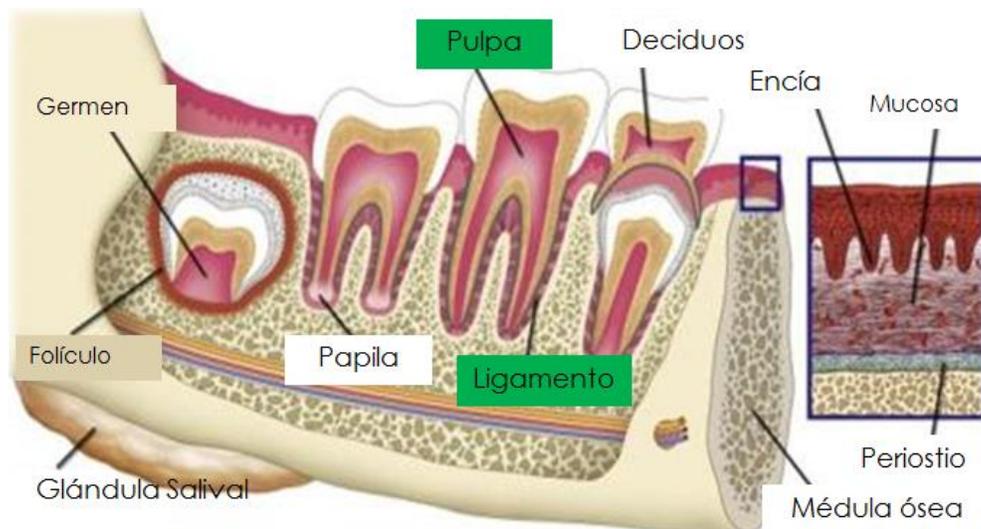


Figura 5. Fuentes bucales de células troncales mesenquimales. Representación esquemática de los tejidos bucales utilizados como fuentes alternas para el aislamiento de MSCs. En color verde se representan los tejidos utilizados para este trabajo, pulpa y ligamento.

Esto último podría posicionarlas como las células ideales para el tratamiento de la OA; sin embargo, el alto requerimiento clínico de células para la IT representa un problema, debido a la baja celularidad de estas estructuras articulares (Huang *et al.*, 2017).

Por todo lo anterior se ha continuado en la búsqueda de fuentes alternativas y una opción viable son los tejidos bucales (Huang, Gronthos y Shi, 2009). El estudio de estos tejidos comenzó con la pulpa dental, logrando establecer una analogía con las MSCs de medula ósea, ya que se encontraron colonias clonogénicas multipotentes con la misma capacidad de autorenovación y diferenciación (Jesús y Orta, 2011). Actualmente, las MSCs se han identificado en otros tejidos, como pulpa dental de dientes temporales exfoliados, ligamento periodontal, papila dental, folículo dental (Morsczeck *et al.*, 2008; Huang, Gronthos y Shi, 2009) y mucosa oral (Zhang *et al.*, 2012). Muchos de estos tejidos se consideran como un residuo médico, sin ningún tipo de repercusión ética (Ding *et al.*, 2010; Morales Navarro, 2014);

En este estudio se eligió comparar entre dos tejidos bucales, pulpa dental y ligamento periodontal como fuentes de MSCs.

3. JUSTIFICACIÓN

La osteoartritis es una enfermedad crónico-degenerativa para la cual existen limitadas terapias preventivas, no puede detenerse, retrasarse o regenerar el cartílago dañado.

Una estrategia potencialmente favorable es el empleo de MSCs; sin embargo, se requiere de conocimientos básicos para elegir fuentes alternativas con capacidad de proliferación y diferenciación condrogénica para generar cartílago hialino.

4. HIPÓTESIS

Si existieran peculiaridades entre los tejidos fuente de células troncales mesenquimales, la inducción de pulpa dental y ligamento periodontal presentará diferencias en la expresión de marcadores de linaje condrogénico, de tal forma que se podrá determinar cuál de ellas tendría un mayor potencial de uso en el tratamiento de la osteoartritis.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la expresión de marcadores de linaje condrogénico de dos fuentes de células troncales mesenquimales aisladas de tejidos bucales e inducidas, como indicadores de su potencial uso en el tratamiento de la osteoartritis.

5.2 Objetivos específicos

1. Aislar y cultivar las células mesenquimales de pulpa dental y ligamento periodontal.

2. Evaluar la viabilidad y proliferación celular de ambos tejidos.
3. Fenotipificar las células obtenidas de ambos tejidos, mediante los marcadores de superficie para MSCs: CD73+ CD105+ CD105+ CD34- y CD45-.
4. Realizar la inducción tri-linaje (condrogénico, osteogénico y adipogénico) de las MSCs de ambos tejidos.
5. Evaluar, mediante marcadores específicos, la capacidad de diferenciación condrogénica de las MSCs obtenidas de ambos tejidos bucales.

6. Materiales y métodos

Este fue un estudio descriptivo en el que se obtuvieron y diferenciaron células troncales mesenquimales aisladas de pulpa dental y ligamento periodontal, estos tejidos fueron obtenidos de terceros molares de 5 pacientes (n= 5), que requerían de esas extracciones por distintos diagnósticos dentales. Para el reclutamiento de los pacientes, el investigador se entrevistó con los médicos odontólogos y se les explicó a detalle los objetivos y alcances del estudio, con el fin de extender la invitación a sus pacientes para la donación de sus terceros molares extraídos como parte de su tratamiento odontológico.

6.1. Obtención de las muestras

Las muestras se obtuvieron con el consentimiento informado y la autorización de cada paciente, enfatizando que no se haría ningún tipo de modificación en el procedimiento quirúrgico realizado por el especialista y asegurando que el uso de las piezas dentaria sería con fines dirigidos estrictamente a la investigación.

6.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes sistémicamente sanos.
- Pacientes que tengan entre 18 y 30 años.
- Sin enfermedad periodontal.
- Dientes con tejido pulpar sano.

6.1.2 Criterios de exclusión

- Pacientes menores de 18 años y mayores de 30 años.
- Erosiones, atricción, bruxismo.

6.1.3 Criterios de eliminación

- Dientes en cuya exodoncia el instrumental (elevadores) haya alterado la integridad de los tejidos dentales.
- Dientes que durante el procedimiento no sean depositados inmediatamente en solución fisiológica con antibiótico para su transporte.

Fue necesario someter este proyecto a evaluación por el comité de bioética de Salud en Seres Humanos (COBISH) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, unidad Zacatenco, el cual lo aprobó con el folio número 048/201.

6.2. Cultivos celulares

6.2.1. Procesamiento de las muestras

Los terceros molares se colocaron en los tubos con solución de transporte, cloruro de sodio al 0.9%, (Baxtr) con antibiótico/antimicótico (PAA, the cell culture company al 1%,) inmediatamente después de la extracción, para su preservación. Se etiquetaron las muestras con los datos del paciente y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

6.2.2. Generación de cultivos primarios

En condiciones estériles, en campana de flujo laminar, se seccionó la corona del diente para tener acceso a la cámara pulpar, en donde se encuentra la pulpa dental y se retiró el ligamento periodontal que rodea a las raíces dentales.

Las células se obtuvieron de cada muestra por digestión enzimática con una solución de 1 mg/ml de colagenasa tipo II (Sigma Aldrich) en DMEM bajo en glucosa (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1% de antibiótico/antimicótico (PAA, the cell culture company).

6.2.3 Cosecha y siembra de las células, generación de pases

Las células obtenidas de la digestión enzimática se expandieron en monocapa en cajas T25. El primer pase se realizó cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia. Las células se despegaron de las cajas de cultivo por digestión con la enzima TrypLE Select (Gibco). Enseguida, las células se recuperaron en tubos falcón y se centrifugaron a 430 g durante 10 minutos para obtener el botón celular. Las células fueron resuspendidas en medio fresco y sembradas una caja T25 cm², y se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar (a 37°C y 5% de CO₂).

Los cultivos se observaron periódicamente en un microscopio óptico invertido (OLYMPUS CKX31). Cada tres días se realizaron los cambios de medio de cultivo hasta alcanzar nuevamente una confluencia del 80% y entonces se realizó un segundo y tercer pase. Del tercer pase se sembraron cuatro cajas T25 cm², y cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se realizó

el cuarto pase en el cual se realizó conteo celular con azul de tripán en cámara de Neubauer y fueron sembradas en los pozos de cultivo dependiendo del número requerido de células como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Siembra de células MSCs para cada una de las pruebas realizadas

Ensayo	Placa de pocillos para sembrado	Numero de células por pozo
Viabilidad por MTT	96	1000
Inmunocaracterización por citometría de flujo	6	100000
Inmunocaracterización por microscopia de epifluorescencia	24 (en cubreobjetos redondos)	1000
Inducción tri-linaje	24	1000
Inducción exclusiva a linaje condrogénico para microscopio de epifluorescencia	24 (en cubreobjetos redondos)	1000
Inducción exclusiva a linaje condrogénico para pruebas de PCR	12	5000

6.3. Ensayo de viabilidad y proliferación

El ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), es una prueba colorimétrica basada en la actividad de las oxidorreductasas celulares dependientes de NAD(P)H. En condiciones definidas, las células que respiran activamente convierten las sales de tetrazolio (de color amarillo), a formazán (de color púrpura) insoluble, el cual es solubilizado y su concentración se puede determinar por densidad óptica. La

cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para determinar su proliferación, se sembraron 1000 células obtenidas de pulpa y ligamento por pozo de las MSCs en 3 placas de 96 pozos. En los días de cultivo 3, 7 y 10 días de cultivo se realizó el ensayo de MTT siguiendo el protocolo del fabricante (Tetrazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma Aldrich). A los días indicados se agregó en cada pozo MTT a una concentración de 5 mg/ml de PBS, en una proporción del 1:10 respecto al volumen total del medio para cada pozo. La reacción se cubrió de la luz y se incubó por 4 horas bajo condiciones de cultivo estándar. Pasado este tiempo se agregaron 100 µl de DMSO para solubilizar los cristales y se realizó la lectura de la densidad óptica en un espectrofotómetro (Biotek Elx808) a una longitud de onda de 570 nm, con sustracción de fondo a 630 nm. Se realizaron 3 experimentos independientes cada uno por cuadruplicado.

