



**UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL
NORDESTE**

Facultad de Odontología

Obtención y expansión de células madres mesenquimales a partir de la pulpa dental de pacientes con diagnóstico de Pulpitis Irreversible, del nordeste argentino. Estudio de sus propiedades de adherencia a diferentes materiales

*Tesis para optar al título de Doctor de la UNNE en
Odontología*

Od. Elías J. Azzi

Director:

Prof. Dr. Juan Pablo Rodríguez

Co-Director:

Dr. Miguel A. Acuña

Lugares de Trabajo:

Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional del Nordeste (UNNE).

Cátedra de Físico-química. Facultad de Odontología. Universidad
Nacional del Nordeste (UNNE).

Año 2019

Dedicó esta tesis a mis padres quienes me mostraron que el mejor camino en la vida es el de la dedicación, el estudio, el trabajo y el amor. A mi familia, Mariana y Benicio que son el motor de mi vida, no me detendré por ellos.

Agradecimientos

Esta Tesis de doctorado pudo ser realizada gracias al apoyo de dos instituciones:

***Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE**, a través de las tres becas que obtuve, que me iniciaron en el campo de la investigación científica y luego financió parte del desarrollo de estas tesis.*

***Facultad de Odontología de la UNNE**, por el espacio de aprendizaje en esta carrera y por la generosidad de docentes y directivos.*

*En lo personal, quiero agradecer en primer lugar a mi director de tesis **Dr. Juan Pablo Rodríguez** quien estuvo a mi lado en este complejo y satisfactorio camino. Su sapiencia y generosidad intelectual me ayudaron a mejorar y a lograr el objetivo.*

*A mi co-director de Tesis y amigo **Dr. Miguel Acuña** quien me aconsejó e incentivó en el camino de la investigación.*

*A mi Maestro en la Odontología **Dr. Daniel Antonio Pira** que me inculcó los mejores valores de esta profesión.*

*A mi equipo clínico de trabajo, mis colegas y amigos, **Jesica Richter, Héctor Pira y Marcos Rafart**.*

A mis pacientes que confían día tras día en el trabajo que hago.

A mis padres, maestros de pura sangre, que con su vida me muestran el camino y con sus logros que todo es posible.

*A mis hermanos **Belén y Ezequiel**, que siempre me ayudan a ser mejor, apoyándome en cada paso.*

*A mi mujer, amor, socia, amiga y colega **Dra. Mariana Castro** que me sostiene e impulsa a continuar siempre para adelante.*

*A mi **Benicio**, hijo amado, mi nuevo compañero con quien cabalgaré toda la vida, me quita el cansancio y hace feliz mis días.*

Abreviaturas

ANOVA: Analysis of variance

CD: *cluster of differentiation*, marcador celular

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

MSC: *mesenchymal stem cells*, Células troncales mesenquimales

hDPMSC: Células troncales mesenquimales de pulpa dental humana

H & E: hematoxilina y eosina

IMDM: Iscove's modified Dulbecco's medium

MTT: ((3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5) difeniltetrazolium bromuro

PBS: buffer fosfato salino

PCR: *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la Polimerasa

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SFB: suero fetal bovino

TBS: tampón tris salino

Obtención y expansión de células madres mesenquimales a partir de la pulpa dental de pacientes con diagnóstico de Pulpitis Irreversible, del nordeste argentino. Estudio de sus propiedades de adherencia a diferentes materiales

CAPÍTULO
1

INTRODUCCIÓN

Introducción

1.1. Las células madre

1.1.1. *La investigación actual en células madre: propiedades biológicas*

1.1.2. *Células madre de pulpa dental humana (hDPMSC)*

1.1.3. *Diferenciación odontogénica de células madre de pulpa dental humana (hDPSC)*

1.1.4. *Diferenciación de hDPSC hacia la formación ósea*

1.2. La pulpitis irreversible como oportunidad de acceso a tejido fuente de células madre

1.2.1. *La pulpa irreversible y su diagnóstico*

1.2.2. *Procedimientos de extracción de pulpa dental. Obtención de hDPSC.*

1.3. La odontología regenerativa y sus recursos

1.3.1. *La regeneración ósea y su problemática*

1.3.2. *Propiedades de adherencia de las hDPSC en distintas superficies*

1.3.3. *Las MSCs producen mediadores celulares antiinflamatorios*

1.3.4. *La impresión 3D como recurso biomédico en odontología*

1.4. Proyecciones futuras del uso de hDPMSC

1.5. Objetivos

1.5.1. *Objetivo General*

1.5.2. *Objetivos Particulares*

1.1. Las células madre

1.1.1. La investigación actual en células madre: propiedades biológicas generales

El campo de células madre (*Stem cells*; SC) representa un área de especial interés para la investigación científica dado que los resultados obtenidos hasta la fecha, muestran buenas expectativas para el uso de células madre en biomedicina experimental y en ensayos clínicos. Además, actualmente existen nuevas estrategias terapéuticas, gracias a los grandes avances en la biología de SC, **que persiguen el objetivo de regenerar los tejidos lesionados por diferentes patologías**. Esto puede ser potencialmente posible gracias a la **troncalidad** de estas células (*Stemness*), es decir, la capacidad de células indiferenciadas para someterse a un número **indefinido de replicaciones (auto-renovación)** y dar lugar a células **especializadas (diferenciación)**. Por lo tanto, las células madre se diferencian de otras estirpes celulares, ya que son capaces de sostener la auto-renovación, son no especializadas, y pueden dar lugar a tipos celulares fenotípicamente bien definidos. La diferenciación puede ser identificada por un cambio en la morfología celular y por el seguimiento de proteínas específicas de marcación en la superficie celular (*cluster of differentiation*) que son de utilidad específica para visualizar su actividad en un tejido, cuando permanecen en reposo (no se dividen) durante largos períodos de tiempo, o cuando son activadas por una necesidad fisiológica de los tejidos, por enfermedad, o por lesión tisular. Por lo tanto, **la función principal de las células madre adultas es mantener y reparar el tejido en el que se encuentran**. Se cree que residen en áreas específicas denominadas “**nichos**” que se han identificado en muchos órganos y tejidos, incluyendo **cerebro, médula ósea, sangre periférica, vasos sanguíneos, músculo esquelético, piel, corazón, intestino, hígado, epitelio ovárico, testis y por supuesto dientes** (Dimmeler et al. 2014).

Los SC se han clasificado en tres grupos principales: *células madre embrionales* (ESC), *células madre pluripotentes inducidas* (iPSCs) y ***células madre postnatales / adultas*** (ASC) (Bellin et al. 2012) . Las ASC incluyen: ***células madre hematopoyéticas*** (Berardi et al. 1995), ***células madre epidérmicas*** (Jones, Harper, and Watt 1995), ***células madre mesenquimales*** (Owen 1988), ***células madre adiposas*** (Bobis, Jarocha, and

Majka 2006), *células madre neurales*, *células madre limbales* y *células madre hepáticas* (Sell 1994).

Las *células madre mesenquimales humanas* (hMSC) son células multipotentes con gran potencial de diferenciación clonogénica. Están presentes en el estroma de médula ósea en adultos. Las hMSC son células con forma de huso, similares a fibroblastos, que pueden replicarse como células indiferenciadas. Además, las hMSC tienen el potencial de diferenciarse en muchos tejidos derivados del mesénquima, incluidos hueso, cartílago, grasa, tendón, músculo y estroma de la médula (Pittenger et al. 1999). Además de la médula ósea, actualmente es posible obtener poblaciones similares a MSC a partir de tejidos adiposos y sangre del cordón umbilical (Mareschi et al. 2001).

El tejido adiposo y la médula ósea son las fuentes de hMSC más fácilmente disponibles, ya que se obtienen fácilmente y tienen progenitores relativamente abundantes. Se ha demostrado que las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMMSC) mejoran el daño tisular y mejoran la función después de una lesión pulmonar, enfermedad renal, diabetes, infarto de miocardio, lesión hepática y trastornos neurológicos (Li and Ikehara 2013).

Sin embargo, las BMMSC tienen mayores complicaciones para diferenciarse en linajes condrogénicos y osteogénicos que las MSC derivadas de tejido adiposo. Otros linajes de diferenciación, tales como miogénicos, neurogénicos y tenogénicos pueden mas bien derivarse de los BMMSC (G. T. J. Huang, Gronthos, and Shi 2009b).

En las últimas décadas, la investigación de células MSC-like en diversos tejidos específicos ha llevado al descubrimiento de una amplia variedad de células madre en cada órgano y tejido del cuerpo. Así se vio que existen hMSC de los tejidos orales / dentales (Ito et al. 2017; Kaneko et al. 2019; Li and Ikehara 2013).

El desarrollo dental es un proceso que comienza en la sexta semana en el útero. Los dientes se forman a partir del ectodermo oral y el ectomesénquima, que se deriva de la cresta neural. El ectodermo forma el órgano del esmalte, que forma el esmalte. El ectodermo también interactúa con el ectomesénquima y las formas de dentina,

cemento y ligamento periodontal. A medida que se forman los dientes, parte del primitivo **ectomesénquima se encierra dentro de los posibles dientes que forman la pulpa dental**, que representa una fuente de células madre. Las células madre de la pulpa dental comparten similitudes con BMMSC al exhibir marcadores de superficie similares y proteínas de matriz asociadas con la formación de tejido mineralizado (fosfatos alcalinos, osteocalcina y osteopontina). Si bien cada parte del diente, tiene su propio origen, en principio las SC adultas, no parecen tener mayor implicancia en los estadios iniciales del desarrollo del diente, sino que como se dijo antes, esta población constituye un reservorio equivalente al de otros órganos (Dong et al. 2019; Yianni and Sharpe 2019; Gronthos, Brahim, et al. 2000).

En 2000, se informó por primera vez el aislamiento y la caracterización de las hMSC del tejido pulpar (DPMSC) de dientes del tercer molar (Gronthos, Mankani, et al. 2000). Actualmente, se han obtenido también nuevas poblaciones similares a hMSC de diferentes tejidos en relación a las piezas dentarias como los dientes deciduos exfoliados humanos (SHED), ligamento periodontal (PDLSC), células progenitoras del folículo dental (DFPC), papila apical (SCAP) y tejido gingival (GMSC). Las MSC orales presentan multipotencialidad *in vitro* y pueden diferenciarse en varias poblaciones celulares como odontoblastos, osteoblastos, células neurales, condrocitos, adipocitos, mioblastos, fibroblastos y células endoteliales (Morsczeck et al. 2005; Sonoyama et al. 2006; Zhang et al. 2009; Liu et al. 2015). Estas notables características son muy aprovechables a los objetivos planteados en esta tesis.

1.1.2. Células madre de pulpa dental humana (hDPSCs)

La pulpa dental es un tejido oral no mineralizado compuesto de tejido conectivo blando, componentes linfáticos vasculares y elementos nerviosos que ocupa una cavidad central llamada cámara pulpar en el centro de cada pieza dentaria, conformando un complejo llamado dentino-pulpar con el tejido que lo recubre y limita, la *Dentina*. La cavidad pulpar es una cavidad de paredes inextensibles y rígidas rodeada de un tejido mineralizado con el cual tiene una íntima relación para la supervivencia y función de la pieza dentaria. En la *corona* de la pieza se encuentra la cámara pulpar y se extiende a través de la raíz o raíces del diente, como el conducto radicular que se abre

hacia el periodonto a través del agujero apical. La sangre, los vasos y los nervios de la pulpa dental entran y salen del diente a través de este orificio. La pulpa dental (**Figura I-1**) contiene diferentes tipos de células: endoteliales, neuronas, fibroblastos, osteoblastos / osteoclastos y odontoblastos (Winning and Townsend 2000). Entre ellas con inmunomarcaciones específicas, podrían visualizarse *las DPMSC* (Ver mas adelante).

Las células madre de la pulpa dental (hDPSC) son células madre derivadas del ectodérmo, que se originan a partir de las células de la cresta neural migratoria y poseen propiedades de células madre mesenquimales, con una morfología similar a fibroblastos, adherencia a una superficie plástica y forman colonias cuando se cultivan *in vitro* (Martens et al. 2013).

La localización de hDPMSC en los tejidos de la pulpa dental no está clara, principalmente porque no hay un marcador específico de DPMSC. Un estudio histórico ha demostrado que existen células similares a odontoblastos (marcadas con timidina ³H) están presentes en el sitio de exposición pulpar de los dientes, **sugiriendo que la pulpa profunda del sitio de exposición contiene DPSC que se diferencian en células similares a odontoblastos (Kawashima and Okiji 2016). Sin embargo, muy recientemente, otros trabajos muestran que la localización mas probable sería en las proximidades de los vasos sanguíneos (Yianni and Sharpe 2019).**

Además, las hDPMSC poseen la capacidad de diferenciación en múltiples linajes. Estas células podrían diferenciarse a **condrocitos, adipocitos, odontoblastos y células de tipo neural en condiciones de inducción apropiadas** (Fawzy El-Sayed 2013). Alge y colaboradores compararon DPMSC y BMMSC con respecto a su tasa de proliferación, formación de colonias, potencial clonogénico y potencial de mineralización, e informaron que las hDPSC tienen una mayor tasa de proliferación, un mayor potencial clonogénico y un mayor número de células madre / progenitoras en la población y pueden tener un mejor potencial de mineralización en comparación con BMMSC (Alge et al. 2010).

Las hDPSCs también expresan marcadores mesenquimales como: CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD146, y no expresan marcadores hematopoyéticos: CD34, CD45,

CD11b. Las DPSC han demostrado un gran potencial en medicina regenerativa y se han utilizado en modelos pancreáticos, cardíaco y corneal.

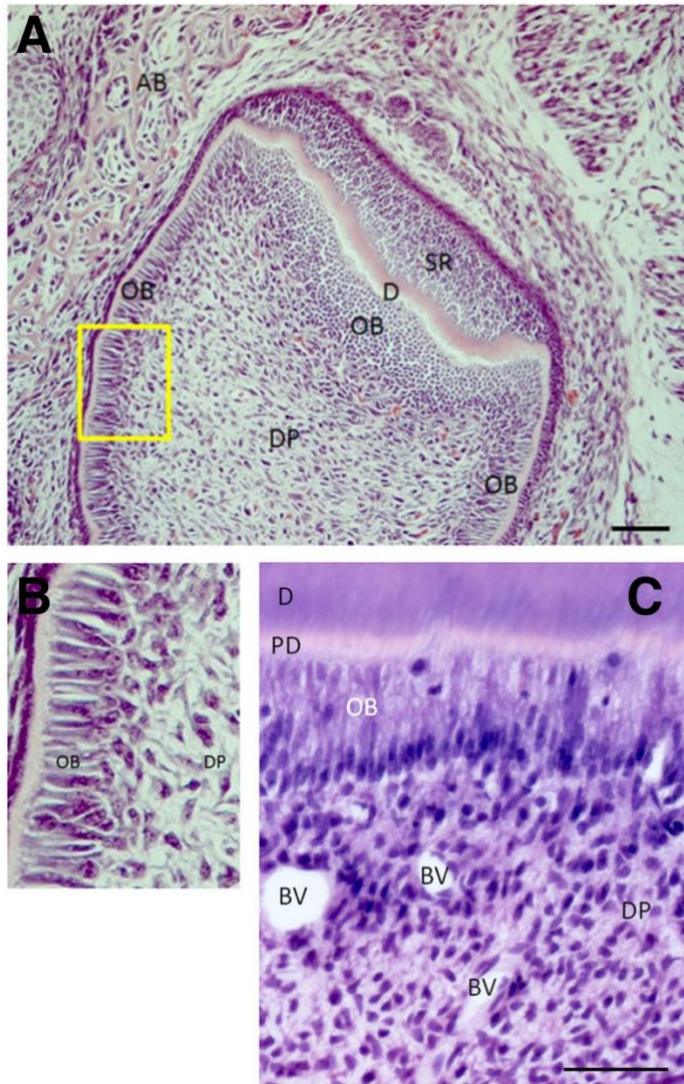


Figura I-1. Ubicación de las *hDPSCs* en el tejido pulpar. **A.** Tinción HE de la pulpa dental de incisivos superiores de rata. El inicio de la diferenciación de odontoblastos (OB) se observa en la etapa de campana tardía, y las células de la pulpa dental (DP) que están en contacto con el epitelio interno del esmalte se diferencian en odontoblastos. (AB, hueso alveolar; D, dentina; SR, retículo estrellado. Barra: 100 μm . **B y C.** Los OB se localizan en la periferia de la pulpa dental y extienden sus procesos citoplasmáticos a la dentina. Los odontoblastos maduros poseen cuerpos celulares columnares, que están conectados por uniones huecas. La transducción de señales se induce a través de estas uniones. (BV, vaso sanguíneo; D, dentina; PD, predentina. Barra, 100 μm . Las DPMSK se verían en la DP con una inmunomarcación específica.

Por otro lado, se logró diferenciar DPMSK en células de islotes, similares a las células de islotes pancreáticos (ICA). El ICA derivado de DPSC expresa marcadores de células pancreáticas y también ha demostrado la liberación de insulina de una manera dependiente de glucosa, confirmando así su funcionalidad *in vitro* (Govindasamy et al. 2011). Estos resultados iniciales muestran que los DPSC son una posible opción de tratamiento futuro para la diabetes.

También se demostró que las DPMSC pueden secretar factores pro-angiogénicos y antiapoptóticos y tener potencial para reparar el infarto de miocardio (IM) inducido en modelos animales. Las DPMSC se expandieron *in vitro* y mejoraron las funciones cardíacas dentro de las 4 semanas de la inyección intramiocárdica. Los hallazgos de Gandia y colaboradores indican el potencial de las DPSC como una población celular alternativa para la reparación cardíaca del infarto agudo de miocardio (Gandia et al. 2008).

Adicionalmente, se observó que las hDPSCs comparten características similares con las células madre limbales (LSC) *in vitro* y que poseen potencial para constituir una fuente alternativa para la reconstrucción corneal en pacientes con deficiencia de células madre de extremidades totales uni o bilaterales. Estos investigadores observaron que es posible un trasplante exitoso de DPSC para reconstruir el epitelio corneal en un modelo animal con deficiencia de células madre limbares (LSCD) (Gomes et al. 2010; Monteiro et al. 2009).

Estos hallazgos muestran que las DPSC podrían desempeñar un papel fundamental en la medicina regenerativa y proporcionar una ventana al potencial aun sin mucho explotar de estas células.

1.1.3. *Diferenciación odontogénica de células madre de pulpa dental humana (hDPMSC)*

Naturalmente, las DPSCs también se han utilizado en la regeneración de tejido dental. Gronthos y colaboradores demostraron la capacidad que estas células tienen para diferenciarse en odontoblastos (Gronthos, Brahim, et al. 2000), e informaron que las mDPSC trasplantadas en ratones inmunocomprometidos pudieron generar una estructura similar a la dentina revestida con células similares a los odontoblastos humanos. En 2001, se demostró que las vías bioquímicas implicadas en el proceso de diferenciación de **DPSC en odontoblastos** son similares a las involucradas en la diferenciación de **BMMSC en osteoblastos** (Shi, Robey, and Gronthos 2001). En 2006, Huang y colaboradores diseñaron un experimento bastante original, en el que sembraron DPMSC en la superficie de dentina tratada mecánicamente y químicamente y luego

por análisis con microscopía electrónica observaron la formación de una morfología similar a la de los odontoblastos con un proceso citoplasmático que se extendía hacia un túbulo dentinario. Estos datos demostraron la formación de células con morfologías odontoblásticas en la dentina existente, lo que sugiere que las DPMSC aisladas de la dentina existente pueden diferenciarse en odontoblastos (G. T.-J. Huang, Shagramanova, and Chan 2006).

Uno de los primeros trabajos que planteó la posibilidad de uso de DPSC hipotéticas tomados de la pulpa dental inflamada (IP) fue el de Alongi y colaboradores. Ellos postularon que estas células podrían usarse para la regeneración de tejidos dentales, así las implantaron en modelos animales y detectaron la formación de complejos similares a pulpa / dentina (Alongi et al. 2010). Si bien este grupo de investigación no progresó en esta línea de investigación, posteriormente, Davies y colaboradores destacaron la importancia de los componentes de la matriz de dentina (DMC) para promover la diferenciación dentinogénica. La adición de DMC aumentó los niveles relativos de expresión génica de los marcadores dentinogénicos e indujo cambios fenotípicos como aumento de la sialofosfoproteína de la dentina y la proteína 1 de la matriz de la dentina en las hDPSC (Davies et al. 2015).