6.4. Caracterización de las MSCs

6.4.1. Citometría de flujo

Para la caracterización de las MSCs, se utilizaron los siguientes anticuerpos acoplados a fluoróforos: CD90-FITC, CD73-PECY7, CD105-VB421, CD34-PE y CD45-VB500. Las células de pulpa y ligamento se cosecharon de acuerdo con lo descrito con la tabla 1 (80-90% de confluencia) y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron a 400 g, el botón celular se lavó con PBS-SFB al 2% y se centrifugaron nuevamente a 460 g a 25 °C durante 5 minutos. El botón celular se resuspendió en un volumen de 400 µl de PBS-SFB al 2%, se agregaron, sin diluciones, 0.3 µl de cada uno de los anticuerpos, se dejó incubando

durante 15 min a temperatura ambiente y se realizó la lectura utilizando el citómetro de flujo *CytoFLEX LX* (BRVYNI), seleccionando los filtros correspondientes para la detección de cada uno de los fluorocromos. Se capturaron 20000 eventos para cada muestra. Las células de cada uno de los pacientes, sin anticuerpos acoplados, fueron utilizadas como controles.

6.4.2. Inmunofluorescencia

Se sembraron 1000 células en placas de 24 pozos sobre cubreobjetos previamente esterilizados; a las 24 horas las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3.7% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se permeabilizaron con Tritón X-100 al 3% y después de 3 lavados de 5 minutos con PBS de 5 minutos y se bloquearon por una hora con 1% de BSA y 0.025% en PBS. Para detectar cada una de las proteínas de superficie, se utilizaron los anticuerpos primarios monoclonales de ratón: Thy-1 (CD90), CD73, Endoglin (CD105), HCAM (CD45) y CD34, diluidos 1:40 en solución bloqueadora. Después de incubar durante toda la noche a 4°C la señal se reveló con el anticuerpo secundario FITC-anti-ratón diluido en solución bloqueadora (1:100) e incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron utilizando DAPI (1 µg/ml). Posteriormente los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con 4 µL de Vectashield (Vector Laboratories). Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia con el objetivo 40x (ZEISS HXP 120 C) y las imágenes se obtuvieron con una cámara acoplada al microscopio y analizados con el Software ZEN LITE 2012 (*Software from ZEISS Microscopy*).

6.5. Ensayo de diferenciación tri-linaje de las MSCs

El potencial de diferenciación se determinó con la incubación del cultivo a medios comerciales inductores específicos:

- **Inductor adipogénico:** *MesenCult™ Adipogenic Differentiation Medium (Human), Stem cell technologies.*
- **Inductor osteogénico:** *MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Kit (Human), Stem Cell, technologies.*
- **Inductor condrogénico:** *MesenCult™-ACF Chondrogenic Differentiation Medium, Stem cell technologies.*

Los cultivos celulares se mantuvieron en su respectivo medio inductor por 21 días y sus respectivos controles se mantuvieron con medio DMEM bajo en glucosa. Los medios se cambiaron cada 3 días y al término del cultivo se evaluaron los fenotipos adquiridos mediante tinciones específicas.

6.5.1. Evaluación de linaje adipogénico

Para comprobar la inducción hacia el linaje adipogénico se utilizó el aceite rojo (*Oil Red O*, Sigma Aldrich), que permite detectar vesículas lipídicas y triglicéridos, característicos de los adipocitos. La solución *stock* se realizó a una concentración de 300 mg/100 ml de isopropanol (Sigma Aldrich) al 99%, de la cual se tomaron 30 ml y se añadieron 20 ml de agua Mili Q para la solución de trabajo.

Los cultivos en pozos de 24 se fijaron con formalina neutra (Sigma Aldrich) al 10% durante 30 minutos y se lavaron con agua mili Q y enseguida se agregaron 2 ml de isopropanol al 60% durante 5

minutos a temperatura ambiente y se tiñeron con la solución de trabajo de aceite rojo durante 30 minutos. Después se enjuagaron con agua de grifo hasta que salió limpia y se mantuvieron con agua destilada hasta que estuvieron listas para ser observadas al microscopio.

6.5.2. Evaluación de linaje osteogénico

Para evaluar la inducción a linaje adipogénico se utilizó el Rojo de alizarina (*Alizarin Red S*, Sigma Aldrich) para detectar depósitos cálcicos, propios de una matriz extracelular calcificada de linaje osteogénico. Los cultivos inducidos se fijaron con paraformaldehído al 3.7%.

Las células se incubaron durante 1 hora con rojo de alizarina (1 g/ml) en agua destilada. Posteriormente se enjuagó con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante y enseguida las células se visualizaron bajo el microscopio óptico invertido (Leica DMi1) para obtener las imágenes.

6.5.3. Evaluación de linaje condrogénico

Para evaluar el linaje condrogénico, las células inducidas se tiñeron con azul alciano (*Alcian Blue 8GX*, Sigma Aldrich) y safranina O (*Safranin O*, Sigma Aldrich). Ambos colorantes se unen por carga a glucosaminoglicanos, que son de los principales componentes del cartílago hialino. Para esta prueba los cultivos inducidos se fijaron con formalina neutra al 10%.

6.5.3.1. Azul alciano

Las células diferenciadas en cultivo a linaje condrogénico se tiñeron por 1 hora con una solución del colorante azul alciano a una concentración de 50 mg/ml, en ácido acético glacial al 3%, pH de 2.5. Posteriormente el exceso de colorante se enjuago con ácido acético (J.T. Baker) al 3%. Finalmente, las células se visualizaron en microscopio óptico invertido (Leica DMI1) para adquirir las imágenes.

6.5.3.2 Safranina O

Las células diferenciadas se tiñeron por 30 minutos con el colorante safranina O a una concentración de 100 mg/ml en agua destilada. Posteriormente se realizaron breves enjuagues con agua destilada, hasta eliminar el exceso de colorante y finalmente las células se visualizaron en un microscopio óptico invertido (Leica DMI1) para adquirir las imágenes.

6.6. Ensayo de RT-PCR de células inducidas a linaje condrogénico

El RNA de los cultivos inducidos se extrajo con el reactivo TRI REAGENT (Sigma Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA purificado se cuantificó en un NANODROP 2000 (ThermoScientific). Se utilizó 1 µg de ARN y se retrotranscribió a cDNA, usando un iniciador random 250 ng (Invitrogen) y la transcriptasa reversa (*revertAid H Minus Reverse Transcriptase*, Thermo Scientific) en un termociclador a 42°C grados por 1 hora (Applied Biosystems). El cDNA (1µl) se tomó como plantilla para amplificar por PCR los cDNAs de colágeno tipo II y SOX-9, y el

ARN ribosomal 18s (rRNA 18s), utilizando 20 pmol x microlitro de los iniciadores respectivos y 500 U (5 U/ μ l) de la taq polimerasa recombinante (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Applied biosystems). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Los productos de PCR se observaron un transiluminador de luz ultravioleta (T1202 Sigma) y se capturaron las imágenes con una cámara Kodak EDAS 290. Las bandas se analizaron por densitometría con el software IMAGE J. La cantidad de cada producto de PCR se normalizó con el producto del ARN ribosomal 18s en cada muestra.

Tabla 2. Secuencias de Oligos utilizados

Oligos	Tamaño (pb)	TM	Ciclos
Colágeno tipo II reverse: TGGACAGCAGGCGTAGGAAG Colágeno tipo II forward: TGCCCACTCAAGTCCCTCAAC	380	66	35
SOX-9 reverse: AAGTCGATAGGGGGCTGTCT SOX-9 forward: AGGAAGTCGGTGAAGAACGG	275	64	35
18S rRNA forward: GGACAGGATTGACAGATTGATAG 18S rRNA reverse: CTCGTCGTTATCGGAATTAAC	101	60	15

6.7. Ensayo de inmunofluorescencia de células inducidas a linaje condrogénico

Los marcadores para evaluar el fenotipo de linaje condrogénico adquirido por las MSCs de ambos tejidos, fueron colágeno tipo II, uno de sus componentes principales; y SOX-9, un factor de transcripción que actúa durante la diferenciación de los condrocitos. Las células para este ensayo se crecieron en cubreobjetos en placas de 24 pozos. Posterior a la inducción, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3.7% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se permeabilizaron por 5 minutos a temperatura ambiente con PBS tritón X-100 al 0.3 % y se procedió a colocar solución bloqueadora de BSA al 0.2 % y Tritón X-100 al 0.01% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para evaluar la expresión de marcadores específicos de cartílago hialino se utilizaron los anticuerpos primarios ratón anti colágeno tipo II (hecho en ratón) y conejo anti SOX-9 (hecho en conejo) (Santa Cruz), diluidos en solución bloqueadora (1:60), e incubando durante toda la noche a 4°C. La señal específica se reveló con los anticuerpos secundarios FITC anti-ratón (1:80) y *Alexa 488* anti-conejo (1:80), respectivamente, diluidos en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y los núcleos se tiñeron utilizando DAPI 1 µg/ml. Los cubreobjetos se montaron sobre porta objetos con 4 µL de Vectashield. Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia objetivo 40x en microscopio ZEISS SCOPE.A1 (Software ZEN LITE 2012).

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento de las MSCs de pulpa dental y ligamento periodontal

Se logró la obtención de cultivos primarios de los 5 sujetos (n= 5), de cada uno se aisló tanto pulpa dental, como ligamento periodontal, donde se observaron células de morfología fibroblastoide y adherentes al plástico en condiciones de cultivo estándar (figura 6).

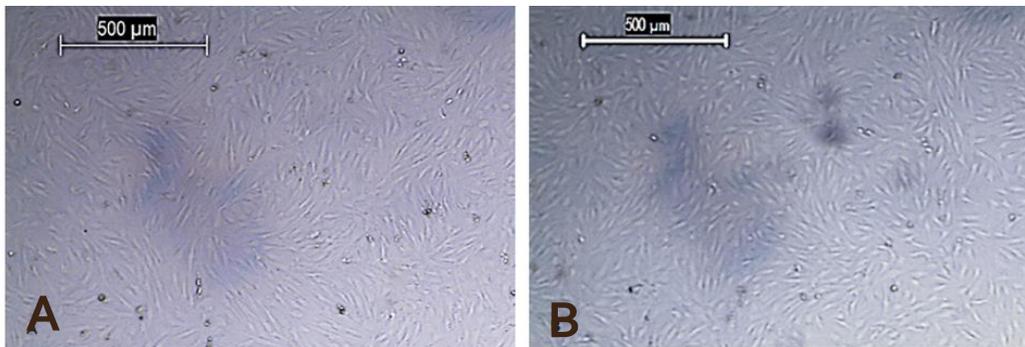


Figura 6. Cultivos primarios de MSCs. Cultivos primarios de pulpa dental (A) y ligamento periodontal (B) después de 7 días de la obtención de las células mediante digestión enzimática de los tejidos bucales. Imagen representativa de 5 cultivos primarios obtenidos de dos diferentes tejidos.

7.2 Proliferación de las células obtenidas de pulpa dental y ligamento periodontal

El ensayo de MTT mostró que las células aisladas del tejido pulpar presentaron mayor proliferación en comparación con las células aisladas de ligamento periodontal, con una diferencia significativa en los días 7 y 10 (figura 7).