Las propiedades de estas células, en asociación con el reciente desarrollo y auge de nuevos biomateriales imprimibles en modelos 3D, abre la puerta a la investigación de hDPMSC en andamios tridimensionales.

En odontología regenerativa, el desarrollo de nuevos andamios adecuados para la endodoncia podría representar un nuevo campo importante de investigación de materiales dentales (Galler et al. 2011). La ingeniería de tejidos basada en andamios representa una estrategia prometedora para reemplazar las estructuras dentales dañadas y restaurar sus funciones biológicas (Qu et al. 2014). Dado esto, se evaluó la posibilidad la diferenciación odontogénica de DPSC en andamios nanofibrosos (NF) -poli (ácido l-láctico) (PLLA) *in vivo* después de la implantación en ratones *nude*, (y varios otros modelos, ej. andamios de poli (épsiloncaprolactona) (PCL) / gelatina con o sin la adición de nanohidroxiapatita) concluyendo que los andamios representan un excelente entorno para que los mDPSC regeneren pulpa dental y dentina (Soares et al. 2018; Wang

et al. 2011, 2010). En conclusión, la incorporación de nHA en nanofibras de hecho mejoró la diferenciación de DPSC hacia un fenotipo de odontoblastos *in vivo*.

Los hidrogeles se han estudiado en gran medida como andamios de ingeniería de tejidos debido a sus propiedades biológicas favorables (Kwon 2015). En un estudio reciente, Cavalcanti y colaboradores evaluaron la compatibilidad de Puramatrix (hidrogel peptídico de autoensamblaje) con el crecimiento y diferenciación de hDPSC. Además, los investigadores utilizaron el modelo de corte de diente humano con Puramatrix, para verificar la diferenciación de DPSC en células similares a odontoblastos, midiendo la expresión de sialofosfoprotein de dentin (**DSPP**) y proteína de matriz de dentina 1 (**DMP-1**). Los autores informaron que después de 21 días en rodajas de dientes que contenían Puramatrix, las células DPSC expresaron DMP-1 y DSPP, supuestos marcadores de diferenciación odontoblástica, que representan una nueva alternativa prometedora de andamios inyectables para la ingeniería del tejido de la pulpa dental (Cavalcanti, Zeitlin, and Nör 2013). Similarmente, se desarrolló un andamio de hidrogel termo-sensible a base de glicol-quitina biodegradable (GC-TRS) que se puede aplicar fácilmente como una solución viscosa suave a temperatura ambiente, pero se transforma rápidamente en un hidrogel duradero en condiciones fisiológicas. GC-TRS permitió la proliferación y diferenciación odontogénica de hDPMSC y posee el mismo potencial para ser utilizado en técnicas de ingeniería de tejidos para la regeneración de la dentina (Park et al. 2013).

Por otro lado, también se presentó un método de regeneración endodóntica basado en el uso de un andamio de hialuronano tridimensional (3D) y hDPMSC para producir un tejido funcional similar a la pulpa dental *in vitro*. La construcción de hialuronano-DPSC mostró una morfología similar a la pulpa dental, que consta de varias células especializadas que crecen dentro de las fibras de hialuronano. Además, estas construcciones se implantaron en defectos de tamaño crítico de calvario de rata. Los análisis histológicos y los perfiles de expresión génica realizados en injertos de hialuronano-DPSC mostraron la regeneración de tejido similar a la osteodentina, lo que sugiere el potencial regenerativo del tejido diseñado con hialuronano-DPSC (Ferroni et al. 2015).

Estos andamios, presentaron resultados variables, muchos de ellos prometedores, sin embargo, todos tienen forma estándar. Un factor que muy positivamente alentaría el proceso de integración y regeneración ósea sería el de una *forma personalizada de andamio*, a cada situación particular. La disponibilidad de impresoras 3D y resinas biocompatibles de impresión, podrían contribuir en este proceso.

1.1.4. Diferenciación de hDPSC hacia la formación ósea

La reparación y regeneración del hueso es un desafío importante en el campo de la cirugía maxilofacial oral y para todo el cuerpo humano en general (Patil et al. 2018). Las enfermedades, traumas y procedimientos quirúrgicos que causan pérdida ósea presentan una fuente importante de morbilidad en los grupos demográficos más ancianos. Los huesos adultos se remodelan continuamente a través de vías que inducen la actividad de osteoclastos y osteoblastos. Las células madre progenitoras ubicadas en el periostio y el endoostio poseen un potencial regenerativo e intervención quirúrgica limitados y, la utilización de biomateriales que imitan la estructura ósea o el injerto óseo son indispensables para resolver la pérdida ósea (Salgado 2006). Es así que, para evitar los efectos secundarios causados por la implementación de materiales biocompatibles o la extracción ósea, se han investigado nuevos enfoques.

Las células madre dentales muestran marcadores de superficie y proteínas matriciales similares asociadas con la formación de tejido mineralizado (osteocalcina y osteopontina) y las células madre de pulpa dental humana representan un posible recurso para diferenciarse en osteocitos / osteoblastos. En consecuencia, estas células podrían usarse en la regeneración del hueso alveolar y craneofacial. Durante la última década se han realizado muchos estudios *in vitro* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* mostraron que las células madre postnatales, seleccionadas de la pulpa dental humana, poseen la capacidad de proliferar y diferenciarse en osteoblastos (Kim et al. 2012; Yianni and Sharpe 2019).

Se ha demostrado que una población de células productoras de hueso estromal (SBP) recolectadas del tejido de la pulpa dental, podría diferenciarse en células precursoras de osteoblastos que expresan CD44⁺, factor de transcripción relacionado con Runt 2 (RUNX-2) y posteriormente en osteocitos / osteoblastos. Se detectó el nuevo

tejido óseo fibroso, compuesto por una matriz densamente mineralizada después de 50 días de cultivo *in vitro*. Además, se informó la formación de tejido óseo laminar con osteocitos después del trasplante en ratas inmunocomprometidas (La Noce et al. 2014; Laino et al. 2009; Kawashima and Okiji 2016).

Todo lo anterior, fundamenta un posible futuro uso de hDPMSC en estrategias para favorecer el proceso de osificación en diferentes campos de aplicación en odontología, particularmente en implantología.

1.2. La pulpitis irreversible como oportunidad de acceso a tejido fuente de células madre

1.2.1. La pulpa irreversible y su diagnóstico

Como su nombre indica esta patología implica una inflamación de la pulpa dental, ocasionada por diversas causas (infecciosas o no). La misma se diagnostica en piezas dentarias permanentes, erupcionadas, con sintomatología de dolor y con apoyo radiográfico para la determinación de la lesión. El dolor es generalmente de moderado a grave, punzante o apagado, localizado o referido.

Las radiografías no son generalmente útiles en el diagnóstico de esta afección, aunque puede ayudar a identificar el diente implicado. En un estado avanzado, ésta sí puede mostrar un engrosamiento de la parte apical del ligamento periodontal, la ubicación y el tamaño de la lesión. El proceso inflamatorio en la pulpitis irreversible sintomática puede empeorar tanto, que provoque una necrosis pulpar, con lo que el tratamiento definitivo implica **la pulpectomía**.

La pulpa dental es un tejido conectivo blando dentro de la corona dental, fuente de células madre adultas (hDPMSC). La posibilidad no invasiva de acceso a estas células, en comparación a otras fuentes como médula ósea, posee una ventaja. Así la pulpectomía resultante de un diagnóstico irreversible de pulpitis, brinda la posibilidad de aprovechamiento de un tejido de desecho que hoy no tiene un uso clínico. Por lo anterior, este tratamiento representa una opción atractiva de uso en experimentos *in vitro* con muy diversas aplicaciones, como la abordada en esta tesis.

1.2.2. Procedimientos de extracción de pulpa dental. Obtención de hDPMSC

Como se mencionó antes, las hDPSCs se obtienen de dientes primarios y permanentes humanos, muelas del juicio humanas, dientes deciduos exfoliados humanos y papila apical. Además, también se pueden aislar de dientes supernumerarios, que generalmente se descartan. Las DPSC se han aislado de diferentes organismos, incluidos humanos, ratones, rata, oveja, chimpancé y cerdo.

Existen dos métodos ampliamente utilizados para el aislamiento de células madre de pulpa dental: el método de *ex plante* (DPSC-OG) y el método de digestión enzimática del tejido pulpar (DPSC-EZ) como se muestra en la **Figura I-3 (A y B)**.

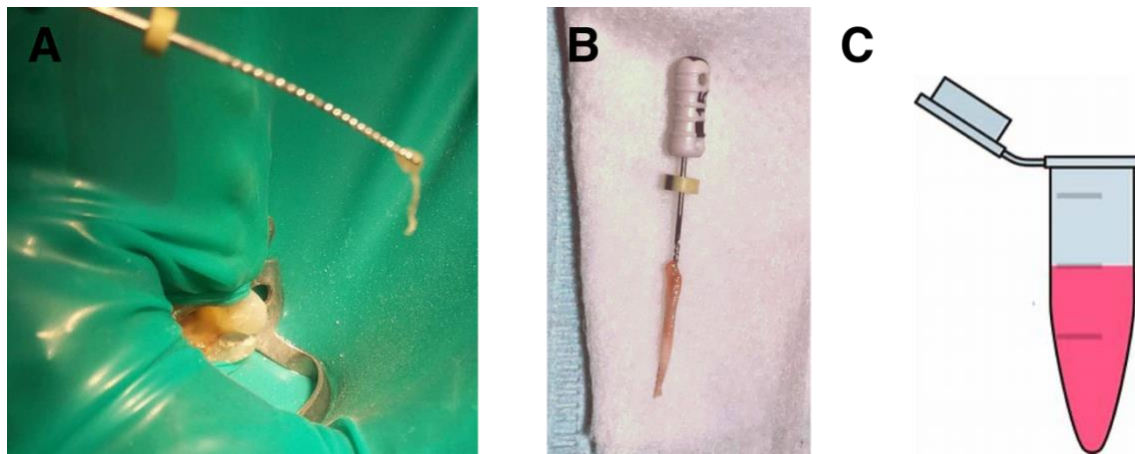


Figura I-2. Obtención de pulpa dental en pacientes humanos. **A.** El tejido pulpar se extrae siguiendo los métodos convencionales endodónticos. **B.** El tejido pulpar se limpia con materiales absorbentes estériles (eliminación de restos de sangre, o trozos pequeños rotos de pulpa). **C.** Posteriormente se deposita, manteniendo la esterilidad, en un tubo eppendorf con medio de cultivo sin SFB con Gentamicina (1 mg/ml), o Penicilina/Streptomycin (2 U/ml) y Anfotericina B (50 µg/ml). El tejido pulpar se extrae posteriormente en campana de flujo de aire laminar y se procesa como se explica en el apartado siguiente.

El método de *ex plante* se basa en el crecimiento de células a partir de fragmentos de tejido y la posterior adherencia a una superficie plástica. La segunda técnica consiste en la extracción quirúrgica estéril de la pulpa dental, una posterior digestión en colagenasa / tripsina, y luego una caracterización y detección mediante el uso de marcadores fenotípicos de la población celular a obtener.

El aislamiento por digestión enzimática se basa en el uso de citómetros de flujo con un clasificador/separador de células activado por fluorescencia (FACS – Cell sorter).

Esta tecnología viene siendo aplicada con éxito desde hace algunos años (Dong et al. 2019). En el capítulo de Materiales y Métodos se se explican los procedimientos usados experimentalmente en esta tesis. No obstante, en la **Figura I-4** se muestran los pasos bioquímicos mas frecuentemente usados en la caracterización de las MSC.

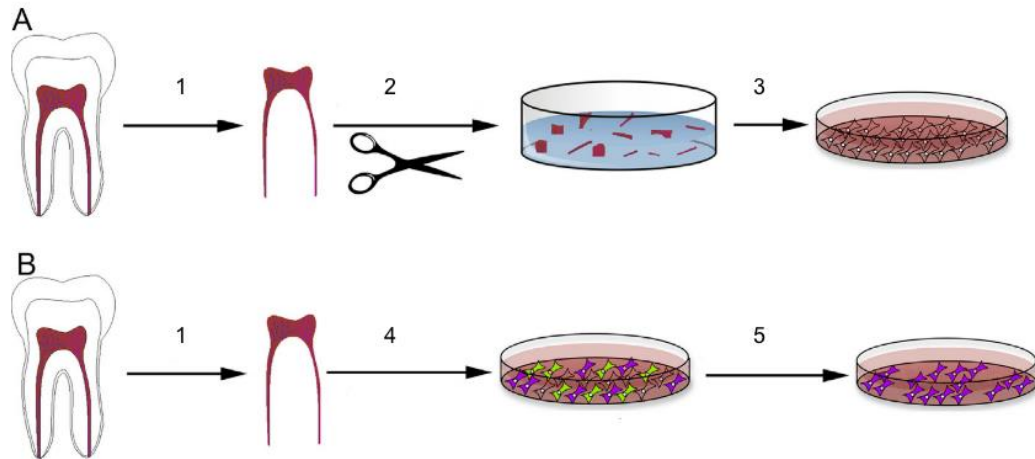


Figura I-3. Obtención de pulpa dental en pacientes humanos y posterior recuperación de hDPSCs. **A** través del tejido duro dentario se crea una puerta de entrada hacia la cámara pulpar y se extrae la pulpa, que se traslada al laboratorio manteniendo la esterilidad en medio de cultivo (1). En el método de explante DPSC-OG se realiza una disgregación mecánica con bisturí y tijera (chopper) fragmentando el tejido en piezas (2) más pequeñas en medio de cultivo a 37°C, posteriormente se lavan los restos tisulares no adheridos y se deja a las células adherentes crecer en monocapas (3). **B.** En la digestión enzimática, la pulpa dental se expone a un cóctel de enzimas mediante el cual la pulpa dental se digiere en una solución (colagenasa / tripsina) (4) y luego la suspensión celular obtenida se analiza para la expresión de marcadores de Stem (ej. CD34⁺ o CD117⁺) por citometría de flujo. Usando un Cell Sorter, las células se separan y se aplican o se inyectan dependiendo del protocolo experimental en cada caso (5). Imagen adaptada de (La Noce et al. 2014)

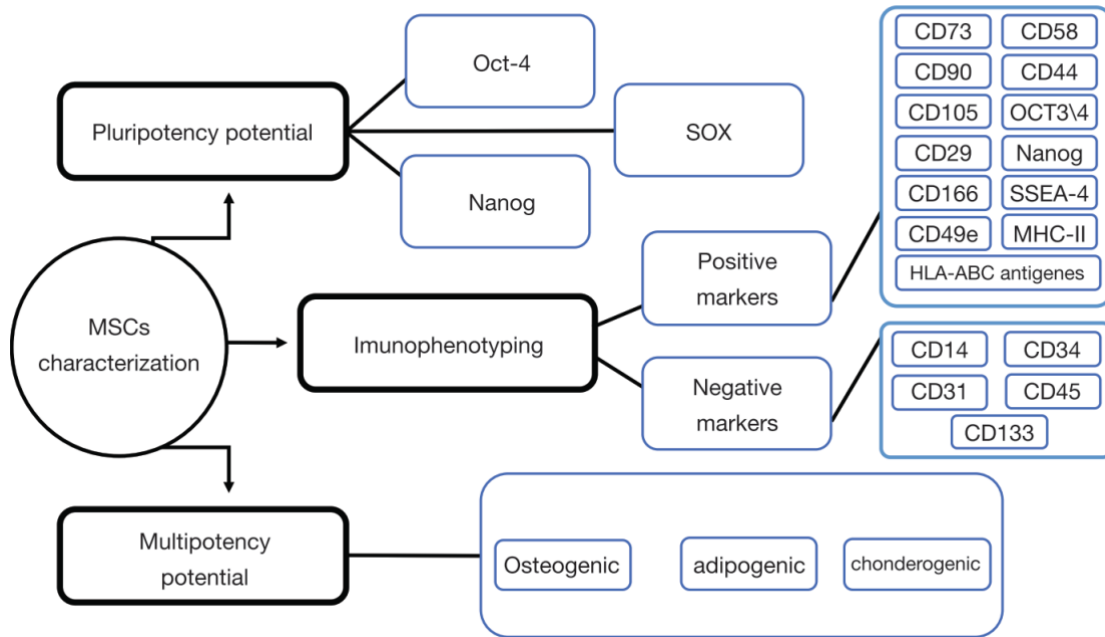


Figura I-4. Diagrama para la caracterización bioquímica celular de MSC. Esquema adaptado de (Rajabzadeh, Fathi, and Farahzadi 2019). La inmunotipificación de estas células implica la marcación positiva de al menos CD70, CD73, CD105, CD44 y la marcación negativa de CD14, CD45 y CD34.

1.3. La odontología regenerativa y sus recursos

1.3.1. La regeneración ósea y su problemática

La implantología es una disciplina con más de 50 años de evolución. La misma se basa en conceptos biomecánicos para lograr resultados favorables. El objetivo de la misma es reemplazar las raíces de las piezas dentarias mediante implantes de aleaciones de titanio con forma de raíz, capaz de integrarse al tejido óseo subyacente.

La comprensión de la biología ósea (procesos de señalización celular y los mecanismos moleculares implicados), la evolución de la química de materiales, y los métodos empleados lograron altas tasas de integración positiva al hueso residual (superiores a un 97%).

La condición fundamental para la rehabilitación con implantes dentales es tener un terreno óptimo, en cantidad y calidad ósea, para ubicar tridimensionalmente de forma correcta las prótesis de raíz (implantes dentarios). Las técnicas de regeneración ósea en

los maxilares se constituyen como un método fundamental para lograr este objetivo, pero presenta adversidades propias o ajenas a la zona a regenerar. Múltiples factores dificultan la capacidad de formar hueso nuevo maduro, en zonas donde existieron reabsorciones, es por eso que la tasa de éxito es variable y baja en relación a la lograda en implantología.

En la actualidad existen múltiples técnicas y materiales utilizados con el objetivo de mejorar el terreno óseo mediante injertos, ubicados en las zonas con defectos para disminuirlos o eliminarlos, y así permitir la correcta ubicación de los implantes dentarios y/o favorecer la futura rehabilitación protésica. Consiste básicamente en utilizar materiales de injertos de diferentes orígenes (homólogos, heterólogos o sintéticos) como soportes o andamios que sirven para el aumento de hueso, nuevo sano y maduro, capaz de soportar cargas e integrarse a implantes dentales.

En general la tasa de éxito de la regeneración ósea es muy variable y relativa. Presenta múltiples dificultades: la escasa capacidad osteogénica en el sitio receptor, propiedades limitadas de cualquiera de los tipos de injertos de la actualidad, estado local, general y hábitos del paciente, tiempo prolongado de curación e integración, y la forma de aplicación de la técnica empleada, por solo nombrar algunos de los factores entre otros. Esto hace que todavía la regeneración ósea este muy por debajo de el porcentaje de éxito buscado para estos métodos terapéuticos, en oposición a lo que se observa en implantología, donde la tasa de éxito ronda entre un 95% a 98%.

La odontología es un campo en constante cambio que ha sido testigo de muchos avances en el siglo pasado. La **prostodoncia** es una rama de la misma que se ocupa de reemplazar los dientes perdidos utilizando dispositivos fijos o extraíbles, en un intento de simular la función natural del diente. Aunque tales "**terapias de reemplazo**" parecen ser fáciles y económicas, nunca se acercan a sus contrapartes naturales. Las complicaciones que surgen a menudo conducen a fallas y reparaciones frecuentes de tales dispositivos que rara vez permiten la verdadera función fisiológica de los tejidos dentales y maxilofaciales orales. Tales factores pueden afectar críticamente la calidad de vida de un individuo.