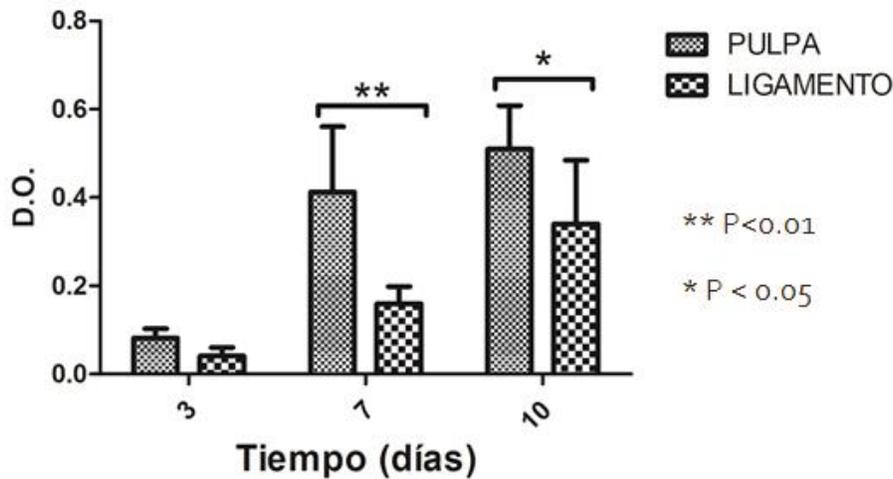


Figura 1. Proliferación de células del tejido pulpar y ligamento periodontal. El ensayo de MTT mostró que las células aisladas del tejido pulpar tienen mayor proliferación en comparación con las células aisladas de ligamento periodontal. Los datos numéricos graficados son los valores de densidades ópticas (562 nm) de la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones independientes por cuadruplicado. (Prueba de ANOVA de dos vías).

7.3. Caracterización de marcadores de superficie de las MSCs

Para la caracterización de las MSC, se analizó la presencia de los marcadores de superficie CD90, CD73, CD105, CD34 y CD45 por citometría de flujo y microscopia de epifluorescencia.

7.3.1. Fenotipificación de MSC mediante citometría de flujo

La fenotipificación de las MSC por citometría de flujo permitió identificar la expresión de las proteínas de superficie CD73, CD90 y CD105 en un porcentaje mayor al 95%, mientras que la expresión de CD34 y CD45 fue menor al 3%. Estos resultados se presentaron en todas las muestras analizadas, tanto en pulpa como en ligamento (Figura 8).

El análisis poblacional del marcaje múltiple de las MSC se realizó con el software Kaluza 2.0, permitiendo corroborar las poblaciones positivas y negativas para los marcadores de MSC en cada uno de los individuos. En la figura 9 se muestran los resultados representativos de la caracterización de las MSC en pulpa dental de un paciente.

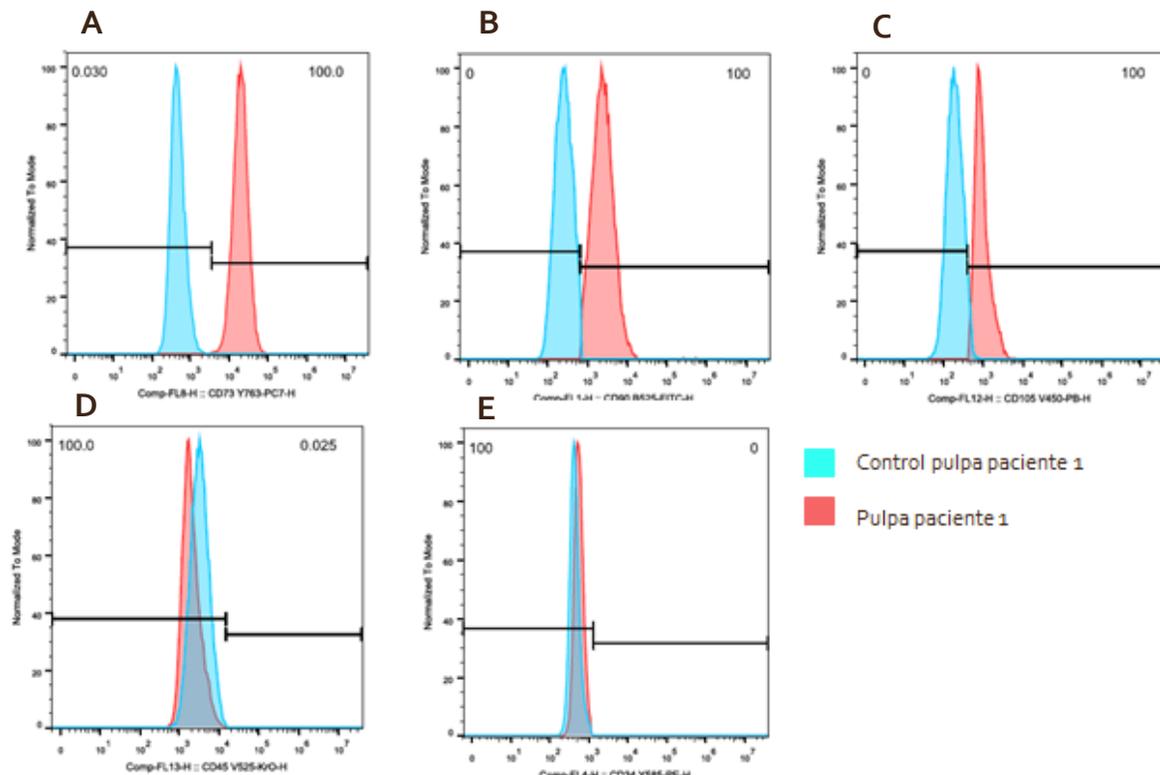


Figura 2. Histogramas de citometría de flujo de MSCs de pulpa dental. Representación del análisis por citometría de flujo de un individuo que muestra la presencia de los marcadores de superficie A) CD73, B) CD90 y C) CD105, con un porcentaje mayor del 95%; y la ausencia de los marcadores D) CD 34 y E) CD45, con un porcentaje menor al del 3%. Se obtuvo el mismo resultado en todos los pacientes (ANEXOS). El análisis de los resultados se realizó con el software FlowJo V10.

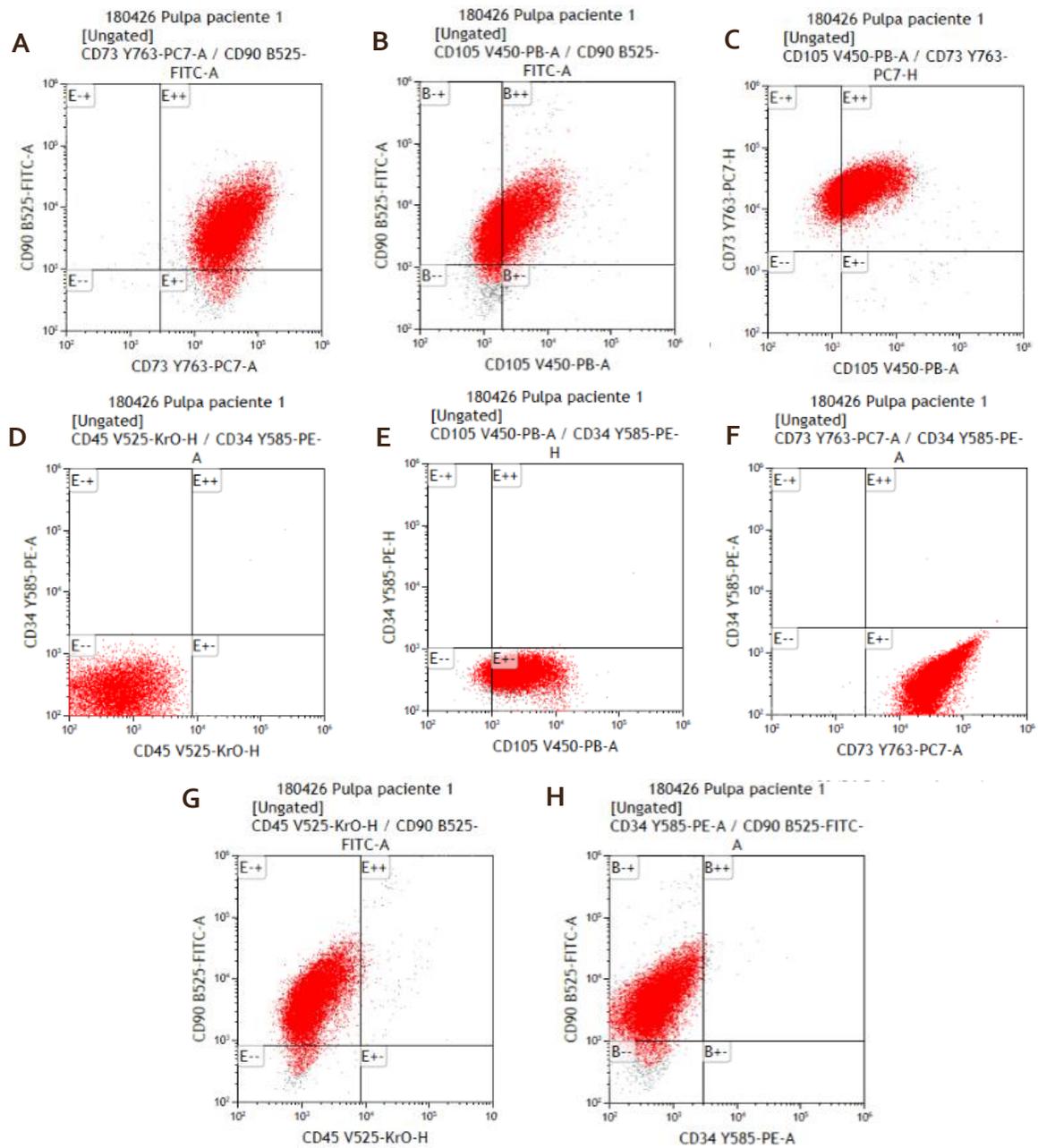


Figura 3. Gráfico de puntos (dotplot) de citometría de flujo de las MSCs. Gráfico DotPlot representativo del tejido pulpar de un individuo. Se muestran las poblaciones doble positivas para los marcadores CD73, CD90 y CD105 (A, B, C); doble negativas para CD34 y CD45 (E) y sus combinaciones (E, F, G, H). Los límites para cada una de las poblaciones de determinar respecto al control de cada individuo.

7.3.2. Fenotipificación de MSC mediante microscopía de epifluorescencia

La caracterización de las MSC por microscopía de epifluorescencia para demostrar solo cualitativamente la presencia de los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, y la ausencia de los marcadores CD34 y CD45 teñidos en verde (Figura 10).

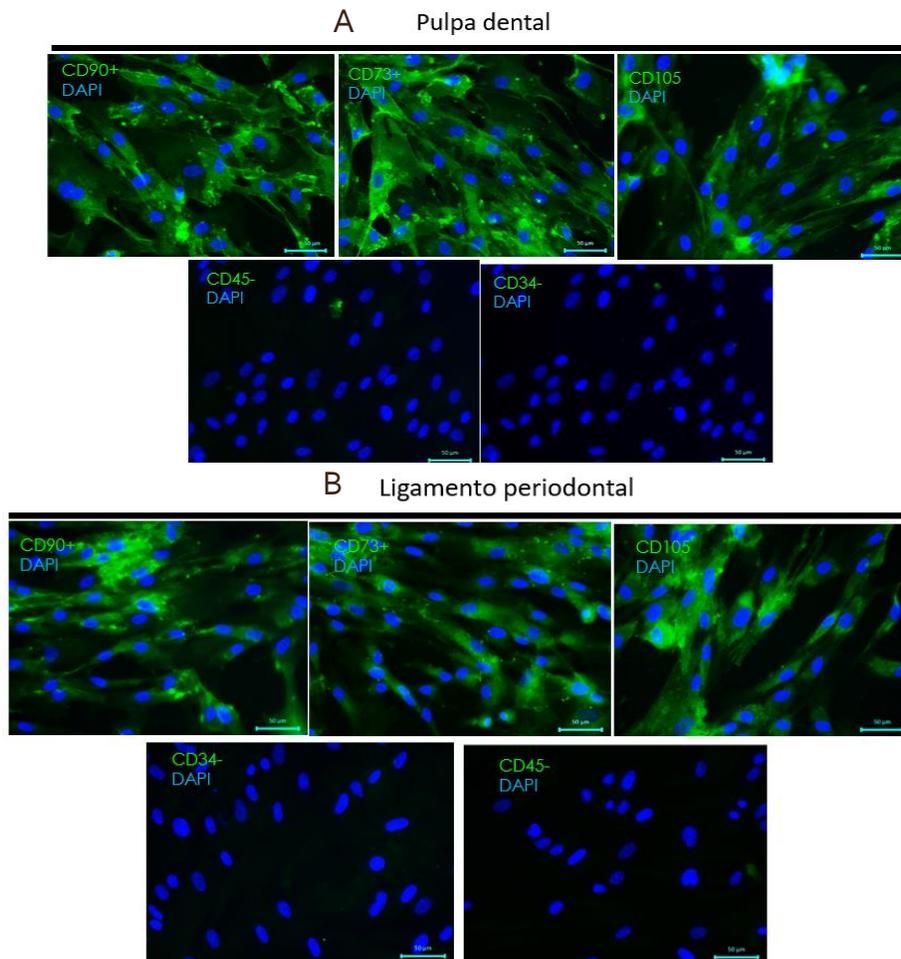


Figura 4. Caracterización de MSC por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencias de células obtenidas de pulpa dental (A), y de ligamento periodontal (B), de un mismo individuo. Ambos tejidos fueron positivos para los marcadores CD73, CD90 y CD105 de MSC observadas en verde (FITC) y negativas para los marcadores CD34 y CD45. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

Al igual que los resultados obtenidos por citometría de flujo, los resultados obtenidos por inmunofluorescencia se presentaron en los cinco individuos.

7.4. Evaluación de diferenciación tri-linaje

Para validar la adquisición de los tres diferentes fenotipos, adipogénico, osteogénico y condrogénico, se obtuvieron imágenes mediante microscopia de luz de las diferentes tinciones a las que se sometieron los cultivos con medios inductores.

7.4.1. Inducción a linaje adipogénico

La inducción de las células de pulpa dental y ligamento periodontal hacia el linaje adipogénico se corroboró mediante la tinción con aceite rojo (figura 11).

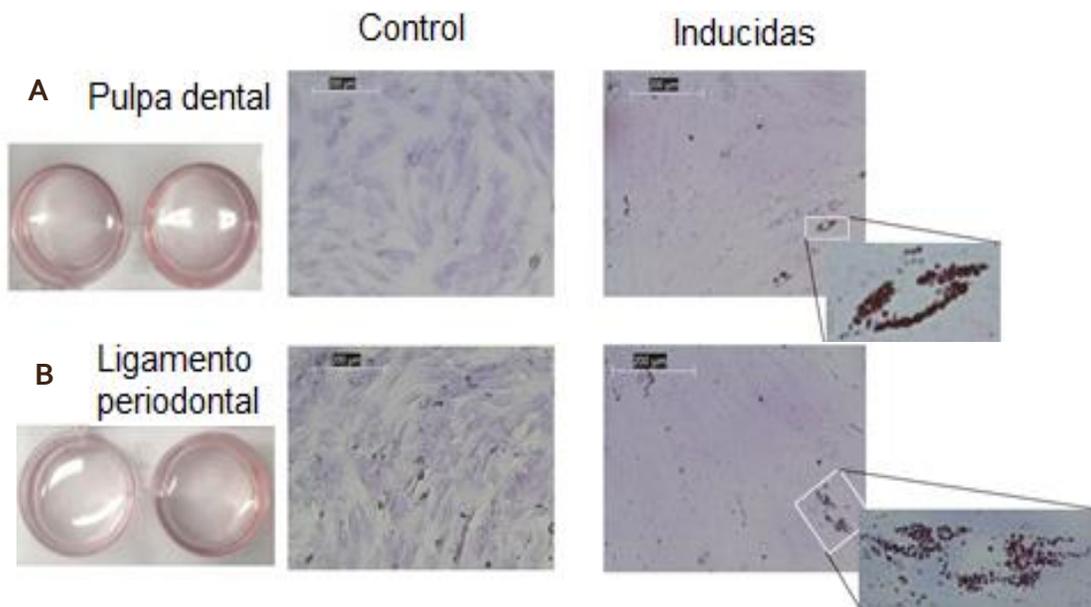


Figura 5. Inducción a linaje adipogénico y tinción con aceite rojo. Las células de pulpa dental (A) y de ligamento periodontal (B) presentaron pequeñas vesículas teñidas de rojo (recuadros amplificados), correspondientes a los lípidos propios de células de linaje adipogénico.

No se observaron cambios macroscópicos en los pozos teñidos, sin embargo, microscópicamente se logran observar pequeñas vesículas teñidas de rojo, correspondientes a los lípidos propios de células de linaje adipogénico. El fenotipo de adipogénico adquirido no se presentó en las células control, sin medio inductor. En la figura 11 se muestra una imagen representativa de la tinción con aceite rojo. Estos resultados se presentaron en ambos tejidos de los 5 pacientes

7.4.2. Inducción a linaje osteogénico

La inducción de las células de pulpa dental y ligamento periodontal hacia el linaje osteogénico se corroboró mediante la tinción con rojo de alizarina.

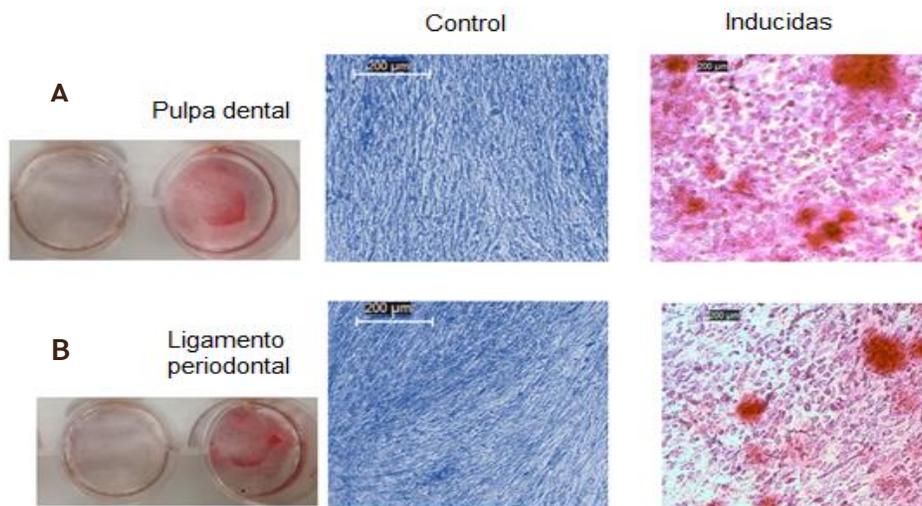


Figura 6. Inducción a linaje osteogénico y tinción con rojo de alizarina. Las células de pulpa dental (A) y de ligamento periodontal (B) inducidas a linaje osteogénico, presentaron una fuerte tinción de rojo de alizarina, además de cúmulos cálcicos propios de la matriz extracelular calcificada. Imágenes representativas de ambos tejidos de un mismo individuo, cuyas células se analizaron por microscopía óptica con un aumento de 10X.

Los pozos con células inducidas a linaje osteogénico presentaron una fuerte tinción con rojo alizarina en comparación con los pozos control. A nivel microscópico se observaron cúmulos cálcicos propios de la matriz extracelular, los cuales no se hicieron presentes en las células que carecían del medio inductor. Ambos tejidos inducidos mostraron las características propias del fenotipo osteogénico, mientras que en las células control, ambos tejidos carecían de estas características (figura 12).

7.4.3 Inducción a linaje condrogénico

La inducción de las células de pulpa dental y ligamento periodontal hacia el linaje condrogénico se corroboró mediante la tinción con azul alciano y safranina O, ambas tinciones tienen la propiedad de teñir glucosaminoglicanos, siendo los componentes característicos del cartílago articular.

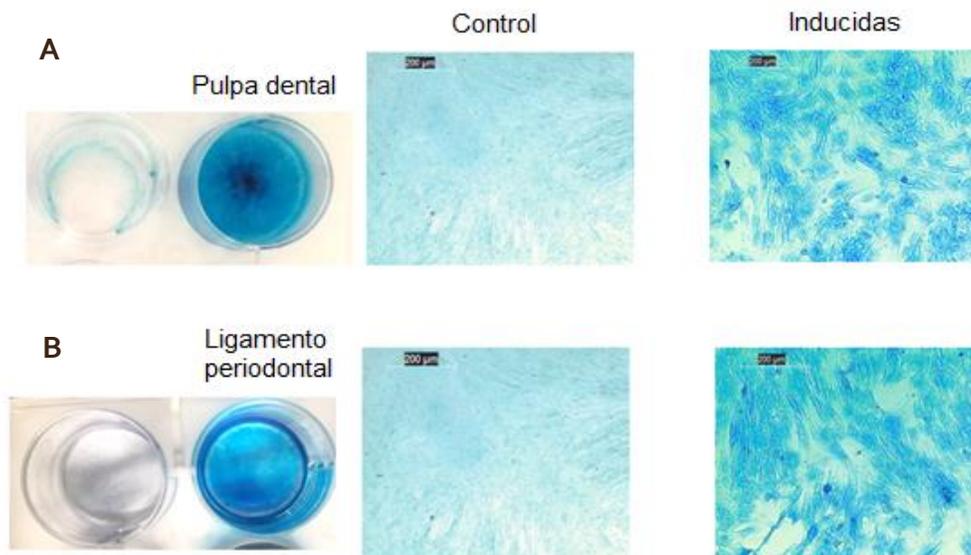


Figura 13. Inducción a linaje condrogénico y tinción con azul alciano. La tinción con azul alciano de Las células de pulpa dental (A) y de ligamento periodontal (B) se hizo presente únicamente en las células inducidas hacia linaje condrogénico.