El mercado de implantes dentales y óseos crece continuamente con enormes ingresos económicos. Si bien la tasa de éxito de los implantes dentales es cercana al 100% (mejor que cualquier otro tratamiento médico) necesita de la medicina regenerativa para poder lograr tratamientos exitosos y con altos estándares de calidad. Es ahí donde se encuentra con la baja y relativa tasa de éxito de la regeneración ósea, y la búsqueda constante de mejores tipos de injertos, que combinen las tres capacidades ideales: *osteoinducción*, *osteoconducción* y *osteogenia*. En la actualidad los factores que hacen vulnerables a los injertos en el sitio receptor afectan enormemente el resultado final.

Es por eso que disminuir los tiempos de la osteointegración, neoformación y curación ósea sería de gran aporte al campo de la rehabilitación con implantes.

Desafortunadamente, dichos tratamientos se asocian nuevamente con problemas tal vez no tan frecuentes, pero problemas al fin, como por ejemplo la periimplantitis, que resulta en una eventual pérdida o reemplazo de implantes. Esto es particularmente influyente para los pacientes que tienen enfermedades comórbidas como diabetes u osteoporosis en asociación con tabaquismo y otras afecciones, que indudablemente afectan el resultado final del tratamiento.

El advenimiento de la ingeniería de tejidos y las terapias de medicina regenerativa junto con los enormes avances realizados en sus campos interdisciplinarios asociados, como la terapia con células madre, el desarrollo de biomateriales y otros, pueden generar nuevas metodologías para mejorar la regeneración de tejidos mediante el diseño y la construcción de productos biológicos especialmente diseñados para cada paciente.

En una revisión muy reciente, Rajabzadeh y colaboradores, presentan el Diagrama para la aplicación de células madre dentales (no solo hDPSCs) en odontología y/o medicina regenerativa (Rajabzadeh, Fathi, and Farahzadi 2019).

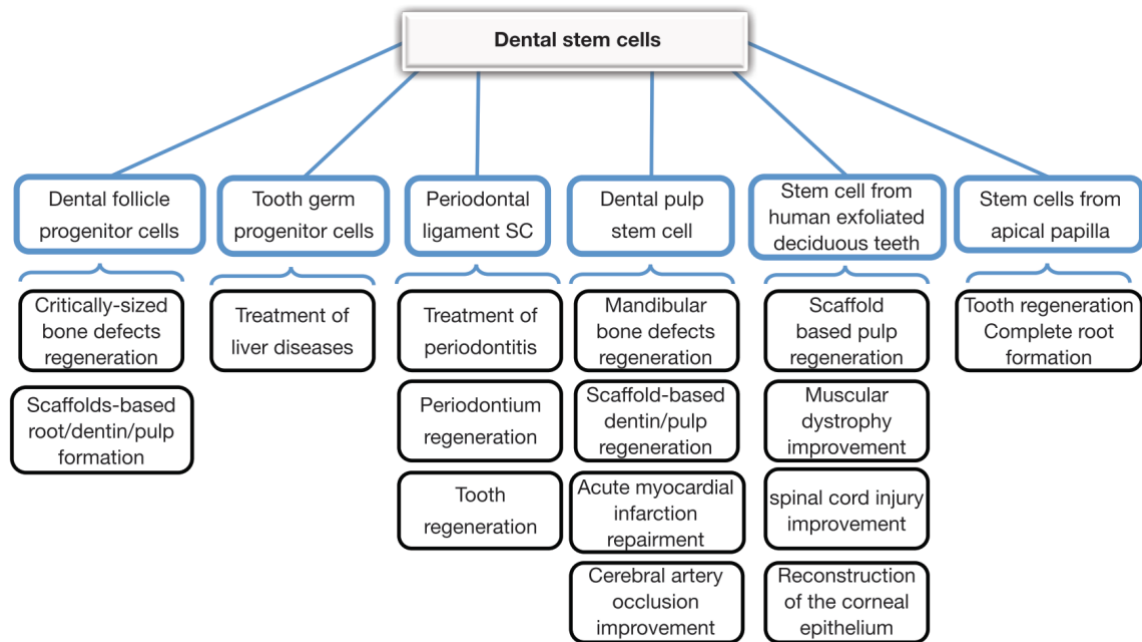


Figura I-3. Diagrama para la aplicación de células madre dentales en odontología y/o medicina regenerativa. Extraído de (Rajabzadeh, Fathi, and Farahzadi 2019).

Nótese que no se destaca la idea abordada en la presente tesis de usar hDPSCs en implantología dentaria.

1.3.2. Propiedades de adherencia de las hDPMSC en distintas superficies

La historia de las células madre y su posibilidad de uso en osificación, se remonta a la década de 1960-70, cuando Friedenstein y sus colegas aislaron, cultivaron y diferenciaron el linaje celular osteogénico de células derivadas de médula ósea de cobayos (Friedenstein et al. 1974). Aparentemente, si bien estas células (BMMSCs) no presentan las condiciones óptimas para diferenciación celular osteogénica (Marei and El Backly 2018), los trabajos iniciales demostraron que era factible.

Como se mostró antes en los apartados 1.1.3 y 1.1.4 las hDPMSC *in vitro* son capaces de diferenciarse a **osteoblastos** y **odontoblastos**. Si bien los últimos son clave en el mantenimiento de la estructura del diente¹ posiblemente la delicada y específica

¹ Los dientes están formados por tres tejidos duros únicos, esmalte, dentina y cemento. El esmalte y el cemento cubren la superficie de la corona y la raíz del diente, respectivamente, y la dentina comprende

función² que ellos tienen en la síntesis de dentina no sea tan aprovechable en biomedicina odontológica en el futuro. Por el contrario, si de manera eficiente se logra *in vivo* la diferenciación osteoblástica a partir de hDPMSC, y se gobierna este proceso farmacológicamente, se estaría ganando una herramienta extraordinaria para acortar los tiempos de regeneración ósea. Estos procedimientos no serían solo útiles en odontología sino también en otras áreas de la medicina regenerativa.

El primer paso para lograr esto, debe sortearse usando un vehículo que sea capaz de transportar células eficientemente pegadas, al interior del alvéolo dentario, y a continuación, el mismo debe permitir *in vivo* la expansión, diferenciación celular y síntesis de matriz ósea. Existen pocos estudios que evalúen diferentes tipos de soportes para la adhesión de hDPMSC, mas allá de los clásicos como placas de Petri o botellas de cultivos celulares, (Rahman et al. 2018; Marrelli et al. 2018) y hasta ahora en nuestro país no se han usado soportes hechos con resinas biocompatibles para uso en impresoras 3D. No obstante, es esperable que las mismas se adhieran a materiales porosos de baja densidad, dado que la adhesión celular, es una función mas bien innata de las células mesenquimales (Li and Ikehara 2013; Mareschi et al. 2001; Liu et al. 2015).

1.3.3. Las MSC producen mediadores celulares inflamatorios: citoquinas

Además de las propiedades bien establecidas de *auto-renovación* y *diferenciación multipotente*, las células madre mesenquimales (obtenidas de tejidos orales, y otras)

la porción principal del diente. La pulpa dental es el único tejido conectivo no mineralizado que está rodeado de dentina y es rico en vasos sanguíneos y fibras nerviosas.

² Los odontoblastos están presentes en la periferia de la pulpa dental y exhiben características morfológicas únicas. Extienden proyecciones citoplasmáticas denominadas *procesos odontoblásticos* en los túbulos dentinarios dentro de la dentina. Las estrechas relaciones anatómicas y funcionales entre la dentina y el tejido pulpar dental han llevado al desarrollo del concepto del "**complejo dentina-pulpar**". Aunque el rol principal de los odontoblastos es la formación de dentina, cada vez hay más pruebas de que también actúan como nociceptores y células con características inmunes en la defensa de la pulpa dental. Los odontoblastos son células de larga vida que se alinean a lo largo de la interfase dentino-pulpar, donde mantienen la aposición pre-dentina y dentina durante toda la vida de un diente. Son similares a las neuronas y los cardiomiocitos en que son básicamente estables y no se reemplazan.

Durante el desarrollo del diente, incluida la diferenciación de odontoblastos, las interacciones epiteliales-mesenquimales son esenciales; las señales del epitelio interno del esmalte son necesarias para la diferenciación de los odontoblastos de las células periféricas de la papila dental que están en contacto con las láminas basales, que se encuentran entre el epitelio interno del esmalte y la papila dental. Aunque los mecanismos precisos responsables de la diferenciación de odontoblastos siguen sin estar claros, se ha observado experimentalmente que varios factores la inducen (Ej. miembros de la familia BMP (*bone morphogenetic proteins*)).

exhiben funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias en varias enfermedades autoinmunes o modelos inflamatorios experimentales (Zhang et al. 2009). Un estudio clásico de esto último, posiblemente sea el desarrollado por Wen y Colaboradores. Ellos investigaron el efecto modulador de las MSC de médula ósea de rata en células epiteliales corneales humanas (HCE-T) estimuladas con citocinas proinflamatorias interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), en un modelo de cocultivo *in vitro*. Los resultados mostraron que las MSCs redujeron la expresión de moléculas de adhesión e inmunorreguladoras en HCE-T estimuladas con citocinas proinflamatorias a través de la ruta de transcripción NF- κ B. Además, MSC atenuó la expresión de IDO a través de la transcripción de NF- κ B y las vías de señalización de TGF- β 1. Por lo tanto, el cocultivo de HCE con MSC proporcionó un modelo *in vitro* útil para estudiar las propiedades antiinflamatorias de MSC que luego se extrapoló a otros modelos.

Estas propiedades biológicas adicionales que las MSC presentan, siempre son muy atractivas si van a ser empleadas en algún proceso *in vivo* que implique trauma o implante.

1.4. Proyecciones futuras del uso de DPMSCs

Como se puede observar en la clínica odontológica actual, la regeneración ósea constituye una disciplina en constante crecimiento y cambio, esto se debe a un aumento de requerimientos funcionales y estéticos de los pacientes, que lleva a la investigación científica a buscar mejores materiales de regeneración, intentando optimizar los estándares de eficacia.

Los materiales de regeneración, como se mencionó antes, deben tener capacidad de formación ósea, propiciar la diferenciación osteoblástica y guiar la deposición del hueso sano neoformado. Estas características están naturalmente, muy ligadas a las propiedades biológicas del material de injerto, así los *huesos humanos* (particulados), presentan gran capacidad osteogénica. Los *injertos de otras especies* (ej. Bovinos o porcinos) son osteoconductores y, los *rellenos óseos sintéticos*, como la hidrixapatita (elaborados por síntesis bioquímica), presentan buenas características de osteoinducción. Todos ellos sirven como andamios o soportes para que las células

puedan continuar con el proceso de curación y formación de nuevo hueso luego de la extracción de piezas dentarias. No obstante, es fácil ver, que ninguno cumple estrictamente con todas las propiedades ideales. Esto enfoca y alienta a la búsqueda de nuevos materiales en combinación con diferentes estrategias terapéuticas.

El advenimiento de nuevas tecnologías en el diagnóstico digital odontológico abrió las puertas al uso de diferentes alternativas: Tomografías, Scanners e Impresoras 3D. Estos se han combinado para obtener óptimos resultados clínicos. Nuevos materiales como resinas biocompatibles surgieron como opción para la utilización clínica en terapéuticas de rehabilitación oral. Sin tener un origen odontológico, el proceso y la utilización de todos los recursos digitales se conoce como CAD-CAM. Fase CAD, Diseño Asistido por Computadora y Fase CAM Producción asistida por Computadora. Esta nueva y original forma de trabajar en odontología se reconoce como *work flow*.

Considerando lo anterior, se pensó como parte del aporte original de esta tesis, centrar la atención en la utilización de una resina biocompatible de impresión 3D, como un andamio de fabricación personalizada, que sirva de vehículo de las hDPMSC, como un primer paso, hacia el desarrollo de nuevas estrategias que impliquen el uso odontológico de terapias regenerativas celulares del propio paciente en el futuro mediato.

1.5. Objetivos

1.5.1. *Objetivo General*

En el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar la capacidad de obtención y expansión de células madres de la pulpa dental (hDPMSCs) a partir de pacientes con *diagnostico de Pulpitis Irreversible* del nordeste argentino, y evaluar sus capacidades de adherencia.

1.5.2. *Objetivos Particulares*

- Obtener el material pulpar en condiciones de esterilidad aptas para el posterior cultivo *in vitro* y poner a punto una metodología para digestión enzimática del tejido que permita la recuperación de hDPMSCs.
- Estandarizar las condiciones de cultivo primario que permitan la expansión de estas células
- Caracterizar el fenotipo de las células obtenidas y su cinética de crecimiento
- Estudiar algunos aspectos esenciales de su biología como su capacidad de producción mediadores de señalización (Citoquinas).
- Evaluar la capacidad de crecimiento y adherencia de estas células a diferentes biomateriales utilizados en técnicas quirúrgicas de regeneración ósea en odontología.

Obtención y expansión de células madres mesenquimales a partir de la pulpa dental de pacientes con diagnóstico de Pulpitis Irreversible, del nordeste argentino. Estudio de sus propiedades de adherencia a diferentes materiales

CAPÍTULO
2

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

2.1. Pacientes y procedimientos de muestreo

2.1.1. Criterios de selección

2.1.2. Procedimientos quirúrgicos empleados

2.2. Cultivos celulares primarios y de línea

2.2.1. Digestión del tejido pulpar.

2.2.2. Recuperación de hDPMSC y amplificación

2.2.3. Cultivos de línea

2.2.4. Mantenimiento de los cultivos

2.2.5. Preservación de las células nitrógeno líquido

2.3. Evaluación de la expansión de cultivos MSC

2.3.1. Evaluación de viabilidad y/o proliferación celular con MTT

2.3.2. Determinación de parámetros cinéticos (K crecimiento y t` de duplicación)

2.3.3. Ensayos de scratch wound healing (Invasividad celular)

2.4. Estrategias de Biología Molecular

2.4.1. Obtención de RNA total de muestras tisulares y cultivos celulares

2.4.2. Diseño de cebadores

2.4.3. PCR cuantitativa

2.5. Análisis por Citometría de Flujo

2.6. Diseño e impresión de andamios

2.7. Análisis estadístico

2.1. Pacientes y procedimientos de muestreo

2.1.1. Criterios de selección

Se seleccionaron 20 pacientes jóvenes entre 20 y 40 años, sin compromiso de enfermedades sistémicas. Con sintomatología dolorosa de tipo pulpar en zona antero-superior.

El estudio se realizó sobre piezas dentarias antero-superiores, incisivos centrales, laterales o caninos. Piezas unirradiculares con conducto radicular único, con diagnóstico de pulpitis irreversible. La misma se caracteriza por un dolor espontáneo o inducido, punzante, agudo, localizado o diferido, constante y de intensidad severa.

Todos los pacientes fueron informados de los estudios a realizar sobre la pulpa extraída de las piezas dentarias, y firmaron un consentimiento informado.

2.1.2. Procedimientos quirúrgicos empleados

En todos los casos se utilizó la técnica convencional endodóntica para piezas dentarias con pulpitis irreversible. Se realizó la técnica anestésica infiltrativa terminal al nervio dentario antero-superior. Se procedió a realizar la apertura de la cámara pulpar con instrumental rotatorio (Turbina) a alta velocidad ($2.5-4 \cdot 10^5$ RPM) con piedra redonda larga para luego regularizar con fresa de carburo de tungsteno de forma troncocónica.

Una vez que se tuvo acceso a la cámara pulpar se procedió a extraer el paquete vásculo nervioso con pulpótomos estériles.

La pulpa dental se llevo inmediatamente a un tubo ependof con medio de cultivo estéril.

2.2. Cultivos celulares primarios (hDPMSC) y de líneas

2.2.1. Digestión del tejido pulpar

El aislamiento de las hDPMSC se realizó inmediatamente de su resección quirúrgica dentro de los 90 min, transportándose las muestras en medio de cultivo

incompleto Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12) marca Sigma®, suplementado con antibióticos (penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 ug/ml) y antimicótico (anfotericina B 2,5 ug/ml) en condiciones refrigeradas. Se procedió a la remoción de restos de sangre (si los hubiera) y del pulpótomo en placas de Petri de 100 milímetros (mm). En un primer tratamiento, si intentó digerir la pulpa dental si trozar el tejido. Adicionalmente, en los siguientes ensayos, los trozos de tejido se cortaron con bisturí (técnica Choper) hasta lograr fragmentos de 1-5 mm³ y se lavaron varias veces con solución fría fisiológica suplementada con antibióticos y antimicótico. Luego, los pequeños fragmentos se digirieron en condiciones diferentes:

1. Digestión de la pulpa dental (entera) con **Tripsina** (0,1%; Bovina pancreatica; Sigma® (T1426) por 1, 2 o 3 horas a 37 °C con agitación del tubo Falcon cada 20 minutos. Se ensayaron cinéticas de digestión detenidas a los tiempos señalados en tubos Falcon de 50 ml con medio RPMI, en baño de agua termostatzado.
2. Digestión con **Tripsina** (0,1%; Bovina pancreatica; Sigma® (T1426) por 1, 2 o 3 horas a 37 °C con agitación del tubo Falcon cada 20 minutos. Se ensayaron cinéticas de digestión detenidas a los tiempos señalados en tubos Falcon de 15 ml en baño de agua termostatzado. Los trozos de tejido se suspendieron en medio RPMI.
3. Digestión con **Tripsina** (Bovina pancreatica 0,1%; Sigma® (T1426) de los trozos pulpares en medio RPMI por 1, 2 o 3 horas a temperatura ambiente con agitación del tubo Falcon de 15 ml en Saker a velocidad media. Se ensayaron cinéticas de digestión detenidas a los tiempos señalados.
4. Digestión con **Tripsina-EDTA**; Sigma® (T3924) (0.25%, filtrada estéril, de uso en cultivo celular, 2.5 g de tripsina porcina y 0.2 g EDTA • 4Na por litro de solución salina con rojo fenol) de los trozos pulpares en medio RPMI por 1, 2 o 3 horas a temperatura ambiente con agitación del tubo Falcon de 15 ml en Saker a velocidad media.

Estandarizando el tiempo de digestión en dos horas, también se ensayó la digestión con otras enzimas con o sin combinación de Tripsina según el siguiente detalle:

5. Digestión con **DNAsa** (Roche®; 0,5 mg/ml; pancreatica bovina) o **Colagenasa** (Tipo I; 1 mg/ml; Sigma® C0125) por 1, 2 o 3 horas a 37 °C con agitación del tubo Falcon (15ml) cada 20 minutos. Se ensayaron cinéticas de digestión detenidas a los tiempos señalados en baño de agua termostatzado. Los trozos de tejido se suspendieron en medio RPMI.
6. Digestion con **Tripsina-EDTA**; Sigma® (T3924) de los trozos pulparens en medio RPMI por 2 horas a 37 °C con agitación del tubo Falcon cada 20 minutos; y luego se formó un coctel agregando:
 - a. **DNAsa** (Roche®; 0,5 mg/ml; pancreatica bovina) por dos horas a a 37 °C.
 - b. **DNAsa** (Roche®; 0,5 mg/ml; pancreatica bovina) por 12 horas a °T ambiente con agitación en Shaker y,
 - c. **Colagenasa** (Tipo I; 1 mg/ml; Sigma® C0125) por dos horas a a 37 °C.

En todos los casos luego de la digestión, se agregó RPMI o DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB hasta completar el volumen del tubo, con el objeto de detener el proceso de digestión (Melana et al. 2016).

En el capítulo 3, en la **Tabla R-1** se presenta un resumen de los procedimientos empleados y los resultados obtenidos de este conjunto de ensayos (**Figura R-1**).

2.2.2. Recuperación de hDPMSC y amplificación

Una vez puesto a punto el método de digestión del tejido pulpar, un punto delicado de la técnica ha sido la separación definitiva de hDPMSC de fibroblastos y células de tejido conectivo no adherentes. Con la ayuda de Falcon® cell strainers de 40 µm (Corning) de nylon estériles se facilitó el aislamiento, para obtener rápidamente de manera consistente una suspensión de células primarias uniformes, separadas individualmente de los restos de tejido. De esta manera las células se filtraron y se centrifugaron durante 10 min a 1500 RPM. El pellet se resuspendió en 1-2 ml de medio suplementado y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer utilizando 10 µl de suspensión con

10 µl de azul de tripán 0.4 %. Se determinó el número de células viables/ml (células no teñidas) y el número de células totales/ml, ajustando la concentración celular a $5 \cdot 10^5$ células /ml. En placas de 24 pocillos se sembraron $1 \cdot 10^5$ células /ml y se incubaron por 2 h en estufa de cultivo Thermo Scientific Water Jacketed CO₂ Incubator (37 °C y 5 % de CO₂). Posteriormente los pocillos se lavaron con medio de cultivo para retirar las células no adherentes remanentes en flotación. Fue necesario lavar 3-4 veces a intervalos regulares de tiempo para eliminar totalmente restos de la digestión (Melana et al. 2016).

2.2.3. Cultivos de línea

Preosteoblastos MC-3T3 (ATCC® CRL-2593™) fueron cultivados en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; GIBCO BRL) o alpha MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y (P-S, como se indicó antes para el transporte del tejido pulpar). Esta línea celular representa un buen modelo para estudiar la diferenciación de osteoblastos *in vitro*, particularmente la señalización por adherencia a Matriz extracelular (ECM). Tienen un comportamiento similar a los osteoblastos primarios de hueso calvario. Las células fueron cultivadas hasta una densidad de $1-2 \cdot 10^6$ /placa de petri 100 mm y despegadas usando tripsina 0.25% a 37 °C. Se contaron las células por tinción con colorante supravital Tripan-blue y ajustaron a la cantidad requerida al momento de uso (Rodríguez et al. 2019).

Para los experimentos de evaluación de la adherencia celular a los andamios impresos con resina biocompatible, se usó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 originada de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC® TIB-71) y la línea de células embrionarias de riñón HEK-293 (ATCC® CRL-1573™). En ambos casos, las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina / estreptomina a 37 ° C en aire humidificado con 5% de CO₂.

Todas las líneas celulares fueron gentilmente donadas por el Dr. Jesús Balsinde del Instituto de Biología y Genética Molecular de la Universidad de Valladolid, Castilla y León, España.

2.2.4. *Mantenimientos de los cultivos*

Para las líneas celulares se utilizó el medio Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (GIBCO-Invitrogen), para crecimiento y propagación, suplementado con 10% de SFB inactivado por calor (GIBCO-Invitrogen), L-Glutamina (29,2 mg/ml), Penicilina (10,000 U/ml) y Estreptomina (10 mg/ml) (GIBCO-Invitrogen) como antibióticos. En el caso de las hDPMSC se usó la misma combinación, pero usando el medio alpha-MEM de GIBCO®.

Cuando las células llegaron a condiciones de confluencia, se procedió a subcultivar para asegurar el crecimiento exponencial de las células. El subcultivo celular permitió controlar la densidad del inóculo inicial que aseguro que se trabajara en condiciones de crecimiento óptimas para cada línea celular. Para ello, se observó al microscopio la botella que se iba a subcultivar para ver si la monocapa era continua y uniforme, se eliminó el medio de cultivo y se lavó con PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} . Se cubrió la monocapa con cantidad suficiente de una solución de Tripsina-EDTA 0.25% (GIBCO-Invitrogen) y se incubó durante 3-5 minutos a 37°C. Una vez que la monocapa se despegó, se agregó suero fetal bovino para inactivar la enzima y se pipeteo para disgregar agregados celulares. Se centrifugó a 800 - 1000 rpm durante 5 a 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se disolvió el pellet en medio suplementado con suero. Luego del recuento celular con azul de tripán entre $0,5 - 1 \times 10^5$ cel/ml se sembraron en placas o frascos estériles rotulando: línea, pasaje, medio y fecha correspondientes. Se incubó a 37 °C y 5% de CO_2 .

2.2.5. *Preservación de las células en nitrógeno líquido*

Para la *congelación* y preservación de cada línea se procedió a levantar la monocapa celular como se describió antes. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en medio de congelación: SFB con un 10% de Dimetilsulfoxido (DMSO) (Baker) como agente criopreservante. Se colocó en crioviales (1×10^6 cel –1 ml por criotubo) y se dejó en un Mr. Frosty a –80°C, un mínimo

de 5 días. Por último, los crioviales se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

En la descongelación, el objetivo del procedimiento es eliminar el medio de congelación, que contiene DMSO (Baker), molécula que resulta tóxica para las células en crecimiento. Se descongeló rápidamente el criovial a 37°C y una vez descongelado, se trasvaso el volumen de células con una pipeta a un tubo con 5 ml de medio de cultivo. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió nuevamente en 5 ml de medio de cultivo suplementado con SFB y se sembró en un frasco de 25 cm³. El frasco se colocó dentro del incubador y se realizó el cambio de medio a las 24 horas.

2.3. Evaluación de la expansión de cultivos MSC

2.3.1. Evaluación de viabilidad y/o proliferación celular con MTT

En todos los casos la viabilidad se determinó con coloración con Azul de Tripán como se explicó en el apartado 2.2.2.

Adicionalmente, los diferentes tipos celulares (cultivos primarios de hDPMSC y líneas celulares) se evaluaron con diferentes objetivos con la técnica del MTT. Para ello, se incubaron en placas de cultivo de 12 o 24 pocillos y se dejaron adherir incubando a 37 °C y 5 % de CO₂ en estufa de cultivo Thermo Scientific Water Jacketed CO₂ Incubator. A diferentes tiempos se centrifugaron las placas de cultivo a 1500 rpm a 4 °C y se removieron los sobrenadantes (que se conservaron a -80 °C para otros estudios). Se agregó 700 ul de nuevo medio de cultivo con 100 ul de MTT ((3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolium bromuro); 5 mg/ml) y se incubaron las placas en las mismas condiciones por 4 h más. Finalizado este tiempo se agregó 1 ml de etanol para disolver el colorante precipitado (formazán) y se tomaron alícuotas de 200 ul. La absorbancia de las mismas a 540 nm fue tomada en lectora de policubetas.

2.3.2. Determinación de parámetros cinéticos (K crecimiento y t^d de duplicación)

Cada población o línea celular tiene parámetros cinéticos que la caracterizan como son la constante de crecimiento (k) y el tiempo de duplicación (t_d). Si bien estos

parámetros son mas comunes en cultivos bacterianos o de levaduras para biorreactores, en este caso la determinación de los mismos caracteriza a una población de cultivo primario (Melana et al. 2016). En el apartado 3.3.1 se exponen las ecuaciones de uso y su aplicación a este caso.

A diferencia del uso de MTT para la evaluación de proliferación (descrito en la sección precedente) para este ensayo hemos usado el kit comercial CellTiter 96® (Promega). Este test se realizó agregando una solución coloreada de MTT (optimizada y premezclada) a los pocillos de cultivo de una placa de 96 wells. Durante una incubación de 2 horas, las células vivas convierten el componente de tetrazolio MTT de la solución en un producto de formazán, de la misma manera que en el ensayo anterior, pero con el beneficio adicional de no tener etapas de lavado, disolución de los cristales, precipitación de células, etc.

Los valores de absorbancia de MTT, se cargaron en PrismGraph for MacOS ver. 8.21 y se graficaron usando el modelo de crecimiento poblacional.

2.3.3. *Ensayos de scratch wound healing (Invasividad celular)*

Este ensayo permite evaluar la migración y el crecimiento de células en cultivo cuantificando distancias, superficies y/o tiempos de sellado en la reparación de una brecha o corte realizado en una monocapa de cultivo.

En policubetas de 12 wells se sembraron 1.10^5 células por pocillos y se dejaron crecer hasta confluencia del 80-90% en DMEM – F12 suplementado. Posteriormente, sin cambiar el medio, se marcó una línea recta lenta y cuidadosamente, en la monocapa con una punta plástica (10 ul) de micropipeta de 1.5 cm aproximadamente. La placa se lavó suavemente dos veces con medio para eliminar las células desprendidas, reponiendo con medio suplementado tibio. La brecha se monitoreó con registro fotográfico cada 6-12 h de cultivo hasta el sellado total (24 h). La superficie de separación de los frentes celulares generados, se evaluó cuantitativamente con el uso del software Image J. (Liang, Park, and Guan 2007)

2.4. Estrategias de Biología Molecular

2.4.1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA las células en monocapa (10^6 células), se lisaron con 1 ml de reactivo Trizol (Invitrogen). Las muestras homogenizadas se incubaron a 15 - 30°C durante 5 min. Se adicionó 200 ul de Cloroformo (Merck), se agito vigorosamente y se dejó reposar durante 5 min a 15 - 30°C. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm a 4°C, separando la fase orgánica de la fase acuosa. Se separó el sobrenadante acuoso y se agregó 500 ul de isopropanol (Merck), se agito y se dejó reposar 10 min a 15 - 30°C. Luego de centrifugar 5 min a 12000 rpm a 4°C se descartó el sobrenadante con cuidado y se dejó evaporar los restos de alcohol en estufa a 37°C. Una vez seco se agregó 45 ul de agua tratada con Dietilpirocarbonato (H_2O -DEPC) (Sigma) para solubilizar el RNA total precipitado.

2.4.2. Síntesis de cDNA

Mediante la retrotranscripción se sintetizó cDNA utilizando una retrotranscriptasa inversa viral M-MLV (Promega). Se incubaron 5 ul de RNA total (2 ug) con 0,5 ul (1 ug) de un cebador de oligo (dT), el cual hibrida con una cola de poliA de mRNA, llevando a 15 ul de volumen final a 70°C (temperatura de hibridación del cebador) durante 10 min. Posteriormente se añadieron los reactivos para la retrotranscripción que fueron los siguientes: buffer de reacción RT 1X- dNTPs- M-MLV- en el siguiente esquema:

- 5 ul buffer RT 1X
- 1 ul Retrotranscriptasa MMLV
- 0,5ul dNTPs
- 0,625 ul RNA Inhibidor
- 2, 725 agua libre de RNAsa.

El cDNA neo-sintetizado se conservó a -80 °C hasta el momento de uso. La reacción se realizó en termociclador Perkin Elmer 2400 durante 60 min a 42 °C. Tras ese tiempo la enzima se inactivó calentando la mezcla de reacción 15 min a 70 °C.

2.4.3. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se llevó a cabo con un equipo ABI 7500 (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA*) utilizando el Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Verde QPCR Master Mix (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA*) y los cebadores específicos para cada gen de interés. Las condiciones de ciclado fueron:

- 1 ciclo: 95 ° C durante 3 min
- 40 ciclos: 95 ° C durante 12s, 60 °C durante 15 s y 72 ° C durante 28 s.
- 1 ciclo final: 72 ° C durante 3 min.

Los cebadores fueron diseñados con la misma temperatura de fusión (± 3 °C) con el propósito de ser utilizados bajo el mismo programa de ciclado.

La abundancia relativa del mRNA para un gen dado se calcula utilizando el algoritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, con β -actina y la ciclofilina A como patrones internos. Se midió el nivel de expresión de los mensajeros de los siguientes mediadores: CD73; CD105 y la citoquina IL-10.

2.4.4. Control de especificidad de los cebadores

Todos los cebadores, previo a su empleo en las qPCR, fueron testeados utilizando una PCR convencional para luego controlar cada amplicón, en una electroforesis en gel de agarosa, a fin de comprobar su especificidad. Así, en cada caso, se constató la presencia de un único fragmento amplificado (demostrando, ausencia de uniones inespecíficas) y el tamaño del amplicón se cotejó con el obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

La secuencia de los cebadores utilizados:

CD73, Fw (TCATCCTGGCATCCCTCTTG), Rv (CCGTTGCCATTGTTGATCAC);
CD105, Fw (TGACATACAGCACCAGCCAG), Rv (AGCTCTGACACCTCGTTTGG):
β -actin, Fw (GTGCTTCTAGGCGGACTGTTAGA), Rv (CAC- GAATAAAGCCATGCCAAT);

2.5. Análisis por Citometría de Flujo

Fue utilizado un citómetro de flujo Partec - PASIII y los resultados adquiridos con el software Partec Flomax y analizados con FlowJo 8.0 for Mac.

El background fue calibrado antes de cada experimento usando los controles negativos. Las marcaciones dobles fueron compensadas para corregir solapamientos de emisión de fluorescencia y 2×10^4 eventos fueron analizados y grabados para cada muestra.

Los datos fueron recolectados en forma de histogramas y gráficos de punto (*dot plot*). La media y la mediana de la intensidad de fluorescencia, así como los porcentajes de eventos positivos fueron obtenidos después del análisis de los gráficos, usando el mismo software.

En cada caso, las células fueron recuperadas de la placa de cultivo y centrifugados a 4 °C por 10 min a 1500 RPM. El pellet celular se resuspendió en 100 ul de PBS filtrado y se le agregó 1-3 ul del anticuerpo por cada 10^6 células. Se usaron *mouse monoclonal antibodies* Abcam® dirigidos a CD90, CD105 y CD45 (ab92574; ab11414; ab8216) según recomendaciones del fabricante, y luego se incubó 1 h a 4 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron para lavar el exceso de anticuerpo no ligado dos veces. El pellet final obtenido se resuspendió en PBS y se fijaron con formol al 2 % hasta el momento de medición en el citómetro de flujo.

2.6. Diseño e impresión de andamios

El proceso de impresión 3D construye un objeto tridimensional a partir de un modelo de diseño asistido por computadora (CAD), generalmente agregando sucesivamente material capa por capa, por eso también se le llama fabricación aditiva. En el transcurso de la última década, la industria dental ha sido revolucionada por la tecnología de impresión 3D. Se han desarrollado varias aplicaciones diferentes de impresión 3D, desde arreglar dientes rotos hasta facilitar el uso del hilo dental. Las impresoras dentales 3D son muy precisas, por lo que las tecnologías más comunes utilizadas son la estereolitografía (SLA) y el procesamiento de luz digital (DLP). Dependiendo de la

aplicación, se utilizan diferentes resinas y se han creado muchas resinas especializadas únicamente para impresoras 3D dentales.

Para el diseño de andamios hemos utilizados Softwares de plataforma abierta, como por ej. Autodesk Meshmixer ver. 3.5 for MacOS (<http://www.meshmixer.com>) y BlueSkyBio (<https://blueskybio.com>). Asimismo para la impresión de andamios hemos utilizado una impresora 3D ANYCUBIC Photon® (<https://www.anycubic.com/collections/anycubic-photon-3d-printers/products/anycubic-photon-3d-printer>). La misma trabaja con las siguientes especificaciones técnicas:

- **Tecnología de impresión:** Impresora 3D SLA basada en LCD
- **Fuente de luz:** luz UV integrada (longitud de onda 405 nm)
- **XY DPI:** 47um (2560 * 1440)
- **Resolución del eje Y:** 1.25 um
- **Resolución de capa:** 25 ~ 100 um
- **Velocidad de impresión:** 20 mm / h
- **Potencia nominal:** 40 W
- **Tamaño de la impresora:** 220 mm * 200 mm * 400 mm
- **Volumen de impresión:** 115 mm * 65 mm * 155 mm (4.52 " * 2.56 " * 6.1 ")
- **Material de impresión:** resina fotosensible de 405 nm

A lo largo de la tesis se ha trabajado con diferentes materiales de injerto, como hueso particulado autólogo/heterólogo e injertos sintéticos (Ej. Hidroxiapatita). No obstante, recientemente, se lanzó al mercado una resina biocompatible capaz de ser utilizada en impresoras 3D y por ello, se ha utilizado la resina Cosmo® (<http://en.cosmopolymers.com/products/>) para la impresión de andamios.

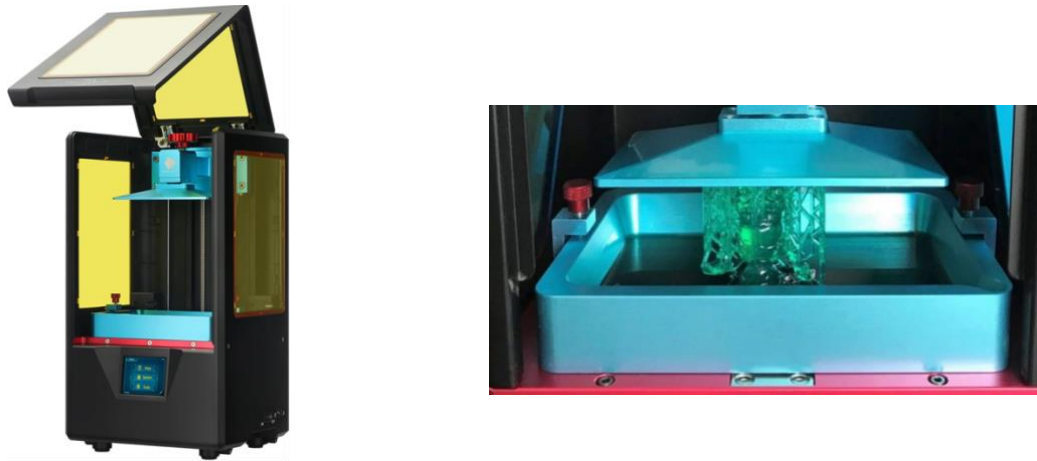


Figura M&M-1. Impresora 3D ANYCUBIC Photon®.

2.7. Análisis estadístico

Cada uno de los ensayos *in vitro* se realizó por triplicado. Los resultados de las diferentes determinaciones se expresaron como la media \pm DE. Las diferencias entre grupos se valoraron mediante ANOVA con posterior prueba de Tukey ($P < 0.01$ o $P < 0.001$, según el caso) utilizando el software GraphPad Prism® Ver. 8.0. for mac.

Your time is limited so don't waste it living someone else life

Steve Jobs (1955- 2011)

CAPÍTULO
3

RESULTADOS & DISCUSIÓN

Resultados

3.1. Obtención de Tejido pulpar y expansión de DPMSC en cultivo primario

3.1.1. Procedimientos quirúrgicos

3.1.2. Procedimientos previos al cultivo celular primario de expansión de DPMSC

3.2. Técnicas de digestión y rendimiento de cada procedimiento

3.3.1. Digestión del tejido pulpar

3.3.2. Evaluación de la expansión de cultivos DPMSC

3.3.3. Morfología de hDPMSC

3.3. Cinética de la división celular

3.3.1. Determinación de parámetros cinéticos (K crecimiento y t` de duplicación).

3.3.2. Ensayos de scratch wound healing (Invasividad celular). Comparación con MC-3T3.

3.4. Caracterización preliminar del fenotipo celular

3.4.1. Evaluación por qPCR de marcadores fenotípicos

3.4.2. Evaluación por citometría de flujo de marcadores fenotípicos

3.5. Evaluación funcional in vitro

3.5.1. Producción de citoquinas antiinflamatorias. Comparación con otras células.

3.5.2. Ensayos de adhesión celular

3.6. Montajes sobre andamios impresos

3.6.1. Diseño e impresión de andamios

3.6.2. Experimentos in vitro con andamios y líneas celulares

3.6.3. Microscopía electrónica de los andamios

3.1. Obtención de Tejido pulpar y expansión de hDPMSc en cultivo primario

3.1.1. Procedimientos quirúrgicos

La pulpa dental se obtuvo a través de la endodoncia de las piezas dentarías, de pacientes voluntarios con diagnóstico de pulpitis irreversible. Se usó la técnica convencional habitual en la atención odontológica general. Primero, se creó un acceso a la cámara pulpar (apertura), utilizando un instrumental rotatorio (turbina; 250.000-400.000 rpm), y luego mediante el uso de pulpótomos estériles, se realizó la extracción quirúrgica del tejido pulpar. Se trabajó con una cohorte de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión descritos en M&M (N=20). En el apartado siguiente se explican los procedimientos llevados a cabo con las muestras seleccionadas.

3.1.2. Procedimientos previos al cultivo celular primario de expansión de hDPMSC

Una vez obtenido el tejido pulpar como se describe en la sección precedente, maximizando los cuidados de esterilidad, los panículos tisulares se colocaron en medio DMEM-F12 (Sigma) frío con penicilina y estreptomina y antimicótico (anfotericina B) en falcon sellado, y se trasladaron al laboratorio. Según se describió en la M&M (Sección 2.2.) existen dos formas posteriores de tratamiento de la pulpa dental con diferentes rendimientos. Nosotros en esta tesis decidimos utilizar un procedimiento mixto que combina el uso de cortes tisulares (chopper) con una posterior digestión enzimática según se explica en la sección siguiente.