Las células de ambos tejidos inducidas a linaje condrogénico, presentaron una coloración azul intenso con el azul alciano y una coloración roja con safranina O (figuras 13 y 14).

Estos resultados muestran las características fenotípicas del linaje condrogénico, mientras que en las células control, ambos tejidos carecieron de ambas tinciones. Este comportamiento fue el mismo para ambos tejidos en los 5 individuos en estudio.

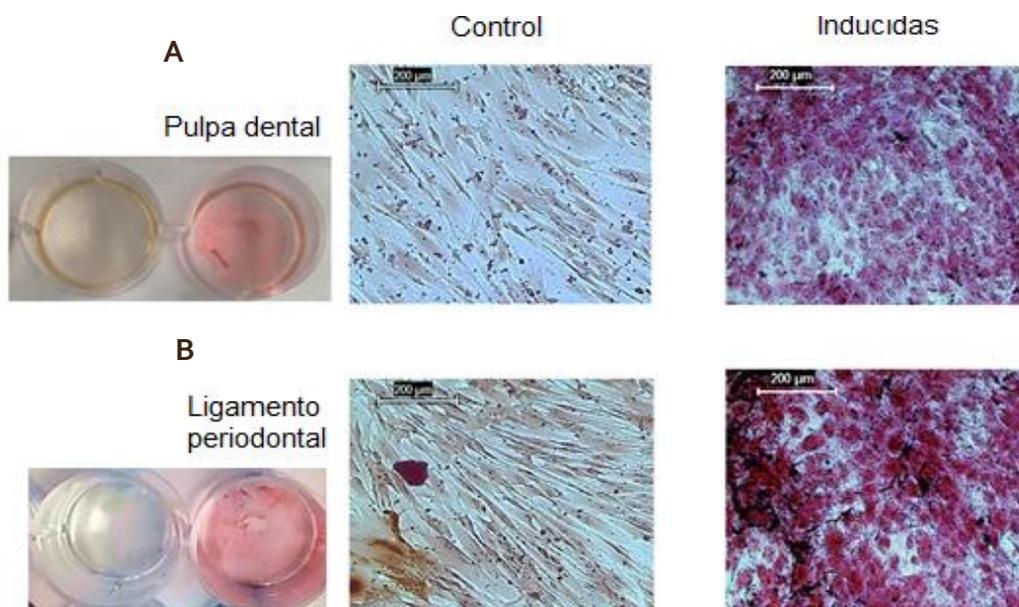


Figura 14. Inducción a linaje condrogénico y tinción con Safranina O. La tinción con Safranina O de Las células de pulpa dental (A) y de ligamento periodontal (B) se hizo presente únicamente en las células inducidas hacia linaje condrogénico. Imágenes representativas de ambos tejidos de un mismo individuo, cuyas células se analizaron por microscopía óptica con un aumento de 10X

7.5. Evaluación de la expresión de colágeno tipo II y SOX-9 como marcadores específicos para cartílago hialino

Para el linaje condrogénico, además de las tinciones con azul alciano y safranina O, se realizaron inducciones adicionales con el fin de analizar la expresión de marcadores específicos de condrocitos.

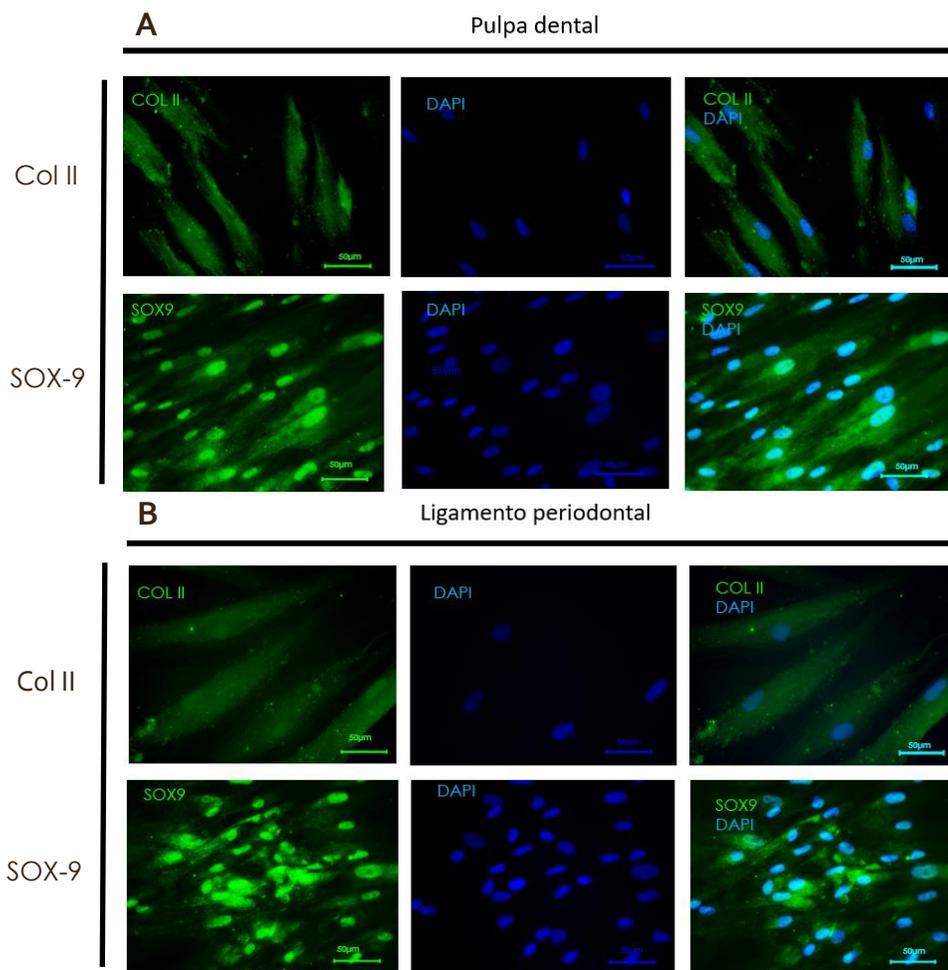


Figura 15. Marcadores de condrocitos por microscopía de epifluorescencia. Los marcadores, colágeno tipo II (Col II) y SOX-9, fueron detectados por ensayos de Inmunofluorescencias en pulpa dental (A) y ligamento periodontal (B). Imágenes representativas de ambos tejidos de un mismo individuo, cuyas células se analizaron por microscopía óptica con un aumento de 10X.

7.5.1. Mediante microscopia de epifluorescencia

Los marcadores de colágeno tipo II y SOX-9 estuvieron presentes en los ensayos de inmunofluorescencia, tanto en pulpa dental como en ligamento periodontal, en los cinco cultivos inducidos al linaje condrogénico (figura 15). Los controles no expresaron estos marcadores.

7.5.2. Mediante RT-PCR

Se analizaron mediante RT-PCR, las MSC diferenciadas a linaje condrogénico de cada uno de los individuos, utilizando un grupo control de MSC indiferenciadas (Figura 16). Las relaciones entre la expresión y el valor de densidades ópticas (OD) del ribosomal 18s fueron graficadas (Figura 17).

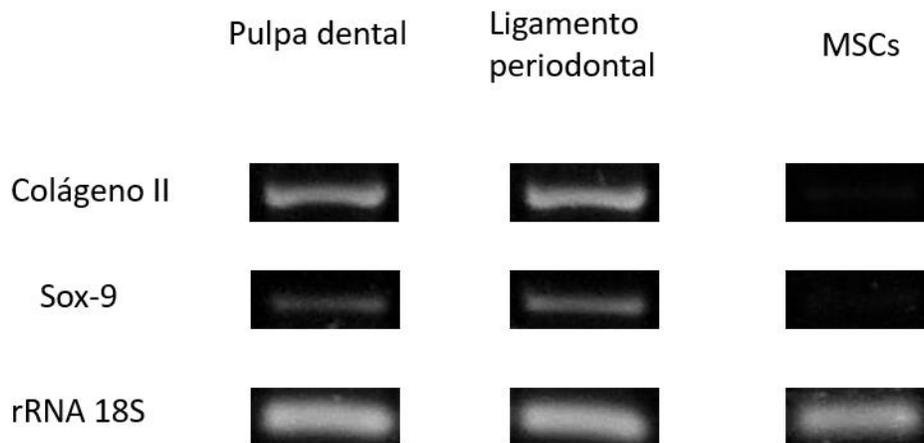


Figura 16. Expresión de RNA mensajero por RT-PCR de marcadores de linaje condrogénico. Los marcadores, colágeno tipo II y SOX-9, fueron detectados por ensayos de RT-PCR en pulpa dental y ligamento periodontal, utilizando como control MSCs indiferenciadas, las cuales no expresan dichos marcadores.

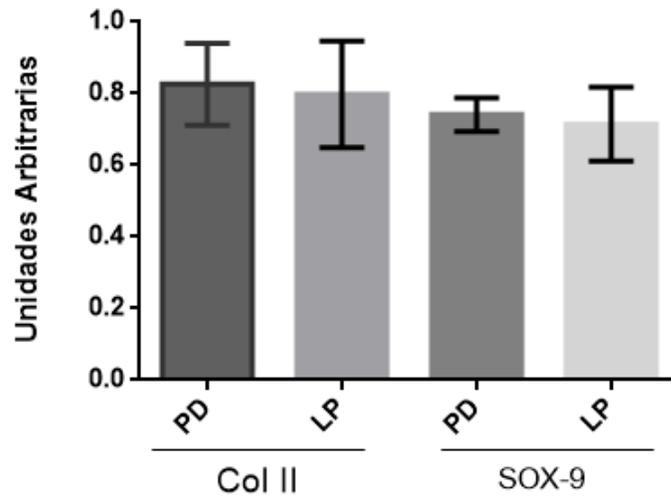


Figura 17. Densitometría de ensayo de RT-PCR. El análisis semicuantitativo de los marcadores de linaje condrogénico colágeno tipo II y SOX-9, demostrando el fenotipo adquirida por las MSCs inducidas, tanto de pulpa dental (PD) como de ligamento periodontal (LP), sin diferencias significativas.