3.2. Técnicas de digestión y rendimiento de cada procedimiento

3.2.1. Digestión del tejido pulpar

La adhesión célula-célula en los tejidos está mediada por una variedad de receptores que interactúan homotípicamente (moléculas de adhesión celular o CAM), algunos de los cuales dependen del calcio (*cadherinas*) y, por lo tanto, son sensibles a los agentes quelantes como el EDTA. Las *integrinas*, que se unen al motivo arginina-

glicina-ácido aspártico (RGD) en la matriz extracelular, también tienen dominios de unión a Ca^{2+} y se ven afectadas por el agotamiento de este ión. La matriz intercelular y las membranas basales contienen otras glucoproteínas, como la *fibronectina* y la *laminina*, que son sensibles a proteasas, y los *proteoglicanos*, que son minoritarios, pero pueden ser degradados por glucanasas como la hialuronidasa o la heparinasa.

Por esto, se han ensayado diferentes posibilidades de procesamiento del tejido vasculo-nervioso, que se resumen en la Tabla R-1. Se decidió pasar de una solución de desagregación simple a una solución más compleja y evaluar el rendimiento celular obtenido. Se inició el tratamiento con tripsina sola o tripsina / EDTA como punto de partida, agregando o sustituyendo otra enzima (DNasa o Colagenasa) para mejorar la desagregación, y eliminando tripsina si es necesario para aumentar la viabilidad.

Además del procedimiento bioquímico de desagregación, se agregó la disgregación mecánica con bisturí con la técnica de chopper como se explica en materiales y métodos. Esta adición mejoró notablemente el proceso de obtención.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R-1**. Se observa claramente que, a mayor tiempo de digestión, la combinación de tripsina con colagenasa produce el mejor rendimiento. No obstante, en todos los casos de digestión de 12 horas, se observó un notable aumento de células muertas (teñidas con azul de Tripán; datos no mostrados) junto a los restos de tejido no disgregados.

Siempre existe el riesgo de inactivación enzimática en los cócteles con proteasas, ya que la proteólisis resultante termina inactivando a las mismas. La DNasa, no funcionó cuando se usó en combinación con tripsina (Datos no mostrados). Por ello se agregó antes o bien después de que la tripsina se haya inactivado. Como se observa en la **Figura R-1**, si bien la combinación de cócteles tuvo mejores rendimientos, tampoco fueron significativamente mayores en comparación con las digestiones realizadas solo con tripsina (ambas están en el mismo orden $2.5-3 \cdot 10^4$). El tiempo de digestión, mostró similar comportamiento, aunque es de resaltar lo antes mencionado con la aparición de células muertas.

Tabla R-1. Procedimientos usados en la disociación celular del tejido pulpar

Enzima	Pretratamiento	Disgregación	Tiempo y T° de Incubación /Medio usado	Observaciones
Tripsina	Lavado con medio incompleto o PBS tibio	Agitación	1-3 h / 37°C / RPMI (incompleto)	Agitación del tubo Falcon cada 20 minutos
Tripsina	Lavado con medio incompleto o PBS tibio	Chopper / agitación mecánica	1-3 h / 37°C / RPMI (incompleto)	Agitación del tubo Falcon cada 20 minutos
Tripsina	Lavado con medio incompleto o PBS tibio	Chopper / agitación mecánica	1-3 h / T° ambiente /RPMI (incompleto)	Shaker a velocidad media
Tripsina - EDTA	Lavado con medio incompleto o PBS tibio	Chopper / agitación mecánica	1-3 h / T° ambiente /RPMI (incompleto)	Shaker a velocidad media
DNasa	Lavado con medio incompleto o PBS tibio	Chopper / agitación mecánica	2 h / 37°C / RPMI (incompleto)	Agitación del tubo Falcon cada 20 minutos
Colagenasa	Lavado con medio incompleto o PBS tibio	Chopper / agitación mecánica	2 h / 37°C / RPMI (incompleto)	Agitación del tubo Falcon cada 20 minutos
Tripsina – EDTA/DNasa	Lavado / Pos-incubación con DNasa por 2 h a 37 °C	Chopper / agitación mecánica	2 h / 37°C /RPMI (incompleto) // 2 h / T° ambiente / RPMI (incompleto)	Agitación del tubo Falcon cada 20 minutos // Shaker a velocidad media
Tripsina – EDTA/DNasa	Lavado / Pos-incubación con DNasa por 2 h a 37 °C	Chopper / agitación mecánica	2 h /RPMI (incompleto) // T° ambiente 12 h /RPMI (incompleto)	Agitación del tubo Falcon cada 20 minutos // Shaker a velocidad media
Tripsina – EDTA/Colagenasa	Lavado / Pos-incubación con Colagenasa por 2 h a 37 °C	Chopper / agitación mecánica	2 h /RPMI (incompleto) // T° ambiente 12 h /RPMI (incompleto)	Agitación del tubo Falcon cada 20 minutos // Shaker a velocidad media

La elección de qué grado de tripsina usar siempre es algo difícil de estandarizar que merece discusión. Hay dos tendencias opuestas: (1) cuanto más pura es la tripsina, menos tóxica se vuelve y más predecible es su acción; (2) cuanto más cruda sea la tripsina, más efectiva puede ser, debido a la presencia de otras proteasas. Nosotros hemos realizado pruebas preliminares, para determinar el grado óptimo para el rendimiento celular viable, y los resultados mostrados fueron obtenidos usando Tripsina al 0.1%. La actividad residual después del lavado, fue neutralizada por el suero del medio de cultivo.

Para todos los experimentos sucesivos, en cada obtención de hDPMSC, se eligió una digestión con Tripsina a 37°C por 2 h. Similares procedimientos han sido descritos aunque no se publican los rendimientos obtenidos ni los cócteles empleados (Zomer et al. 2018).

3.3.2. Evaluación de la expansión de cultivos hDPMSC

Los resultados mostrados en la Figura R-1 corresponden al conteo celular (eje ordenada izquierdo) o a una medida indirecta de la cantidad de células presentes en el cultivo, como es la

cantidad de formazan detectada, producto de la actividad mitocondrial total (eje ordenada derecho). Luego de la digestión enzimática del tejido, con la ayuda de un *cell strainer*, se separaron las células disgregadas del resto del tejido, y se pasaron a otro tubo falcon de 50 ml. Al mismo se le agregó igual volumen de medio de cultivo con SFB. Luego de una centrifugación suave, como se indica en M&M, las células no sedimentadas disgregadas se separaron por flotación y el pellet se resuspendió en 2.5 ml de medio suplementado con SFB y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer utilizando 10 ul de suspensión con 10 ul de azul de tripán 0.4 %. Se determinó el número de células viables/ml (células no teñidas) y el número de células totales/ml. Posteriormente, las células fueron sembradas en placas de Petri de 30 mm o en policubetas de 6 well y se dejaron adherir. A las 24 h, se retiró el sobrenadante de cultivo y se reemplazó por medio de cultivo nuevo. Este procedimiento se realizó varias veces, hasta eliminar totalmente las células no adherentes.

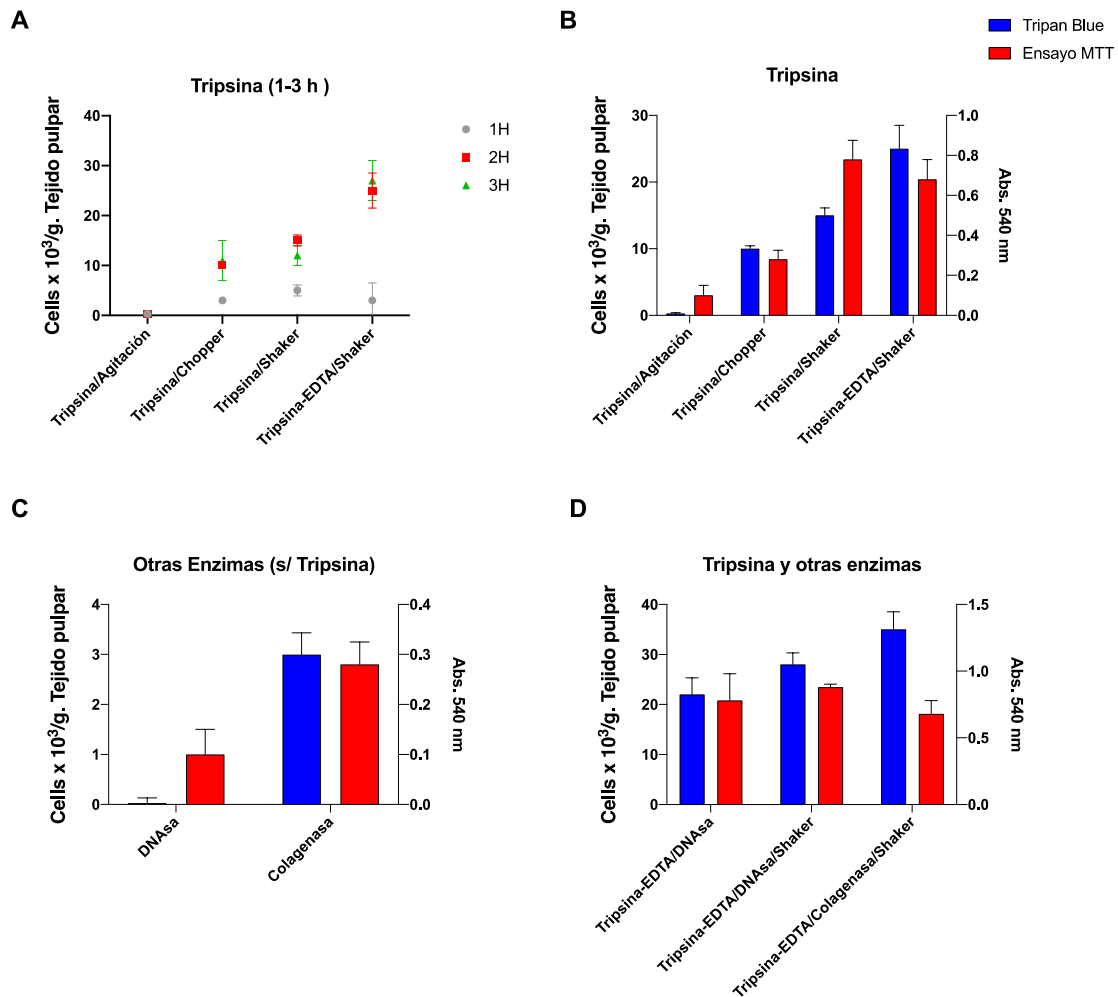


Figura R-1. Diferentes métodos de disgregación del tejido pulpar. El tejido dental fue obtenido de pacientes y trasladado al laboratorio en condiciones asépticas. La disgregación celular pulpar es el paso clave para la recuperación de las hDPMSC intersticiales. Distintos métodos fueron ensayados, con variables resultados, según se describen en la Tabla R-1 y en Materiales y Métodos. **A.** Utilizando Tripsina únicamente, se realizó primeramente una cinética de digestión. Dado que no existen diferencias entre los rendimientos obtenidos con 2 y 3 h de digestión se consideró el tiempo de 2 horas. **B.** Comparación del conteo celular con la actividad mitocondrial evaluada con MTT. **C.** Evaluación de la digestión de otras enzimas sin tripsina con 2 horas de digestión a 37 °C. **D.** Cócteles de digestión con acción combinada de Tripsina, Colagenasa y DNasa. Considerando los rendimientos obtenidos se adoptó la digestión con Tripsina-EDTA/shaker para los sucesivos experimentos.

Al momento de evaluar viabilidad (en adición al conteo por tripán) se agregó una solución de MTT (3 mg/ml). La actividad mitocondrial de las células remanentes se cuantificó como se explica en M&M y se muestra en la Figura R-1.

Una vez puesto a punto el ensayo de digestión, y la obtención de la primer monocapa en placas de Petri, se amplificaron las células en botellas T-75 hasta adquirir un número suficiente de las mismas para los experimentos restantes. Luego, 1.10^6 células/ml se mezclaron con medio criogénico y se depositaron en crioviales. Los mismos se colocaron en un Mr. Frosty para disminuir la T° $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -80°C . Posteriormente los crioviales se pasaron a Nitrógeno líquido (-190°C). Estos métodos han sido ampliamente validados por nuestro laboratorio (Melana et al. 2016; Echeverría et al. 2018).

3.3.3. Morfología de hDPMSC

En principio la población celular, resultante de la digestión es muy heterogénea, y quedan restos de células no adherentes que se van eliminando con los sucesivos lavados con medio incompleto. La monocapa adherente que se muestra en la **Figura R-2** se empieza a visualizar 48 h después y se torna totalmente confluyente entre las 72 y 96 h.

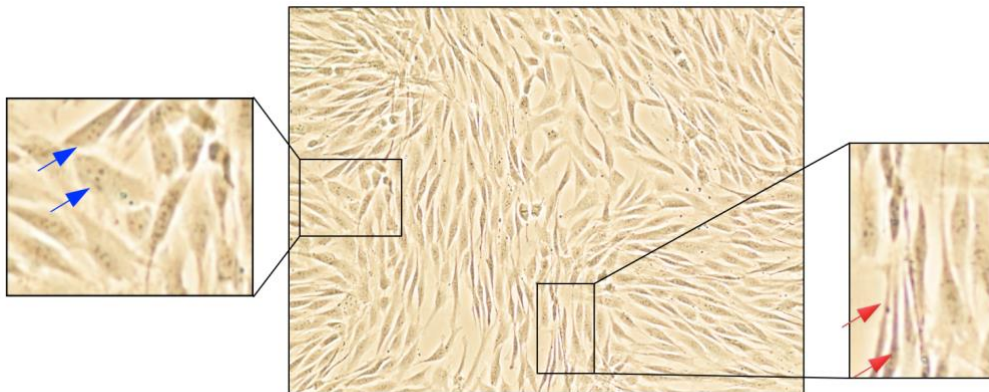


Figura R-2. Aspecto del cultivo celular primario de hDPMSC. Imágenes del cultivo primario de hDPMSC que muestra al menos dos tipos diferentes de morfología en función del microambiente circundante. Cuando las células tienen espacio, primeramente, forman espículas alargadas en donde el largo predomina francamente sobre el ancho (flechas rojas). A medida que la monocapa confluye, las mismas se vuelven más poliédricas o triangulares (Flechas azules). Magnificación 40X

Esta morfología es diferente a la fibroblástica (Christy et al. 2019; Estève et al. 2019) y está en consonancia con lo descripto para células mesenquimales humanas

(hMSC). Las hMSC se obtienen de muy diversas fuentes, siendo las más comunes la médula y sangre periférica. Aunque otras fuentes más infrecuentes están siendo utilizadas como sangre de cordón, sinovia y ligamento periodontal (Rajabzadeh, Fathi, and Farahzadi 2019).

Las hMSC contienen tres subpoblaciones distintas: (A) *células pequeñas*, triangulares o en forma de estrella con regiones de membrana acentuadas; (B) *células alargadas*, de tipo fibroblástico, en forma de huso; y (C) *células grandes y aplanadas* con núcleo prominente, llamadas FC. Si bien estas poblaciones se describieron en principio con marcadores fenotípicos propios (Tapp et al. 2009), estudios recientes con técnicas multi-ómicas muestran que morfología y fenotipo van mutando en las sucesivas divisiones celulares, cambiando su perfil de activación de genes, expresión de enzimas y receptores entre otros (Peffer et al. 2016). Véase el apartado 3.4.1. donde se profundiza la caracterización fenotípica.

3.3. Cinética de la división celular y capacidad de migración

3.3.1. Determinación de parámetros cinéticos (*K* crecimiento y *t* de duplicación)

El ensayo de proliferación celular por MTT permite un conteo simple, preciso y altamente reproducible de las células metabólicamente activas, basándose en la reducción metabólica del Bromuro de [3-(4,5-dimethylthiazol - 2 -yl) - 2,5 - diphenyltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, convirtiéndose en un compuesto coloreado de color púrpura (formazán) permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Las hDPMSC se cultivaron por triplicado en placas de 24 wells. En todos los casos se colocó 5×10^5 células/pocillo y se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ en estufa. Se removieron los sobrenadantes y luego las células se lavaron con PBS. Sobre la monocapa se agregó 700 ul de medio de cultivo sin suplementar y sin rojo fenol con 100 ul de MTT (1 mg/ml) Cell Titter® y se incubaron nuevamente en las mismas condiciones por 2 h adicionales. Finalizado este tiempo, las

células se protegieron de la luz y posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro (Jenway 7305®). Las absorbancias registradas se asumieron como medida indirecta de masa celular viable.

Se evaluó la cinética de crecimiento en la fase exponencial (fase log) y se determinaron los parámetros cinéticos para cada población celular. La Figura R-3, muestra los datos obtenidos y una comparación, tomando como referencia los parámetros conocidos de una línea comercial cultivada en paralelo de preosteoblastos (MC-3T3 ATCC® CRL-2593™). La Tabla R-2 muestra los parámetros cinéticos (k, y tiempo de duplicación), con un 95% de confiabilidad.

Como se advierte, la curva de crecimiento (**Figura R-3**) se ajusta a una ecuación del tipo exponencial:

$$N = N_o \cdot e^{k \cdot t} \quad (1)$$

donde N_o es el número inicial de células, t es el tiempo de crecimiento, N es el número de células al tiempo t y k es la constante de crecimiento. De la ecuación (1) puede deducirse el tiempo de duplicación de la población celular (t_d) según la expresión (2):

$$t_d = \ln 2/k = 0,69 / k \quad (2)$$

Del análisis de la Tabla R2 puede verse que el cultivo de preosteoblastos (MC-3T3) es levemente más rápido que el de hDPMSC, pero está en consonancia con lo publicado por nuestro grupo para otras líneas celulares (Melana et al. 2016).

3.3.2. Ensayos de scratch wound healing (Invasividad celular)

El ensayo de *scratch wound healing* (del inglés cicatrización de heridas por rasguño), es un test *in vitro* fácil, de bajo costo y bien desarrollado para medir la migración celular en cultivos.

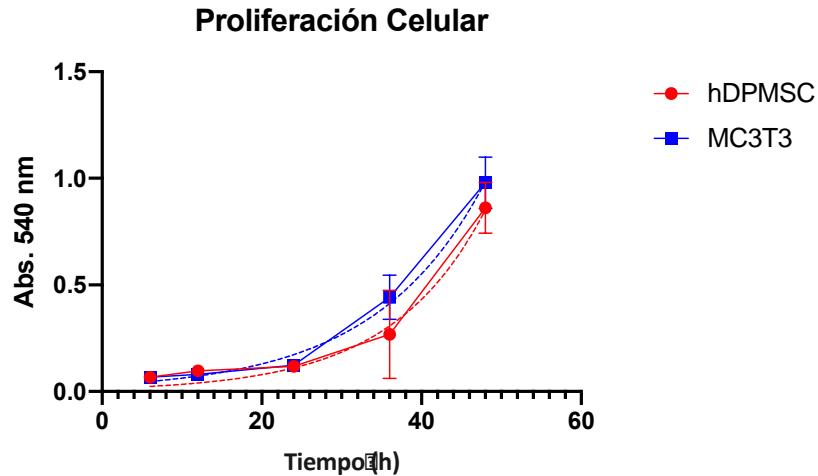


Figura R-3. Determinación de parámetros cinéticos del cultivo celular primario de hDPMSC. Determinación de k y t_d , para las hDPMSC y comparación con los parámetros de una línea celular de crecimiento rápido, como la línea MC-3T3.

Tabla R-2. Parámetros cinéticos determinados para dos poblaciones celulares: hDPMSC y MC-3T3 ¹

Población celular	<i>hDPMSC</i>	<i>MC-3T3</i>
Best-fit values		
N_0	0,01442	0,03036
k	0,08498	0,07247
T_d	8,157	9,564
95% CI (profile likelihood)		
N_0	0,002100 to 0,04417	0,01545 to 0,05162
k	0,06033 to 0,1258	0,06073 to 0,08703
Doubling Time	5,511 to 11,49	7,964 to 11,41
Goodness of Fit		
Grados de libertad	13	13
R^2	0,9065	0,9661

¹ Muestra valores de la ecuación exponencial de donde se obtiene experimentalmente la constante de crecimiento (k) para cultivos de hDPMSC. Se tomó como referencia una línea celular con k conocida y crecimiento de duplicación muy próximo al ideal ($R^2=1$).