8. DISCUSIÓN

El cartílago articular es un tejido altamente especializado que presenta una capacidad de renovación limitada debido a la baja cantidad del único tipo de células que lo constituyen, los condrocitos (Sophia Fox, Bedi y Rodeo, 2009). Este tejido esta encargado de cubrir la parte final de los huesos para amortiguar la fricción producida por fuerzas mecánicas, las cuales son absorbidas por su matriz extracelular, debido a las propiedades bioquímicas otorgadas por sus principales componentes; proteoglicanos, glucosaminoglicanos, ácido hialurónico y colágeno tipo II (Madry, Luyten y Facchini, 2012). La destrucción del cartílago articular puede desencadenar el desarrollo de osteoartritis (Robinson *et al.*, 2016), patología que puede llegar a

ser incapacitante y ante la cual no se tienen estrategias terapéuticas eficaces (Lee y Wang, 2017).

La IT es una disciplina que aplica los principios de la biología con el objetivo de comprender las relaciones entre estructura y función de los tejidos para desarrollar sustitutos viables que permitan mejorar, mantener o reemplazar tejidos y órganos dañados (Meyer, 2009; Olson, Atala y Yoo, 2011), para lo cual se requiere el uso de células que tengan la capacidad de desarrollar funciones específicas. En este sentido, se ha elegido el empleo de MSCs, un grupo heterogéneo de células con gran capacidad de proliferación y multipotencialidad de diferenciación (Rosenbaum, Grande y Dines, 2008; Ullah, Subbarao y Rho, 2015), con diversas aplicaciones (Scott *et al.*, 2011; Kim y Cho, 2013). Sin embargo, todavía se requiere de una amplia investigación básica y clínica para apoyar sus ventajas, conocer limitaciones e indagar sobre la bioseguridad de su uso (Somal *et al.*, 2016; Yubo *et al.*, 2017).

Existe evidencia de que la elección de la fuente de MSCs juega un papel importante debido a las características del tejido de origen, posiblemente asociado a su destino funcional final (Huang *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2014). Esto es relevante ya que actualmente las fuentes de elección para la terapia celular empleada en el tratamiento de la osteoartritis se han centrado en la obtención de MSCs de médula ósea y de tejido adiposo (Kong *et al.*, 2017; Lee y Wang, 2017), sin embargo, estos estudios no proporcionan evidencia sobre la restauración ni regeneración efectiva del cartílago hialino (Somoza *et al.*, 2014; Lee y Wang, 2017).

Por lo anterior, se han buscado fuentes alternativas de MSCs, como las de tejidos bucales, las cuales además de tener una amplia gama de tejidos para su aislamiento (Sanz, Carrión y Chaparro, 2015), son relativamente de fácil acceso (Huang, Gronthos y Shi, 2009). En este trabajo nos enfocamos en las MSCs aisladas de pulpa dental y ligamento periodontal. La pulpa dental es un tejido localizado en la cavidad central de cada diente con la función de brindarle vitalidad al mismo, las MSCs de este tejido fueron las primeras descritas de tejidos bucales (Gronthos *et al.*, 2000) y se eligieron por su extenso estudio en la IT y medicina regenerativa (Ledesma-Martínez, Mendoza-Núñez y Santiago-Osorio, 2016).

Por otra parte, el ligamento periodontal, un tejido que rodea a los dientes en el que también se ha descrito la presencia de MSCs (Seo *et al.*, 2004), se eligió por estar conformado por un conjunto de fibras colágenas, elásticas, oxitalánicas, elauninas y reticulares con la principal función de proteger al diente y de amortiguar las fuerzas de masticación, las cuales que pueden llegar a ser de hasta 74 kilogramos de presión (Galvéz Vera María, Velosa Porras y Gutierrez Pérez, 2016). Por lo tanto, el ligamento periodontal se eligió debido a la semejanza con el cartílago articular en su función y protección de amortiguamiento.

Con este estudio se busca generar información sobre la calidad y efectividad del cartílago que se desea regenerar. En función de esto se estableció el objetivo de evaluar la expresión de marcadores de linaje condrogénico, que nos indiquen su potencial uso en el tratamiento de la osteoartritis, para lo cual fue necesario lograr el aislamiento de las MSCs de los tejidos

completos mediante digestión enzimática (Gronthos *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2004; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2011). Nuestros resultados demostraron su fácil asilamiento (Miura *et al.*, 2003; Ledesma-Martínez, Mendoza-Núñez y Santiago-Osorio, 2016), tanto de pulpa dental como de ligamento periodontal, contrario a lo reportado por Otabe y colaboradores en el 2012, ya que el rendimiento de las células que aislaron de ligamento periodontal fue demasiado bajos, sin poder llegar a estudiarlas (Otabe *et al.*, 2012). En nuestros resultados, el crecimiento de las células aisladas fue el característico de las células troncales de tipo mesenquimal; en monocapa (Marcela *et al.*, 2010), con morfología fibroblastoide (Nombela-Arrieta, Ritz y Silberstein, 2011) y con fuerte adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar (Colter *et al.*, 2000). Enseguida se procedió a evaluar que estas células eran viables y que estaban proliferando, ya que es un punto crucial como marcador predictivo para un buen funcionamiento de los futuros tejidos a los que darán origen las MSCs (Martín Piedra, 2014). En función de esto se realizó el ensayo de MTT (Mosmann, 1983; Twentyman y Luscombe, 1987) obteniendo que ambas fuentes presentan una tasa de proliferación alta, que incluso en otros estudios se ha descrito; superan a las MSCs obtenidas de médula ósea (Gronthos *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2004; Nagatomo *et al.*, 2006; Hosoya y Nakamura, 2015; Cea-Sanhueza M. y G., 2016). En este estudio las MSCs de pulpa dental presentaron una mayor proliferación en comparación con las MSCs de ligamento periodontal, coincidiendo con lo reportado por Erdal Karaoz y colaboradores (Hakki *et al.*, 2015), y que puede ser una ventaja para obtener

mayor cantidad de MSCs en un menor tiempo para las terapias regenerativas de la IT.

Enseguida se realizó la caracterización para determinar que estas células efectivamente pueden ser denominadas como troncales mesenquimales, de acuerdo con los criterios mínimos sugeridos por Domici en el año 2006 y aceptados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, que es comprobar la expresión de proteínas de superficie CD73+, CD90+ y CD105+ y la no expresión de CD34- y CD45- (Gronthos *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2013; Ullah *et al.*, 2016).

Los ensayos de inmunofluorescencia mostraron la presencia de los marcadores CD73, CD90 y CD105 y la ausencia de CD34 y CD45, al igual que en otros estudios que hicieron uso de esta técnica para la fenotipificación de las MSCs (Hermida-Gómez *et al.*, 2011). Mediante el análisis por citometría de flujo se cuantificó la expresión relativa de CD73, CD90 y CD105, con un porcentaje mayor al 95%; y la expresión relativa de CD34 y CD45, con un porcentaje menor al 3%, lo que coincide con otros estudios revisados (Atari *et al.*, sin fecha; Lv *et al.*, 2014; Kadkhoda *et al.*, 2016; Szepesi *et al.*, 2016). Nuestros resultados difieren con lo publicado por Sunyoung Choi y colaboradores, quienes reportaron la expresión del marcador CD 105 para pulpa y ligamento con un porcentaje de 84.80% y 51.54%, respectivamente. Por otra parte, la expresión del marcador CD73 reportada por este mismo grupo de investigadores, fue el único resultado que coincidió con nuestros ensayos, con un promedio del 95% en todas las muestras analizadas de los cinco donantes (Choi *et al.*, 2013). Similar a nuestro estudio, Ming Lei y

colaboradores compararon MSCs de pulpa dental y ligamento periodontal de tres adultos de edades entre 22 y 28 años; el porcentaje de expresión que obtuvieron del marcador de troncalidad CD90 fue de 64% para las MSC de pulpa y 44.3% para las de ligamento periodontal; mientras que el porcentaje de expresión de CD105 fue de 82.3% para MSCs de pulpa y de 51.9% para las MSCs de ligamento periodontal (Lei *et al.*, 2014). Las diferencias en los resultados de ambos estudios probablemente se deban al grupo de edad de los pacientes seleccionados, información que no fue reportada por Choi (Choi *et al.*, 2013). A pesar de estas diferencias, nuestro trabajo coincide en su mayoría con otros autores, por ejemplo, Santamaría y colaboradores reportaron que más del 97% de las células MSCs de ligamento periodontal, obtenidas de cuatro molares de dos mujeres y dos hombres, expresaron los marcadores positivos de troncalidad CD73 CD90 CD105, mientras que los marcadores CD34 CD45, fueron negativos (Santamaría *et al.*, 2017).

Otro estudio en donde se compararon las MSCs de pulpa dental con las de ligamento periodontal, reportó porcentajes de 97.62% y 95.47% para el marcador CD73; 98.23% y 95.83% para el marcador CD90; y 93.54% y 6.13% para el marcador CD105 en las MSCs de pulpa dental y ligamento periodontal, respectivamente. Al igual que en nuestro estudio, las muestras fueron obtenidas de terceros molares de sujetos de 17 a 28 años de edad (Vasandan *et al.*, 2014), lo cual nos indica que sería interesante evaluar en futuras investigaciones además de las edades, la posición de los dientes en boca y si son maxilares o mandibulares. Por último, en 2012 Otabe y colaboradores quienes reportaron expresiones altas de las moléculas CD73 y CD90 por arriba del 95% en MSCs de

ambos tejidos, sin embargo, los valores para CD105 fueron bajos, los autores atribuyen que este marcador es endodermal (endoglina) y el origen de las piezas dentales es ectomesenquimal. Al igual que en nuestros resultados, reportan los rangos para CD34 y CD45 por debajo del 3% (Otabe *et al.*, 2012).

A manera de continuar con la caracterización de las células aisladas, se evaluó su potencial de diferenciación tri-linaje de forma exitosa, ya que en la inducción a linaje adipogénico se logró identificar la acumulación intracelular de gotas lipídicas en las MSCs inducidas, como se han identificado en otros trabajos (Fink and Zachar 2011; Pittenger *et al.* 1999). En cuanto a la capacidad de diferenciación osteogénica de MSCs dentales, para pulpa dental es ampliamente conocida su capacidad para obtener un fenotipo funcional que secreta matriz extracelular y mineralizada en abundancia (Riccio *et al.*, 2010; Teti *et al.*, 2015) y que se ha corroborado en estudios *in vivo* (Leyendecker Junior *et al.*, 2018) que confirman su capacidad para generar estructuras óseas (d'Aquino *et al.*, 2007). En el caso de ligamento periodontal se obtuvo una adecuada diferenciación osteogénica, aunque se reporta que su potencial de diferenciación hacia este fenotipo es más pobre en comparación con otras MSCs, como las de médula (Zhang *et al.*, 2014).