Los pasos básicos implican crear un "rasguño" en una monocapa celular, capturar las imágenes al principio y a intervalos regulares durante la migración celular para cerrar el rasguño y comparar las imágenes para cuantificar la tasa de migración de las células.

En policubetas de 12 wells se sembraron 1.10^5 células por pocillos y se dejaron crecer hasta confluencia del 80-90%. Posteriormente, como se describe en materiales y métodos, se realizó un scratch con una punta plástica de micropipeta. A los tiempos indicados en la **Figura R-4** (A, B y C), se fotografió la herida y se determinó el tiempo en que toda la superficie de la misma se cubrió nuevamente con células (**D, E y F**).

Se obtuvo una velocidad de cierre de $119 \mu\text{m}^2$ por hora, lo cual está en consonancia con otros resultados del laboratorio, y es comparable a la invasividad de una línea celular tumoral agresiva como son las HCT (cáncer de colon) o las Caki-2 (Carcinoma renal).

3.4. Caracterización preliminar del fenotipo celular

3.4.1. Evaluación por qPCR de marcadores fenotípicos

Como se mencionó en la introducción la mayoría de los tejidos adultos contienen poblaciones celulares capaces de renovarse después de un trauma, enfermedad o envejecimiento (Pittenger et al., 1999). Estas células se denominan *células madre* (o troncales) y, en principio, serían un reservorio de células indiferenciadas. Las MSC en general tienen la capacidad de diferenciarse en células de origen mesodérmico como *adipocitos, fibroblastos, miocitos, osteoblastos*, entre otros (Meruane and Rojas 2010). Por lo tanto, es importante el establecimiento del fenotipo de las células obtenidas.

Rajabzadeh y colaboradores estudiando hMSC de diferentes orígenes caracterizaron una docena de marcadores, que necesariamente deben estar presentes incluyendo: CD73, CD58, CD90, CD44, CD105, CD29, OCT4, Nanog, CD166, CD49e, MHC II y otros. Además puntualizaron que es necesaria la exclusión de: CD14 (marcador de monocitos), CD34 (stem cells hematopoiéticas) CD45 marcador panleucocitario, con

mayor expresión en células T), CD31 (progenitores mieloides; monocitoides) y CD133 (Rajabzadeh, Fathi, and Farahzadi 2019).

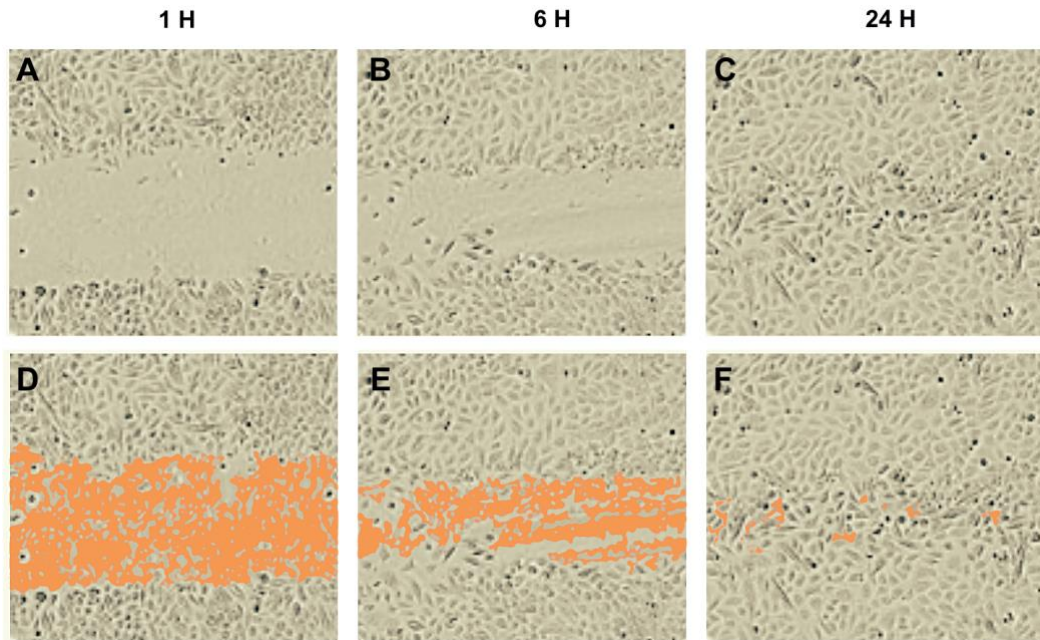


Figura R-4. Análisis de la migración primaria de hDPMSC por ensayo de rascado *in vitro*. A-C. Las imágenes fueron tomadas a tiempos fijos 1, 6 y 24 horas luego de efectuado el *scratch*. D-F. Las fotografías posteriormente fueron analizadas con ImageJ ver 1.5 (NIH), para cuantificar la superficie del área de rascado. A cada tiempo las áreas libres de células se colorearon con pixeles naranjas y se cuantificaron. Nótese como cambia la morfología celular en función del % de confluencia (Ver Figura R-2). Magnificación 40X.

Para la evaluación de CD73 y CD105, el RNA total se extrajo de 1.10^6 hDPMSC previamente sembradas en placas de petri de 100 mm. Se obtuvo cDNA a partir de ellas como se detalla en M&M y se constató la expresión de los mismos tal como se muestra en la **Figura R-6**.

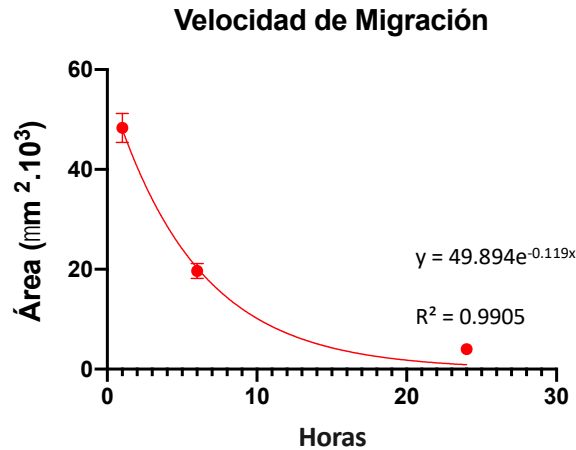


Figura R-5. Velocidad de cierre del Scratch *in vitro*. Cuantificación del área de cierre y ajuste a una ecuación exponencial.

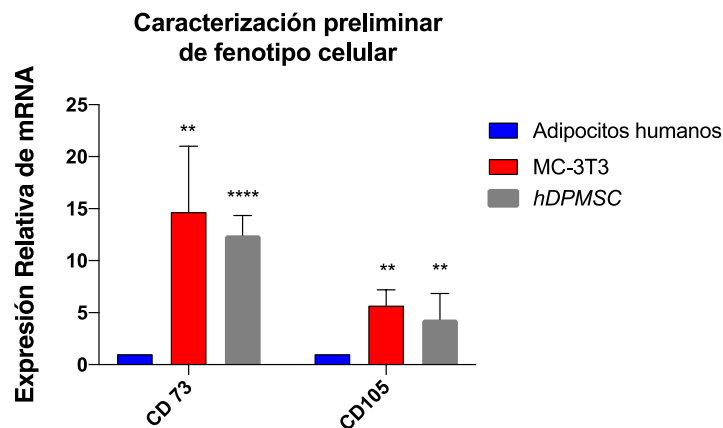


Figura R-6. Expresión de mRNA de CD73 y CD105. Las MSC crecidas en monocapa, se cultivaron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Se extrajo el RNA celular total y se analizó la expresión del mRNA codificante para los marcadores mostrados mediante RT-qPCR utilizando cebadores específicos. Como gen de referencia (House keeping) se usó la β -Actina humana. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$.

Los marcadores ensayados, claramente muestran distinciones en cuanto a la diferenciación celular, los adipocitos prácticamente no muestran expresión de los mismos, en tanto que los preosteoblastos y las hDPMSC tienen niveles muy elevados. Si bien CD73 y CD105 no servirían como marcadores de distinción entre MC-3T3 y

hDPMSC, esta situación no se da en condiciones fisiológicas. Lo que sí puede darse es que además de hDPMSC, se adhieran a la placa fibroblastos, sin embargo no se ha informado que los mismos presenten estos niveles de expresión de dichos marcadores (Kahounová et al. 2018). Además, estas células tienen otro tamaño y otra granularidad citoplasmática. Para una caracterización mas detallada, desarrollamos ensayos de citometría de flujo.

3.4.2. Evaluación por Citometría de flujo de marcadores fenotípicos

En rigor, la determinación del fenotipo celular debe determinarse por citometría de flujo. Para ello, se utilizaron los criterios de la *Sociedad Internacional de Terapia Celular para células linfocíticas* para determinar el fenotipo de hDPSC (Dominici et al. 2006). Después del proceso de digestión de la pulpa dental de varios donantes (n=3) y posterior formación de monocapas, las células se levantaron con tripsina y se fijaron para citometría como se describe en M&M. Las células despegadas se ajustaron a 1.10^6 células/ml y se usó una mezcla de anticuerpos para el fenotipado. Los marcadores se detectaron usando anticuerpos (todos mouse monoclonal antibodies Abcam®) dirigidos a CD90, CD105 (ab92574; ab11414), y la exclusión de CD45 (ab8216). Hemos observado que las células efectivamente expresan estos marcadores, y también constatamos la exclusión del marcador panleucocitario CD45. La Figura R-8 muestra los histogramas de marcación correspondientes.

Estos resultados están en consonancia con los ya mostrados por otros autores, obteniendo células hDPMSC con similares procedimientos (C. Huang et al. 2020; G. T. J. Huang, Gronthos, and Shi 2009a; Zomer et al. 2018).

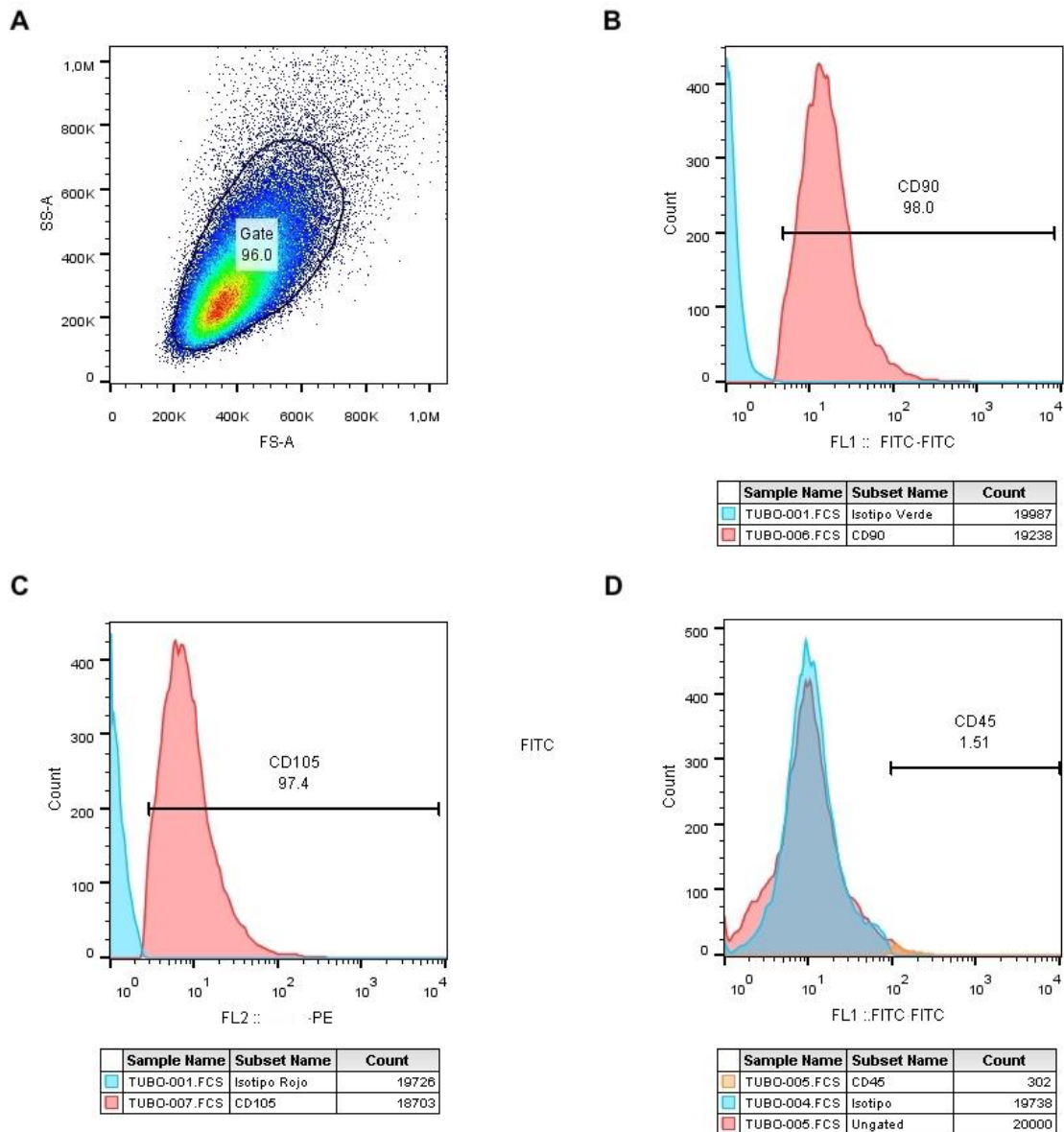


Figura R-8. Determinación por citometría de flujo de marcadores de superficie en hDPSC. Las hDPSC se aislaron de la pulpa dental de dientes permanentes de tres donantes sanos. **A.** El análisis por citometría de flujo mostró una población celular homogénea con un tamaño y granularidad que permitió la selección del 96% de ellas. **B – C.** Las células mostraron marcación positiva para los marcadores mesenquimales CD90, CD105 y negativa para un marcador hematopoyético temprano CD45 (**D**). En celeste se muestra la marcación del isotipo y en rojo los respectivos CDs. Se registraron 20000 eventos y los markers de histograma muestran los porcentajes de marcación positiva. Las marcas se obtuvieron de células de pasaje cuatro por triplicado. Los datos corresponden a un experimento representativo.

3.5. Evaluación funcional preliminar *in vitro*

3.5.1. Producción de citoquinas antiinflamatorias

Se ha demostrado en modelos *in vitro* de hMSC obtenidas de médula ósea, que influyen en el sistema inmune innato al suprimir la maduración y la activación de las células dendríticas (DC) y la citotoxicidad de las células asesinas naturales (Células NK). También interactúan con las respuestas inmunes adaptativas al inhibir la proliferación y la secreción de citocinas de las células T y la maduración de las células B (Wen et al. 2014). Todo lo anterior, y otros experimentos no mencionados, hace inferir que las hMSC son productoras de citoquinas antiinflamatorias.

Para demostrar si las hDPMSC obtenidas con el protocolo anteriormente descrito, poseen algún rol en la inmunoregulación que potencialmente pueda ser útil en modelos *in vivo*, determinamos por RT-qPCR si expresan innatamente IL-10, en comparación a adipocitos extraídos de tejido adiposo humano. Se eligieron adipocitos humanos por su facilidad de obtención y porque son células bien diferenciadas, cuyos precursores *in vitro* podrían ser las hDPMSC.

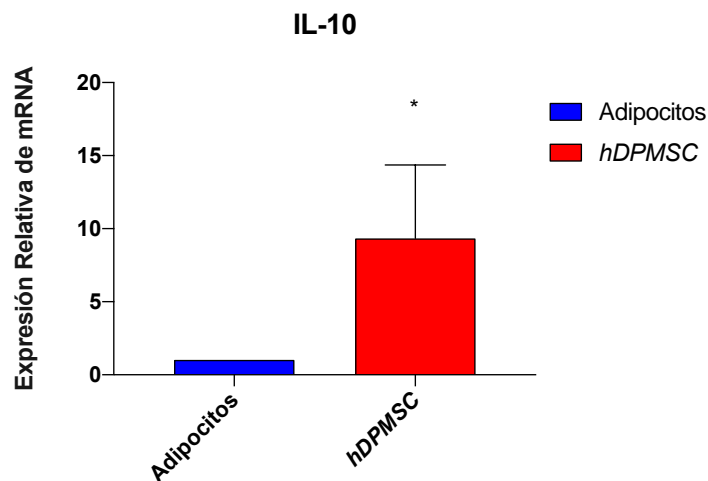


Figura R-8. Expresión de mRNA de IL-10. Las hDPMSC crecidas en monocapa, se cultivaron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Se extrajo el RNA celular total y se analizó la expresión del mRNA codificante para la citoquina mostrada mediante RT-qPCR utilizando cebadores específicos. Como gen de referencia (House keeping) se usó la β -Actina humana. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$.

Para influir eficazmente en la inmunorregulación, la activación de hMSC requiere un microambiente inflamatorio y estimulación por citocinas proinflamatorias, como IFN- γ y TNF- α , de células T efectoras (Leto Barone et al. 2013).

Varios factores solubles producidos por MSC están involucrados en la inmunosupresión que las mismas poseen. Estos factores incluyen TGF- β , IL-6 e IL-10, y otros mediadores que incluyen eicosanoides y enzimas (prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina-2, 3-di-oxigenasa (IDO) y MMPs)(Christy et al. 2019). Además, las MSC pueden disminuir el nivel de expresión de IFN- γ de las células Th1 y aumentar los niveles de expresión de IL-4 e IL-10 de las células Th2, promoviendo así la respuesta inmune de las células T CD4+ vírgenes hacia la respuesta de tipo Th2. Cuando se cultivan conjuntamente y se ponen en contacto con células T vírgenes, las MSC humanas promueven la diferenciación y expansión de las células T reguladoras (Tregs). Las Tregs, un subconjunto especializado de células T, poseen capacidad para suprimir la respuesta de las células T y evitar la sobreactivación del sistema inmune. También se sugirió que las MSC mantengan la tolerancia y mejoren la supervivencia de los aloinjertos en el trasplante de órganos sólidos principalmente a través de la función de Tregs (He et al. 2015).

Hasta el momento no se han diseñado experimentos que permitan evaluar si las DPMSC *in vivo* tienen un rol efectivo en la inmunoregulación. De ser así, podrían constituir un elemento clave para evitar la aparición indeseable de focos inflamatorios que lleven al fracaso de cualquier intento de implante que se piense en algún lugar del sistema fisiológico.

En adición a sus propiedades inmunoreguladoras, durante la última década, ha llamado la atención el uso de MSC como herramienta terapéutica en el trasplante de células y órganos sólidos y/o andamiajes sólidos para promover la mejora de injertos y disminuir el rechazo orgánico. Las MSC se utilizaron por primera vez con éxito en un modelo de trasplante de aloinjerto de piel de babuino y se exploraron en otros modelos de trasplante de órganos sólidos, como corazón, islotes pancreáticos y riñón (Fuentes-Julián et al. 2015; Bobis, Jarocha, and Majka 2006; La Noce et al. 2014; He et al. 2015).

La fácil obtención de estas células, su capacidad de adherencia descrita, sus aparentes funciones en inmunoregulación, constada por nosotros y por otros autores, sumado a su función de diferenciación por excelencia a odontoblastos, nos llevó a plantear la siguiente serie de experimentos que se describen en el apartado 3.6.

3.5.2. Ensayos de adhesión celular

El mecanismo por el cual las células se unen entre sí y con la matriz extracelular (ECM) está regulado por una gran familia de receptores transmembrana (Sorokin 2010). La adhesión celular desempeña un papel fundamental en el crecimiento celular, la supervivencia, la motilidad, así como un componente necesario para la diferenciación celular. Es por eso, que si las hDPMSC han de jugar un rol clave en experimentos *in vivo*, las mismas deben tener la capacidad de poder adherirse a una gran variedad de superficies. Por esto, se probó la adherencia de las mismas en: superficies de colágeno, colágeno con impregnaciones de hueso particulado y fibronectina. Para evaluar adherencia celular a Colágeno, como se indica en Materiales y Métodos, se probó cultivar las hDPMSC en placas con colágeno comercial (40 g/ml) y con gelatina (0,2 % P/V) con hueso particulado bovino (Ostium®) disuelto en el medio de cultivo.