La diferenciación condrogénica de nuestras MSCs fue corroborada por la expresión de SOX-9, factor de transcripción responsable de la expresión de algunos de los genes clave en la

condrogénesis, y de colágeno II, componente principal de este tejido (Choi *et al.*, 2013).

A pesar de que se ha descrito la correcta diferenciación de las MSCs de pulpa dental (Zainal Ariffin *et al.*, 2012; Nemeth *et al.*, 2014) y ligamento periodontal (Choi *et al.*, 2013) hacia linaje condrogénico, el enfoque de esta investigación se centró en dilucidar cual es la mejor fuente alternativa para adquirir y mantener el fenotipo de cartílago hialino que nos permita obtener como resultado un tejido regenerado de mayor calidad. Esto con base en los estudios que muestran que las diferencias que presentan las MSCs dependiendo de la fuente de obtención (Wegmeyer *et al.*, 2013) son relevantes para el tejido o patología que se desea abordar.

En el presente estudio se utilizaron 5 muestras de distintos pacientes para evitar variaciones del donante. Los resultados, a pesar de las diferencias individuales, mostraron una variabilidad mínima entre cada uno de los pacientes.

En conjunto estos ensayos mostraron que las dos fuentes de células troncales mesenquimales aisladas de tejidos bucales, además de cumplir con los criterios de MSCs propuestos por Dominici, presentaron una alta tasa de proliferación, un alto potencial de diferenciación y una correcta inducción a linaje condrogénico.

Por lo tanto, debido a su fácil obtención y a la correcta expresión de los marcadores condrogénicos, concluimos que las células de tejidos bucales podrían ser una fuente alternativa para la obtención de MSCs para su potencial uso en el tratamiento de la

osteoartrosis. Sin embargo, para conocer cuál de estas dos fuentes es la mejor para su uso terapéutico se requerirá emplear más ensayos.

9. CONCLUSIONES

Las MSCs utilizadas en este estudio cumplieron con los tres criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para que sean consideradas células de tipo troncal mesenquimal.

Fue posible aislar MSC de pulpa dental y ligamento periodontal y en el ensayo de proliferación, las MSCs de pulpa dental presentaron mayor proliferación que las aisladas de ligamento periodontal y tanto MSC de pulpa dental como de ligamento periodontal mostraron multipotencialidad tri-linaje.

En el análisis de expresión de marcadores para linaje condrogénico, colágeno tipo II y SOX-9, las MSCs de pulpa dental y ligamento periodontal mostraron una adquisición del fenotipo de cartílago hialino evaluado mediante ensayo de inmunofluorescencia y RT-PCR analizando colágeno tipo II y SOX-9, expresándolos de forma muy similar en las células diferenciadas de ambos tejidos.

10. PERSPECTIVAS

Analizar y evaluar el mantenimiento del fenotipo de linaje condrogénico adquirido de ambas fuentes.

Analizar y evaluar las propiedades biomecánicas del tejido generado con las MSCs de ambas fuentes.

11. REFERENCIAS

- Almonte-Becerril, M. *et al.* (2010) "Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model", *Apoptosis*, 15(5), pp. 631–638. doi: 10.1007/s10495-010-0458-z.
- Arnold, W. *et al.* (2007) "Viscosupplementation: Managed care issues for osteoarthritis of the knee", *Journal of Managed Care Pharmacy*.
- Atari, M. *et al.* (sin fecha) "Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells", *Journal of Cell Science*, 125, pp. 3343–3356. doi: 10.1242/jcs.096537.
- Berebichez-Fridman, R. *et al.* (2017) "The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells—Their Current Uses and Potential Applications", *Stem Cells International*, 2017, pp. 1–14. doi: 10.1155/2017/2638305.
- Blanco, F. J. *et al.* (1998) "Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: A possible pathway for osteoarthritis pathology", *Arthritis and Rheumatism*. doi: 10.1002/1529-0131(199802)41:2<284::AID-ART12>3.0.CO;2-T.
- Buckwalter, J. A. y Mankin, H. J. (1998) "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.", *Instructional course lectures*, 47, pp. 477–86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571449> (Consultado: el 13 de julio de 2018).
- Burrage, P. S., Mix, K. S. y Brinckerhoff, C. E. (2006) "Matrix metalloproteinases: role in arthritis.", *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11, pp. 529–43. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146751> (Consultado: el 13 de julio de 2018).

Cea-Sanhueza M. y G., S.-S. (2016) "Avances en odontoestomatología.", *Avances en Odontoestomatología*. [publisher not identified], 32(2), pp. 97–105. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852016000200004 (Consultado: el 15 de julio de 2018).

Charlier, E. *et al.* (2016) "Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis.", *International journal of molecular sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 17(12). doi: 10.3390/ijms17122146.

Chen, J.-Y. *et al.* (2015) "Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(9), pp. 739–746. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.022.

Choi, S. *et al.* (2013) "Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor- β 3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar.", *International journal of oral science*. Nature Publishing Group, 5(1), pp. 7–13. doi: 10.1038/ijos.2013.19.

Cimmino, M. A. y Parodi, M. (2004) "Risk Factors for Osteoarthritis", *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. W.B. Saunders, 34(6), pp. 29–34. doi: 10.1016/J.SEMARTHRT.2004.03.009.

Clause, K. C., Liu, L. J. y Tobita, K. (2010) "Directed Stem Cell Differentiation: The Role of Physical Forces", *Cell Communication & Adhesion*, 17(2), pp. 48–54. doi: 10.3109/15419061.2010.492535.

Colter, D. C. *et al.* (2000) "Rapid expansion of recycling stem cells

in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 97(7), pp. 3213–3218. doi: 10.1073/pnas.97.7.3213.

Correia, S. I. *et al.* (2014) “Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint.”, *Journal of the Royal Society, Interface*. The Royal Society, 11(92), p. 20130784. doi: 10.1098/rsif.2013.0784.

Courties, A. y Sellam, J. (2016) “Osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus: What are the links?”, *Diabetes Research and Clinical Practice*. doi: 10.1016/j.diabres.2016.10.021.

d’Aquino, R. *et al.* (2007) “Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation”, *Cell Death & Differentiation*, 14(6), pp. 1162–1171. doi: 10.1038/sj.cdd.4402121.

Diekman, B. O. y Guilak, F. (2013) “Stem cell-based therapies for osteoarthritis”, *Current Opinion in Rheumatology*, 25(1), pp. 119–126. doi: 10.1097/BOR.0b013e32835aa28d.

Ding, G. *et al.* (2010) “Allogeneic Periodontal Ligament Stem Cell Therapy for Periodontitis in Swine”, *STEM CELLS*, 28(10), pp. 1829–1838. doi: 10.1002/stem.512.

Dominici, M. *et al.* (2006) “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”, *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.

Fink, T. y Zachar, V. (2011) “Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells”, en *Methods in molecular biology*

(Clifton, N.J.), pp. 243–251. doi: 10.1007/978-1-60761-999-4_19.

Freitag, J. et al. (2016) “Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy – a review”, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), p. 230. doi: 10.1186/s12891-016-1085-9.

Galvéz Vera María, A., Velosa Porras, J. y Gutierrez Pérez, B. (2016) “Efecto de las fuerzas oclusales sobre el periodonto analizado por elementos finitos”, *CIENCIAS BÁSICAS, BIOTECNOLOGÍA Y BIOINFORMÁTICA*.

Gronthos, S. et al. (2000) “Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), pp. 13625–13630. doi: 10.1073/pnas.240309797.

Hakki, S. S. et al. (2015) “Comparison of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Pulp and Periodontal Ligament”, *Journal of Periodontology*. Wiley-Blackwell, 86(2), pp. 283–291. doi: 10.1902/jop.2014.140257.

Hashimoto, S. et al. (1998) “Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis”, *Arthritis and Rheumatism*. doi: 10.1002/1529-0131(199809)41:9<1632::AID-ART14>3.0.CO;2-A.

Hermida-Gómez, T. et al. (2011) “Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes”, *Journal of Rheumatology*, 38(2), pp. 339–349. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/7fff/1fe0a3db36a7eb6678e123d8024cd4a10960.pdf> (Consultado: el 17 de julio de 2018).

Hosoya, A. y Nakamura, H. (2015) "Ability of stem and progenitor cells in the dental pulp to form hard tissue", *Japanese Dental Science Review*. Elsevier, 51(3), pp. 75–83. doi: 10.1016/J.JDSR.2015.03.002.

Huang, G. T.-J. *et al.* (2006) "In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments", *Cell and Tissue Research*. Springer-Verlag, 324(2), pp. 225–236. doi: 10.1007/s00441-005-0117-9.

Huang, G. T.-J., Gronthos, S. y 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), pp. 792–806. doi: 10.1177/0022034509340867.

Huang, Y.-Z. *et al.* (2017) "Mesenchymal Stem/Progenitor Cells Derived from Articular Cartilage, Synovial Membrane and Synovial Fluid for Cartilage Regeneration: Current Status and Future Perspectives", *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(5), pp. 575–586. doi: 10.1007/s12015-017-9753-1.

Jesús, L. y Orta, G. (2011) "Investigación con células madre de origen dentario . Actualización .", *Gaceta dental*.

Kadkhoda, Z. *et al.* (2016) "Assessment of Surface Markers Derived from Human Periodontal Ligament Stem Cells: An In Vitro Study.", *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*. Tehran University of Medical Sciences, 13(5), pp. 325–332. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28127326> (Consultado: el 16 de julio de 2018).

Kapoor, M. *et al.* (2011) "Role of proinflammatory cytokines in the

pathophysiology of osteoarthritis", *Nature Reviews Rheumatology*, 7(1), pp. 33–42. doi: 10.1038/nrrheum.2010.196.

Kaul, G. *et al.* (2012) "Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: a biochemical, histological and immunohistochemical analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques", *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. Springer-Verlag, 20(11), pp. 2315–2324. doi: 10.1007/s00167-011-1853-x.

Kim, N. y Cho, S.-G. (2013) "Clinical applications of mesenchymal stem cells.", *The Korean journal of internal medicine*. Korean Association of Internal Medicine, 28(4), pp. 387–402. doi: 10.3904/kjim.2013.28.4.387.

Kong, L. *et al.* (2017) "Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment", *Journal of Orthopaedic Translation*. Elsevier, 9, pp. 89–103. doi: 10.1016/J.JOT.2017.03.006.

Kouri, J. B. *et al.* (1996) "Variability in the cell phenotype of aggregates or "clones" of human osteoarthritic cartilage. A case report.", *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al.*, 20(3), pp. 191–200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9031589> (Consultado: el 13 de julio de 2018).

Kouri, J. B. *et al.* (1997) "Apoptosis in human osteoarthritic cartilage: A microscopy report", *Medical Science Research*.

Kouri, J. B. y Lavalle, C. (2006) "Do chondrocytes undergo "activation" and "transdifferentiation" during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the

ultrastructural and immunohistochemical evidence.", *Histology and histopathology*, 21(7), pp. 793–802. doi: 10.14670/HH-21.793.

Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Núñez, V. M. y Santiago-Osorio, E. (2016) "Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review.", *Stem cells international*. Hindawi Limited, 2016, p. 4709572. doi: 10.1155/2016/4709572.

Lee, W. Y. y Wang, B. (2017) "Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives", *Journal of Orthopaedic Translation*. doi: 10.1016/j.jot.2017.03.005.

Lei, M. et al. (2014) "Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation", *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.071.

Leyendecker Junior, A. et al. (2018) "The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review.", *Journal of tissue engineering*. SAGE Publications, 9, p. 2041731417752766. doi: 10.1177/2041731417752766.

Li, C. et al. (2015) "Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy", *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), p. 55. doi: 10.1186/s13287-015-0066-5.

Li, G. et al. (2013) "Subchondral bone in osteoarthritis: Insight into risk factors and microstructural changes", *Arthritis Research and Therapy*. doi: 10.1186/ar4405.

Lin, C.-S. et al. (2013) "Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges.", *Histology and histopathology*. NIH Public Access, 28(9), pp. 1109–

16. doi: 10.14670/HH-28.1109.

Lories, R. J. y Luyten, F. P. (2011) "The bone-cartilage unit in osteoarthritis", *Nature Reviews Rheumatology*. doi: 10.1038/nrrheum.2010.197.

Lützner, J. *et al.* (2009) "Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee", *Nature Reviews Rheumatology*, 5(6), pp. 309–316. doi: 10.1038/nrrheum.2009.88.

Lv, F.-J. *et al.* (2014) "Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells", *STEM CELLS*. Wiley-Blackwell, 32(6), pp. 1408–1419. doi: 10.1002/stem.1681.

Madry, H., Luyten, F. P. y Facchini, A. (2012) "Biological aspects of early osteoarthritis", *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. Springer-Verlag, 20(3), pp. 407–422. doi: 10.1007/s00167-011-1705-8.

Marcela, R.-P. P. *et al.* (2010) "Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow according to the criteria of the International Society for Cellular Therapy", *Universitas Scientiarum*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 15(3), pp. 224–239. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832010000300004 (Consultado: el 16 de julio de 2018).

Martín Piedra, M. Á. (2014) "Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de wharton como control de calidad para su uso en ingeniería tisular". Universidad de Granada, p. 1. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=58072> (Consultado: el 15 de julio de 2018).

Meyer, U. (2009) *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*. Springer.

Miura, M. *et al.* (2003) "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 100(10), pp. 5807–12. doi: 10.1073/pnas.0937635100.

Morales Navarro, D. (2014) "Aspectos generales de la medicina regenerativa en estomatología", *Revista Cubana de Estomatología*. Editorial Ciencias Médicas, 51(2), pp. 206–223.

Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072014000200009 (Consultado: el 14 de julio de 2018).

Morales, R. E. *et al.* (2013) "Reunión multidisciplinaria de expertos en diagnóstico y tratamiento de pacientes con osteoartritis. Actualización basada en evidencias", *Medicina Interna de Mexico*.

Morsczeck, C. *et al.* (2008) "Somatic stem cells for regenerative dentistry", *Clinical Oral Investigations*, 12(2), pp. 113–118. doi: 10.1007/s00784-007-0170-8.

Mosmann, T. (1983) "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.", *Journal of immunological methods*, 65(1–2), pp. 55–63. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> (Consultado: el 14 de julio de 2018).

Musumeci, G. (2017) "Functional Anatomy in Knee Osteoarthritis: Patellofemoral Joint vs. Tibiofemoral Joint", *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*. doi: 10.3390/jfmk2010008.

Nagatomo, K. *et al.* (2006) "Stem cell properties of human periodontal ligament cells", *Journal of Periodontal Research*. Wiley/Blackwell (10.1111), 41(4), pp. 303–310. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00870.x.

Nemeth, C. L. *et al.* (2014) "Enhanced Chondrogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Using Nanopatterned PEG-GelMA-HA Hydrogels", *Tissue Engineering Part A*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 20(21–22), pp. 2817–2829. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0614.

Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. y Silberstein, L. E. (2011) "The elusive nature and function of mesenchymal stem cells.", *Nature reviews. Molecular cell biology*. NIH Public Access, 12(2), pp. 126–31. doi: 10.1038/nrm3049.

Okolicsanyi, R. K. *et al.* (2015) "Human Mesenchymal Stem Cells Retain Multilineage Differentiation Capacity Including Neural Marker Expression after Extended In Vitro Expansion", *PLOS ONE*. Editado por G. Camussi. Public Library of Science, 10(9), p. e0137255. doi: 10.1371/journal.pone.0137255.

Olson, J. L., Atala, A. y Yoo, J. J. (2011) "Tissue engineering: current strategies and future directions.", *Chonnam medical journal*. Chonnam National University Medical School, 47(1), pp. 1–13. doi: 10.4068/cmj.2011.47.1.1.

Otabe, K. *et al.* (2012) "Comparison of Gingiva, Dental Pulp, and Periodontal Ligament Cells from the Standpoint of Mesenchymal Stem Cell Properties", *Cell Medicine*, 4(1), pp. 13–22. doi: 10.3727/215517912X653319.

Pittenger, M. F. *et al.* (1999) "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.", *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), pp. 143–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814> (Consultado: el 17 de julio de 2018).

Rao, M. S. y Mattson, M. P. (2001) "Stem cells and aging: expanding the possibilities.", *Mechanisms of ageing and development*, 122(7), pp. 713–34. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322994> (Consultado: el 13 de julio de 2018).

Riccio, M. *et al.* (2010) "Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures.", *European journal of histochemistry : EJH*, 54(4), p. e46. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21263745> (Consultado: el 17 de julio de 2018).

Robinson, D. L. *et al.* (2016) "Mechanical properties of normal and osteoarthritic human articular cartilage", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. Elsevier, 61, pp. 96–109. doi: 10.1016/J.JMBBM.2016.01.015.

Rodríguez-Lozano, F. J. *et al.* (2011) "Mesenchymal stem cells derived from dental tissues", *International Endodontic Journal*. Wiley/Blackwell (10.1111), 44(9), pp. 800–806. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01877.x.

Rosenbaum, A. J., Grande, D. A. y Dines, J. S. (2008) "The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment.", *Organogenesis*. Taylor & Francis, 4(1), pp. 23–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279711>

(Consultado: el 16 de julio de 2018).

Santamaría, S. *et al.* (2017) "Comparison of periodontal ligament and gingiva-derived mesenchymal stem cells for regenerative therapies", *Clinical Oral Investigations*, 21(4), pp. 1095–1102. doi: 10.1007/s00784-016-1867-3.

Santiago, G. R. A. A. *et al.* (2007) "¿Qué son las células troncales o 'células madre'? What are stem cells or 'mother cells'?", *Veterinaria México*, 38, pp. 81–104.

Sanz, A. R., Carrión, F. S. y Chaparro, A. P. (2015) "Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering", *Periodontology 2000*. doi: 10.1111/prd.12070.

Scott, M. A. *et al.* (2011) "Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells.", *Stem cells and development*. Mary Ann Liebert, Inc., 20(10), pp. 1793–804. doi: 10.1089/scd.2011.0040.

Scotti, C. *et al.* (2010) "Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), pp. 7251–7256. doi: 10.1073/pnas.1000302107.

Seo, B.-M. *et al.* (2004) "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament", *The Lancet*. Elsevier, 364(9429), pp. 149–155. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0.

Somal, A. *et al.* (2016) "A Comparative Study of Growth Kinetics, In Vitro Differentiation Potential and Molecular Characterization of Fetal Adnexa Derived Caprine Mesenchymal Stem Cells.", *PloS one*. Public Library of Science, 11(6), p. e0156821. doi:

10.1371/journal.pone.0156821.

Somoza, R. A. *et al.* (2014) "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations.", *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 20(6), pp. 596–608. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0771.

Sophia Fox, A. J., Bedi, A. y Rodeo, S. A. (2009) "The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function.", *Sports health*. SAGE Publications, 1(6), pp. 461–8. doi: 10.1177/1941738109350438.

Szepesi, Á. *et al.* (2016) "In Vitro Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Different Tissues with a Potential to Promote Complex Bone Regeneration", *Stem Cells International*. Hindawi, 2016, pp. 1–9. doi: 10.1155/2016/3595941.

Teti, G. *et al.* (2015) "In vitro osteogenic and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells seeded on carboxymethyl cellulose-hydroxyapatite hybrid hydrogel", *Frontiers in Physiology*. Frontiers, 6, p. 297. doi: 10.3389/fphys.2015.00297.

Twentyman, P. R. y Luscombe, M. (1987) "A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity.", *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 56(3), pp. 279–85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3663476> (Consultado: el 16 de julio de 2018).

Ullah, I. *et al.* (2016) "In vitro comparative analysis of human dental stem cells from a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology", *Life*

Sciences, 154, pp. 39–51. doi: 10.1016/j.lfs.2016.04.026.

Ullah, I., Subbarao, R. B. y Rho, G. J. (2015) “Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective.”, *Bioscience reports*. Portland Press Ltd, 35(2). doi: 10.1042/BSR20150025.

Vasandan, A. B. *et al.* (2014) “Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. doi: 10.1111/jcmm.12192.

Warner, S. y Valdes, A. (2016) “The Genetics of Osteoarthritis: A Review”, *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*. doi: 10.3390/jfmk1010140.

Wegmeyer, H. *et al.* (2013) “Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin.”, *Stem cells and development*. Mary Ann Liebert, Inc., 22(19), pp. 2606–18. doi: 10.1089/scd.2013.0016.

Weissman, I. L., Anderson, D. J. y Gage, F. (2001) “Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations”, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), pp. 387–403. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.387.

Wyles, C. C. *et al.* (2015) “Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives.”, *Stem cells and cloning: advances and applications*. Dove Press, 8, pp. 117–24. doi: 10.2147/SCCAA.S68073.

Yubo, M. *et al.* (2017) “Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: A meta-analysis.”, *PloS one*. Public Library of Science, 12(4), p. e0175449. doi: 10.1371/journal.pone.0175449.

Zainal Ariffin, S. H. *et al.* (2012) "In vitro chondrogenesis transformation study of mouse dental pulp stem cells", *The Scientific World Journal*. doi: 10.1100/2012/827149.

Zhang, J. *et al.* (2014) "The difference on the osteogenic differentiation between periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells under inflammatory microenvironments", *Differentiation*. Elsevier, 88(4–5), pp. 97–105. doi: 10.1016/J.DIFF.2014.10.001.

Zhang, Q. Z. *et al.* (2012) "Human Oral Mucosa and Gingiva", *Journal of Dental Research*, 91(11), pp. 1011–1018. doi: 10.1177/0022034512461016.