La fibronectina es una glucoproteína de alto peso molecular presente en la matriz extracelular (ECM). Con el objeto de evaluar, si las hDP-MSK son capaces de adherirse a la misma, se usaron placas de cultivo recubiertas con fibronectina CELLCOAT®. Como se muestra en la Figura R-9, las células obtenidas mostraron adherencia en todas las superficies ensayadas. Si bien con el tiempo, todas llegaron al 100% de confluencia, hemos observado, que las células crecen menos en placas que tienen solo fibronectina.

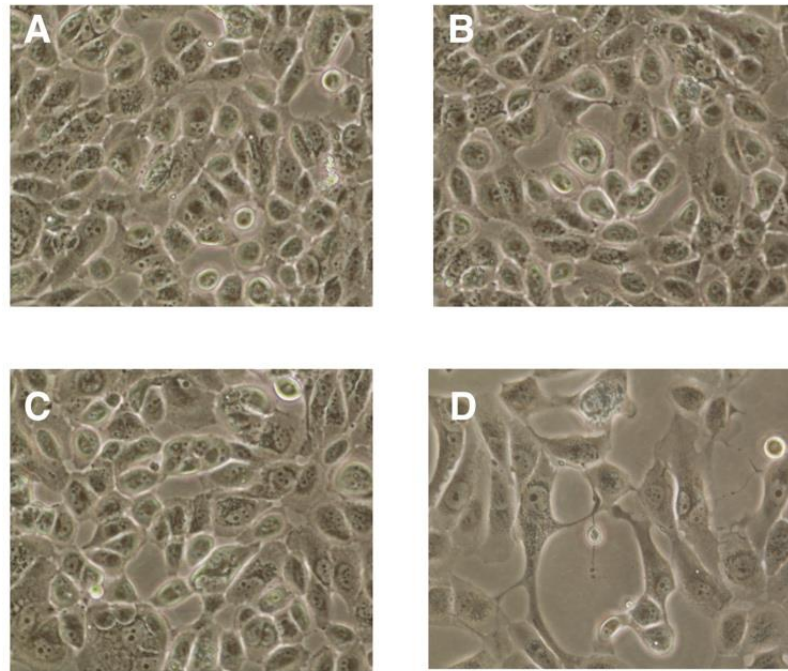


Figura R-9. Adherencia de hDPMSC a diferentes superficies. Monocapas con 48 horas de evolución. **A.** Placas de cultivo celular sin tratamiento previo. **B-C.** Placas de cultivo con una fina película de una solución de colágeno comercial (40 g/ml) o gelatina (0,2 % P/V) mezclado con hueso particulado. **D.** Placas CELLCOAT®. Magnificación 40x.

3.6. Montajes sobre andamios impresos

3.6.1. Diseño e impresión de andamios

Como se expone en la introducción, un factor que acelera la regeneración ósea viene dado por el uso de andamios biocompatibles. El objetivo de los mismos es proveer de un ambiente estable y promover la osteointegración en el sitio en donde se requiera (ej. En el lugar del maxilar donde se necesite mejorar el terreno para la posterior rehabilitación con implantes dentarios).

Recientemente, se han presentado resinas biocompatibles de impresión 3D. Estas resinas han sido pensadas y comercializadas para el uso clínico odontológico (fabricación de guías quirúrgicas y piezas dentales provisionarias). No obstante, en esta tesis, evaluamos la posibilidad de darle otra aplicación a una de ellas, en la impresión 3D de andamios osteointegrables.

Para ello, usando la resina Cosmo® hemos desarrollado diferentes tipos de diseños; andamios con figuras geométricas estándares, y andamios personalizados a medida de los defectos óseos y espacios alveolares. Para los experimentos *in vitro* de esta tesis, se usaron primeramente andamios estándares, en forma y tamaño, como se muestran en la **Figura R-10**.

Como se explica en materiales y métodos, el diseño se realizó utilizando los programas **Mesh Mixers** y **Blue Sky plan** que son softwares de diagnóstico y diseño arquitectónico con un amplio uso en odontología para encerados digitales, creación de guías quirúrgicas y planificación digital en los métodos de *work flow*.

El diagnóstico de los defectos óseos y alveolos pos extracción se realizó siempre con Tomografía Axial de haz cónico (cone beam). Con las mismas pudimos obtener cortes sagitales cada 1mm y reconstrucciones volumétricas precisas y exactas en forma de archivos con formato DICOM. Los mismos se exportaron para su posterior utilización en los softwares anteriormente mencionados para el diseño de los andamios.

A continuación, utilizamos la impresora Anycubic 3D® logrando las formas diseñadas. La **Figura R-10** muestra andamios de diferentes volúmenes y formas geométricas sin adaptación preajustada a los alvéolos. Esto implica que, en su futura utilización, los mismos se insertan en la cavidad alveolar usando presión sobre la misma para deformar y ajustar el andamio, con o sin la combinación de otro material de relleno óseo.

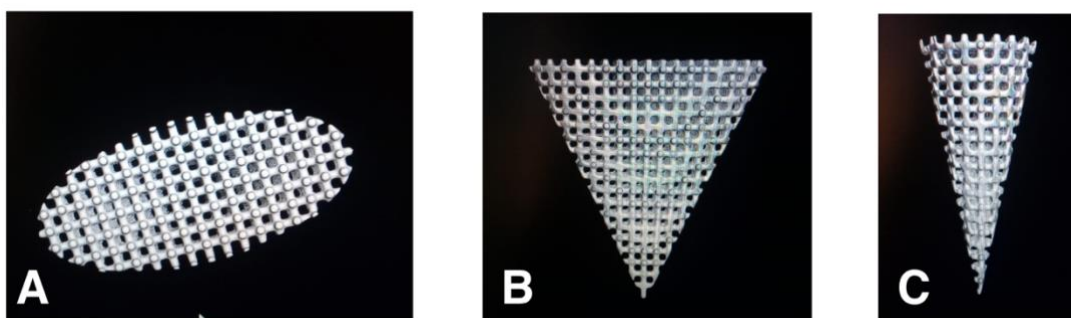


Figura R-10. Diseño de impresiones 3D de andamios estándares. Se usó una impresora 3D ANYCUBIC con resina biocompatible Cosmo® de uso odontológico intrabucal. **A - C.** Muestran andamios de tamaños y formas tradicionales.

Recientemente, nuestro equipo de investigación inició el diseño de andamios totalmente adaptables a los defectos particulares de cada caso clínico, es así que logramos obtener andamios que pueden ser de utilidad en los defectos óseos producidos por las diferentes patologías y también ser usados para el relleno inmediato de alveolos pos extracción.

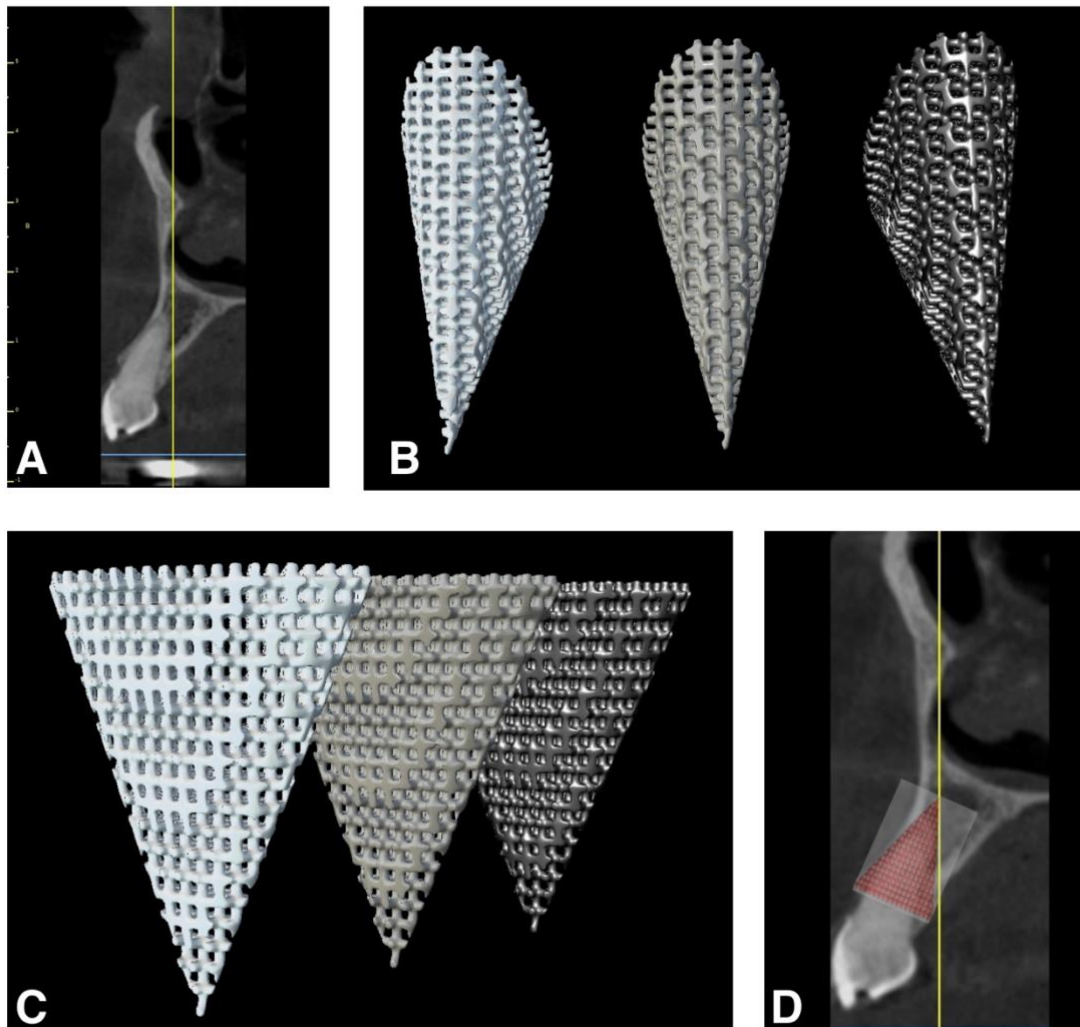


Figura R-11. Diseño de impresiones 3D de andamios personalizados con resina biocompatible de uso odontológico. **A.** Evaluación tomográfica. Corte sagital de un elemento dentario anterosuperior. **B.** Modelo de andamio. Los colores expresan tamaños de poros diferentes. **C.** Modelo de andamio personalizado vista frontal. **D.** Simulación de inserción de andamio en alveolo.

3.6.2. Experimentos *in vitro* con andamios y líneas celulares. Evaluación de la adherencia celular.

Habiendo constatando previamente que las hDPMSC se unen a superficies tradicionalmente testeadas en la evaluación de la adherencia, a continuación, nos propusimos evaluar si el material empleado en la impresión de los andamios contribuye o no a la misma. Para ello, andamios con diferentes formas fueron impresos, **Figura R-12 A y B**, esterilizados con radiación UV y finalmente depositados en placas de Petri con monocapas de hDPMSC y de diferentes líneas celulares (HEK, Raw 264,7 y MC-3T3) previamente desarrolladas.

En este punto encontramos que el material de impresión, al ser liviano y de muy baja densidad, flota, en el medio de cultivo de la placa. Para aproximar el contacto entre el andamio y la monocapa celular primeramente presionamos el mismo sobre el fondo de la placa de Petri, y observamos que en las primeras 24 h, las células formaron una monocapa de aproximación que consiguió la adherencia. Dada la geometría volumétrica de los andamios impresos y los amplios espesores del material, la microscopía óptica resultó inútil para la evaluación de la adherencia.

3.6.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de los andamios

La imposibilidad de uso de microscopía óptica o de fluorescencia para la evaluación de la adherencia celular nos llevó a analizar la superficie del andamio con microscopía electrónica de barrido. El material de resina de impresión resultó ser incompatible con los métodos tradicionales de fijación de muestras, en el tratamiento previo que usualmente se les practica a las mismas para la desecación y evaluación por MEB. Se observó que los andamios se desintegran con etanol absoluto, acetona o paraformaldheído. Si bien la fijación con glutaraldheído resultó ser la menos agresiva para la integridad de los andamios, hemos observado variaciones importantes en la geometría de los mismos. No obstante, esto no afectó al lado del andamio analizado, en donde se observó adherencia celular. En todos los casos ensayados se ha observado adherencia celular en el material impreso (Células hDPMSC, HEK, Raw 264.7 y MC-3T3).

La Figura R-13 muestra las microfotografías electrónicas de las células hDPMSC en diferentes aumentos.

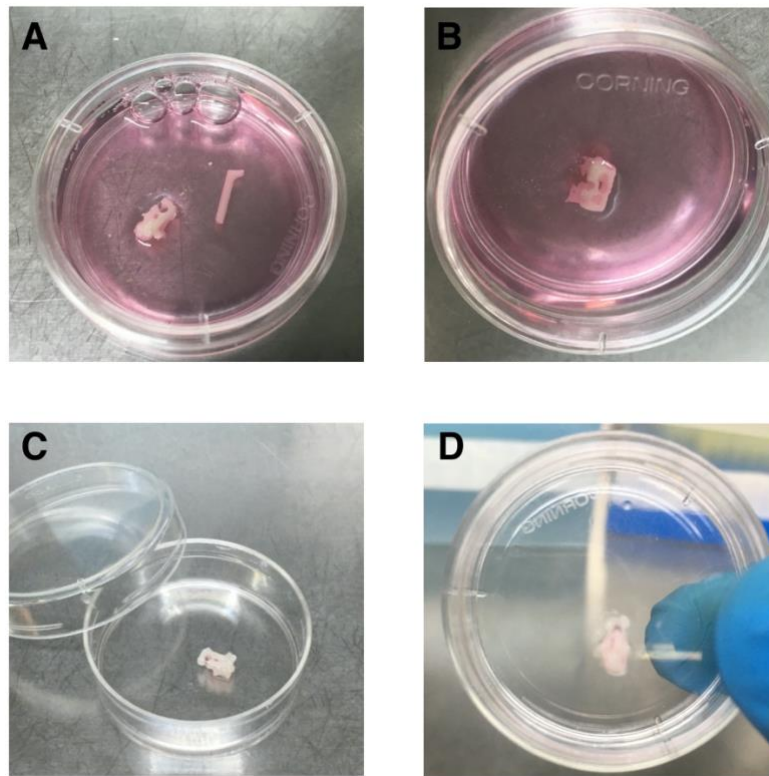


Figura R-12. **A** y **B.** Andamios con diferentes geometrías y dimensiones fueron impresos y depositados en placas de Petri para la evaluación de la adherencia de hDPMSC y diferentes diferentes líneas. Equivalentes resultados fueron obtenidos en todos los casos. Los andamios fueron presionados con un cubreobjetos estéril (no mostrado) en el lado superior para impedir su flotación. **C.** Finalizado el cultivo los andamios fueron preparados para microscopía electrónica de barrido. **D.** Se constató una firme adherencia celular del andamio al fondo de la placa. Posteriormente se evaluó la presencia de células en el lado inferior del andamio.

No se nos ha pasado por alto que la mejor forma de evaluación con microscopía electrónica de barrido para estos casos, viene dada por el uso de un Crio-MEB (Toro-Nahuelpan et al. 2020). De esta manera es posible observar la muestra a muy baja temperatura, preservando las características estructurales de forma óptima, y al mismo tiempo evitando los cambios morfológicos inducidos por la deshidratación. No obstante, en consonancia con los objetivos planteados en esta tesis, los ensayos desarrollados permiten concluir que las células probadas pueden perfectamente unirse a los andamios. Esto es un paso clave, para que posteriormente inicien un programa de

diferenciación celular basado en los estimuladores existentes en el microambiente fisiológico en el que crezcan. O bien, desarrollen una función celular primordial (inducida o no), como la formación ósea alveolar por ejemplo.

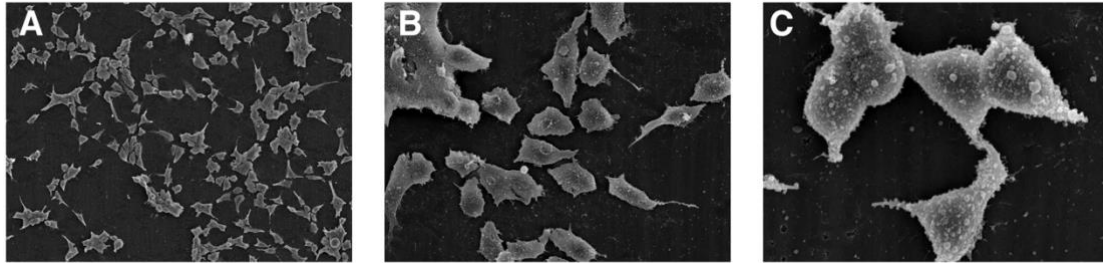


Figura R-12. Microfotografías electrónicas de barrido de células hDPMSC adheridas a andamios impresos con resina biocompatible Cosmo® de uso odontológico. **A.** 250x **B.** 1000x **C.** 3000x. Las células HEK y Raw 264.7 presentaron igual capacidad de adherencia (fotos no mostradas). Las imágenes fueron procesadas con software Pixelmator for Mac® (background fibroso de la resina).

Obtención y expansión de células madres mesenquimales a partir de la pulpa dental de pacientes con diagnóstico de Pulpitis Irreversible, del nordeste argentino. Estudio de sus propiedades de adherencia a diferentes materiales

CAPÍTULO
4

CONCLUSIONES

Conclusiones

A la luz de los resultados obtenidos podemos afirmar que:

1. Se reconoce a la pulpa dental, obtenida de dientes con pulpitis, como fuente no invasiva de células madres.
2. Se logró *in vitro* la expansión y proliferación de células obtenidas de la pulpa dental.
3. Usando RT-qPCR y citometría de flujo, hemos constatado que el fenotipo de las mismas está en consonancia con el descrito para hDPMSC.
4. Las mismas tienen considerables niveles de expresión de IL-10
5. Las hDPMSC pueden crecer *in vitro* en una íntima relación con andamios impresos con resinas biocompatibles.
6. El análisis basado en estudios digitales de diagnóstico odontológico de diferentes lesiones, reabsorciones y defectos óseos permite diseñar y fabricar andamios personalizados para una futura utilización en regeneración ósea.

Así este trabajo de tesis, sienta las bases para un ulterior desarrollo de utilización de una resina biocompatible de impresión 3D, en técnicas de regeneración ósea de defectos y conservación de alveolos pos extracción. La fabricación personalizada de andamios, que sirvan de vehículo de las hDPMSC del propio paciente, ha de constituir el primer paso hacia nuevas estrategias que impliquen el uso odontológico de terapias regenerativas celulares, para mejorar el terreno óseo en la colocación efectiva de implantes dentales.

Obtención y expansión de células madres mesenquimales a partir de la pulpa dental de pacientes con diagnóstico de Pulpitis Irreversible, del nordeste argentino. Estudio de sus propiedades de adherencia a diferentes materiales

CAPÍTULO
5

RESÚMEN

| Elias J. Azzi

Resumen

El siguiente trabajo de investigación surgió de la necesidad de buscar métodos y materiales que mejoren las técnicas actuales de la odontología regenerativa y rehabilitadora.

Para ello, se seleccionaron pacientes (n=20) con enfermedad pulpar y diagnóstico de pulpitis irreversible. Se realizó el tratamiento endodóntico convencional con el objeto de poder extraer la pulpa dental y aprovechar, este tejido, normalmente desechable como posible fuente de células madres (hDPMSC).

Se pusieron a punto diferentes procedimientos de digestión del tejido pulpar y se optimizó la recuperación de células madre. Se ensayaron distintas combinaciones de tiempos y enzimas de digestión. Posteriormente, se analizó el fenotipo de las células obtenidas (usando técnicas de biología molecular y citometría de flujo). Adicionalmente se constató el poder de adherencia de estas células *in vitro* y se observó una propiedad funcional fundamental de las células troncales como es la producción de citoquinas antiinflamatorias.

En relación a la adherencia, se usaron diferentes materiales de injerto. Con el uso de un nuevo material biocompatible (resina Cosmo®) se imprimieron diferentes modelos de andamios personalizados para defectos óseos y alveolos pos extracción. Los mismos se emplearon en el desarrollo de cultivos con hDPMSC en condiciones estériles *in vitro*, y se observó adherencia usando microscopía electrónica de barrido.

Así este trabajo de tesis, sienta las bases para un ulterior desarrollo de utilización de andamios de resina biocompatible en técnicas de regeneración ósea. La fabricación personalizada de los mismos, ha de constituir el primer paso hacia nuevas estrategias que impliquen el uso odontológico de terapias regenerativas celulares, para mejorar el terreno óseo en la colocación efectiva de implantes dentales.

Obtención y expansión de células madres mesenquimales a partir de la pulpa dental de pacientes con diagnóstico de Pulpitis Irreversible, del nordeste argentino. Estudio de sus propiedades de adherencia a diferentes materiales

CAPÍTULO
6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografía

- Alge, Daniel L, Dan Zhou, Lyndsey L Adams, Brandon K Wyss, Matthew D Shadday, Erik J Woods, T M Gabriel Chu, and W Scott Goebel. 2010. "Donor-Matched Comparison of Dental Pulp Stem Cells and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 4 (1): 73–81.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=19842108&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Alongi, Dominick J, Takayoshi Yamaza, Yingjie Song, Ashraf F Fouad, Elaine E Romberg, Songtao Shi, Rocky S Tuan, and George T-J Huang. 2010. "Stem/Progenitor Cells from Inflamed Human Dental Pulp Retain Tissue Regeneration Potential." *Regenerative Medicine* 5 (4): 617–31.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=20465527&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Bellin, Milena, Maria C. Marchetto, Fred H. Gage, and Christine L. Mummery. 2012. "Induced Pluripotent Stem Cells: The New Patient?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (11): 713–26. <https://doi.org/10.1038/nrm3448>.
- Berardi, A C, A Wang, J D Levine, P Lopez, and D T Scadden. 1995. "Functional Isolation and Characterization of Human Hematopoietic Stem Cells." *Science (New York, N.Y.)* 267 (5194): 104–8. <https://doi.org/10.1126/science.7528940>.
- Bobis, Sylwia, Danuta Jarocha, and Marcin Majka. 2006. "Mesenchymal Stem Cells: Characteristics and Clinical Applications." *Folia Histochemica et Cytobiologica*. Polish Histochemical and Cytochemical Society.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v2.i4.67>.
- Cavalcanti, Bruno N, Benjamin D Zeitlin, and Jacques E Nör. 2013. "A Hydrogel Scaffold That Maintains Viability and Supports Differentiation of Dental Pulp Stem Cells." *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials* 29 (1): 97–102.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=22901827&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Christy, Barbara A., Maryanne C. Herzig, Christopher Delavan, Carolina Cantu, Christi Salgado, James A. Bynum, and Andrew P. Cap. 2019. "Human Primary Fibroblasts Perform Similarly to MSCs in Assays Used to Evaluate MSC Safety and Potency." *Transfusion* 59 (S2): 1593–1600. <https://doi.org/10.1111/trf.15187>.
- Davies, O G, P R Cooper, R M Shelton, A J Smith, and B A Scheven. 2015. "A

- Comparison of the in Vitro Mineralisation and Dentinogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue, Bone Marrow and Dental Pulp." *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 33 (4): 371–82.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=24997523&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Dimmeler, Stefanie, Sheng Ding, Thomas A. Rando, and Alan Trounson. 2014. "Translational Strategies and Challenges in Regenerative Medicine." *Nature Medicine* 20 (8): 814–21. <https://doi.org/10.1038/nm.3627>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, and E. M. Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Dong, Qing, Yuanyuan Wang, Fatemeh Mohabatpour, Li Zheng, Silvana Papagerakis, Daniel Chen, and Petros Papagerakis. 2019. "Chapter 7 and Expansion for Tissue Engineering." *Odontogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 1922: 3–5. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2>.
- Echeverría, Silvina, Elbio Leiguez, Carlos Guijas, Neide Galvão do Nascimento, Ofelia Acosta, Catarina Teixeira, Laura C. Leiva, and Juan Pablo Rodríguez. 2018. "Evaluation of Pro-Inflammatory Events Induced by Bothrops Alternatus Snake Venom." *Chemico-Biological Interactions* 281 (September 2017): 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.022>.
- Estève, D., N. Boulet, C. Belles, A. Zakaroff-Girard, P. Decaunes, A. Briot, Y. Veeranagouda, et al. 2019. "Lobular Architecture of Human Adipose Tissue Defines the Niche and Fate of Progenitor Cells." *Nature Communications* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09992-3>.
- Fawzy El-Sayed, K M. 2013. "Adult Mesenchymal Stem Cells Explored in the Dental Field." *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 130 SRC-: 89–103.
- Ferroni, Letizia, Chiara Gardin, Stefano Sivoletta, Giulia Brunello, Mario Berengo, Adriano Piattelli, Erierto Bressan, and Barbara Zavan. 2015. "A Hyaluronan-Based Scaffold for the in Vitro Construction of Dental Pulp-like Tissue." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (3): 4666–81.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=25739081&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Friedenstein, Alexander J., Ruben K. Chailakhyan, Nataly V. Latsinik, Andrey F. Panasyuk, and Iren V. Keiliss-Borok. 1974. "Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues: Cloning in Vitro and Retransplantation in Vivo." *Transplantation* 17 (4): 331–40. <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>.
- Fuentes-Julián, Sherezade, Francisco Arnalich-Montiel, Laia Jaumandreu, Marina Leal, Alfonso Casado, Ignacio García-Tuñón, Enrique Hernández-Jiménez, Eduardo López-Collazo, and Maria P. De Miguel. 2015. "Adipose-Derived Mesenchymal

- Stem Cell Administration Does Not Improve Corneal Graft Survival Outcome.” *PLoS ONE* 10 (3): 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117945>.
- Galler, K M, R N D’Souza, J D Hartgerink, and G Schmalz. 2011. “Scaffolds for Dental Pulp Tissue Engineering.” *Advances in Dental Research* 23 (3): 333–39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=21677088&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Gandia, Carolina, Ana Armiñan, Jose Manuel García-Verdugo, Elisa Lledó, Amparo Ruiz, M Dolores Miñana, Jorge Sanchez-Torrijos, et al. 2008. “Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (3): 638–45. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=18079433&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Gomes, José Alvaro Pereira, Bábyla Geraldés Monteiro, Gustavo Barreto Melo, Ricardo Luiz Smith, Marcelo Cavenaghi Pereira da Silva, Nelson Foresto Lizier, Alexandre Kerkis, Humberto Cerruti, and Irina Kerkis. 2010. “Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Human Immature Dental Pulp Stem Cells.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (3): 1408–14. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=19892864&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Govindasamy, V, V S Ronald, A N Abdullah, K R Ganesan Nathan, Z A C Ab Aziz, M Abdullah, S Musa, N H Abu Kasim, and R R Bhone. 2011. “Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Islet-like Aggregates.” *Journal of Dental Research* 90 (5): 646–52. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=21335539&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Gronthos, S., M. Mankani, J. Brahim, P. Gehron Robey, and S. Shi. 2000. “Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (25): 13625–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>.
- Gronthos, S, J Brahim, W Li, L W Fisher, N Cherman, A Boyde, P DenBesten, P Gehron Robey, and S Shi. 2000. “Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells.” *Journal of Dental Research* 81 (8): 531–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=12147742&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- He, Yue, Shan Zhou, Hong Liu, Bingbing Shen, Hongwen Zhao, Kanfu Peng, and Xiongfei

- Wu. 2015. "Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Transfected Mesenchymal Stem Cells Induce Kidney Allograft Tolerance by Increasing the Production and Function of Regulatory T Cells." *Transplantation* 99 (9): 1829–38. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000856>.
- Huang, Chunyang, Lirong Bao, Tian Lin, Yanling Lu, and Yu Wu. 2020. "Proliferation and Odontogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Human Dental Pulp Cells Co-Cultured in Hydrogel." *Archives of Oral Biology* 109 (September 2019): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104582>.
- Huang, G. T.J., S. Gronthos, and S. Shi. 2009a. "Critical Reviews in Oral Biology & Medicine: 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. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>.
- . 2009b. "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. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>.
- Huang, George T-J, Kristina Shagrananova, and Selina W Chan. 2006. "Formation of Odontoblast-like Cells from Cultured Human Dental Pulp Cells on Dentin in Vitro." *Journal of Endodontics* 32 (11): 1066–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=17055908&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Ito, Takafumi, Tomoatsu Kaneko, Yukiko Sueyama, Reika Kaneko, and Takashi Okiji. 2017. "Dental Pulp Tissue Engineering of Pulpotomized Rat Molars with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Odontology* 105 (4): 392–97. <https://doi.org/10.1007/s10266-016-0283-0>.
- Jones, P H, S Harper, and F M Watt. 1995. "Stem Cell Patterning and Fate in Human Epidermis." *Cell* 80 (1): 83–93. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90453-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90453-0).
- Kahounová, Zuzana, Daniela Kurfürstová, Jan Bouchal, Gvantsa Kharashvili, Jiří Navrátil, Ján Remšík, Šárka Šimečková, Vladimír Študent, Alois Kozubík, and Karel Souček. 2018. "The Fibroblast Surface Markers FAP, Anti-Fibroblast, and FSP Are Expressed by Cells of Epithelial Origin and May Be Altered during Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Cytometry Part A* 93 (9): 941–51. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23101>.
- Kaneko, Tomoatsu, Phyo Pyai Sone, Su Yee Myo Zaw, Yukikio Sueyama, Zar Chi Thein Zaw, Yamato Okada, Hiroki Murano, Bin Gu, and Takashi Okiji. 2019. "In Vivo Fate of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Implanted into Rat Pulpotomized Molars." *Stem Cell Research* 38 (April): 101457. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101457>.
- Kawashima, Nobuyuki, and Takashi Okiji. 2016. "Odontoblasts: Specialized Hard-Tissue-Forming Cells in the Dentin-Pulp Complex." *Congenital Anomalies* 56 (4): 144–53. <https://doi.org/10.1111/cga.12169>.
- Kim, Byung-Chul, Hojae Bae, Il-Keun Kwon, Eun-Jun Lee, Jae-Hong Park, Ali Khademhosseini, and Yu-Shik Hwang. 2012. "Osteoblastic/Cementoblastic and Neural Differentiation of Dental Stem Cells and Their Applications to Tissue Engineering and Regenerative Medicine." *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 18

- (3): 235–44.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=22224548&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Kwon, Y S. 2015. “Behaviour of Human Dental Pulp Cells Cultured in a Collagen Hydrogel Scaffold Crosslinked with Cinnamaldehyde.” *International Endodontic Journal*.
- Laino, Gregorio, Riccardo D’Aquino, Antonio Graziano, Vladimiro Lanza, Francesco Carinci, Fabio Naro, Giuseppe Pirozzi, and Gianpaolo Papaccio. 2009. “A New Population of Human Adult Dental Pulp Stem Cells: A Useful Source of Living Autologous Fibrous Bone Tissue (LAB).” *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20 (8): 1394–1402.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=16007337&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Leto Barone, Angelo A., Saami Khalifian, W. P. Andrew Lee, and Gerald Brandacher. 2013. “Immunomodulatory Effects of Adipose-Derived Stem Cells: Fact or Fiction?” *BioMed Research International* 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/383685>.
- Li, Ming, and Susumu Ikehara. 2013. “Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Organ Repair.” *Stem Cells International* 2013 (1).
<https://doi.org/10.1155/2013/132642>.
- Liang, Chun-Chi, Ann Y Park, and Jun-Lin Guan. 2007. “In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro.” *Nature Protocols* 2 (2): 329–33. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.
- Liu, Junjun, Fang Yu, Yao Sun, Beizhan Jiang, Wenjun Zhang, Jianhua Yang, Guo-Tong Xu, Aibin Liang, and Shangfeng Liu. 2015. “Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 33 (3): 627–38.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=25447379&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Marei, Mona K., and Rania M. El Backly. 2018. “Dental Mesenchymal Stem Cell-Based Translational Regenerative Dentistry: From Artificial to Biological Replacement.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6 (MAY): 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00049>.
- Mareschi, K., E. Biasin, W. Piacibello, M. Aglietta, E. Madon, and F. Fagioli. 2001. “Isolation of Human Mesenchymal Stem Cells: Bone Marrow versus Umbilical Cord Blood.” *Haematologica* 86 (10): 1099–1100.
- Marrelli, Massimo, Bruna Codispoti, Richard M. Shelton, Ben A. Scheven, Paul R. Cooper, Marco Tatullo, and Francesco Paduano. 2018. “Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell

- Behavior." *Frontiers in Physiology* 9 (November): 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01685>.
- Martens, W, A Bronckaers, C Politis, R Jacobs, and I Lambrichts. 2013. "Dental Stem Cells and Their Promising Role in Neural Regeneration: An Update." *Clinical Oral Investigations* 17 (9): 1969–83.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=23846214&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Melana, Juan Pablo, J.P. Rodríguez, T.R. Stoyanoff, J.D Espada, J.S Todaro, and M.V. Aguirre. 2016. "Optimización de Cultivos Primarios de Células de Carcinoma Renal de Células Claras Como Modelo ' in Vitro ' Para Estudios Metabólicos y Determinantes de Progresión Neoplásica." *Rev. Facultad de Medicina UNNE*, 6–17.
- Meruane, Manuel, and Mariana Rojas. 2010. "Células Troncales Derivadas Del Tejido Adiposo." *Int. J. Morphol.* 28 (3): 879–89.
- Monteiro, B G, R C Serafim, G B Melo, M C P Silva, N F Lizier, C M C Maranduba, R L Smith, et al. 2009. "Human Immature Dental Pulp Stem Cells Share Key Characteristic Features with Limbal Stem Cells." *Cell Proliferation* 42 (5): 587–94.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=19614680&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Morsceck, C, W Götz, J Schierholz, F Zeilhofer, U Kühn, C Möhl, C Sippel, and K H Hoffmann. 2005. "Isolation of Precursor Cells (PCs) from Human Dental Follicle of Wisdom Teeth." *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 24 (2): 155–65.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=15890265&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Noce, Marcella La, Francesca Paino, Anna Spina, Pasqualina Naddeo, Roberta Montella, Vincenzo Desiderio, Alfredo De Rosa, Gianpaolo Papaccio, Virginia Tirino, and Luigi Laino. 2014. "Dental Pulp Stem Cells: State of the Art and Suggestions for a True Translation of Research into Therapy." *Journal of Dentistry* 42 (7): 761–68. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.02.018>.
- Owen, M. 1988. "Marrow Stromal Stem Cells." *Journal of Cell Science*, no. SSUPL. 10: 63–76. https://doi.org/10.1242/jcs.1988.supplement_10.5.
- Park, Su-Jung, Zhengzheng Li, In-Nam Hwang, Kang Moo Huh, and Kyung-San Min. 2013. "Glycol Chitin-Based Thermoresponsive Hydrogel Scaffold Supplemented with Enamel Matrix Derivative Promotes Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells." *Journal of Endodontics* 39 (8): 1001–7.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=23880267&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

- Patil, Vikrant R., Avinash H. Kharat, Deepak G. Kulkarni, Supriya M. Kheur, and Ramesh R. Bhonde. 2018. "Long Term Explant Culture for Harvesting Homogeneous Population of Human Dental Pulp Stem Cells." *Cell Biology International* 42 (12): 1602–10. <https://doi.org/10.1002/cbin.11065>.
- Peffer, Mandy J., J. Collins, Y. Fang, K. Goljanek-Whysall, M. Rushton, J. Loughlin, C. Proctor, and P. D. Clegg. 2016. "Age-Related Changes in Mesenchymal Stem Cells Identified Using a Multi-Omics Approach." *European Cells and Materials* 31 (January): 136–59. <https://doi.org/10.22203/eCM.v031a10>.
- Pittenger, Mark F., Alastair M. Mackay, Stephen C. Beck, Rama K. Jaiswal, Robin Douglas, Joseph D. Mosca, Mark A. Moorman, Donald W. Simonetti, Stewart Craig, and Daniel R. Marshak. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284 (5411): 143–47. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- Qu, Tiejun, Junjun Jing, Yong Jiang, Robert J Taylor, Jian Q Feng, Benjamin Geiger, and Xiaohua Liu. 2014. "Magnesium-Containing Nanostructured Hybrid Scaffolds for Enhanced Dentin Regeneration." *Tissue Engineering. Part A* 20 (17–18): 2422–33. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=24593189&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDDocSum.
- Rahman, Saeed Ur, Joung Hwan Oh, Young Dan Cho, Shin Hye Chung, Gene Lee, Jeong Hwa Baek, Hyun Mo Ryoo, and Kyung Mi Woo. 2018. "Fibrous Topography-Potentiates Canonical Wnt Signaling Directs the Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp-Derived Stem Cells." *ACS Applied Materials and Interfaces* 10 (21): 17526–41. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19782>.
- Rajabzadeh, Nassim, Ezzatollah Fathi, and Raheleh Farahzadi. 2019. "Stem Cell-Based Regenerative Medicine." *Stem Cell Investigation* 6 (July). <https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.04>.
- Rodríguez, Juan P., Carlos Guijas, Alma M. Astudillo, Julio M. Rubio, María A. Balboa, and Jesús Balsinde. 2019. "Sequestration of 9-Hydroxystearic Acid in FAHFA (Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids) as a Protective Mechanism for Colon Carcinoma Cells to Avoid Apoptotic Cell Death." *Cancers* 11 (4): 524. <https://doi.org/10.3390/cancers11040524>.
- Salgado, A J. 2006. "Adult Stem Cells in Bone and Cartilage Tissue Engineering." *Current Stem Cell Research Therapy* 1 (3 SRC-BaiduScholar FG-0): 345–64.
- Sell, S. 1994. "Liver Stem Cells." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*
- Shi, S, P G Robey, and S Gronthos. 2001. "Comparison of Human Dental Pulp and Bone Marrow Stromal Stem Cells by CDNA Microarray Analysis." *Bone* 29 (6): 532–39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=11728923&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDDocSum.
- Soares, Diana G, Zhanpeng Zhang, Fatma Mohamed, Thomas W Eyster, Carlos A de Souza Costa, and Peter X Ma. 2018. "Simvastatin and Nanofibrous Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds to Promote the Odontogenic Potential of Dental Pulp Cells in an

- Inflammatory Environment.” *Acta Biomaterialia* 68 (March): 190–203.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.037>.
- Sonoyama, Wataru, Yi Liu, Dianji Fang, Takayoshi Yamaza, Byoung-Moo Seo, Chunmei Zhang, He Liu, et al. 2006. “Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine.” *PloS One* 1: e79.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=17183711&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Sorokin, Lydia. 2010. “The Impact of the Extracellular Matrix on Inflammation.” *Nature Reviews Immunology* 10 (10): 712–23. <https://doi.org/10.1038/nri2852>.
- Tapp, Hazel, Edward N. Hanley, Joshua C. Patt, and Helen E. Gruber. 2009. “Adipose-Derived Stem Cells: Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair.” *Experimental Biology and Medicine* 234 (1): 1–9.
<https://doi.org/10.3181/0805-MR-170>.
- Toro-Nahuelpan, Mauricio, Ievgeniia Zagoriy, Fabrice Senger, Laurent Blanchoin, Manuel Théry, and Julia Mahamid. 2020. “Tailoring Cryo-Electron Microscopy Grids by Photo-Micropatterning for in-Cell Structural Studies.” *Nature Methods* 17 (1): 50–54. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0630-5>.
- Wang, Jing, Xiaohua Liu, Xiaobing Jin, Haiyun Ma, Jiang Hu, Longxing Ni, and Peter X Ma. 2010. “The Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Nanofibrous Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds in Vitro and in Vivo.” *Acta Biomaterialia* 6 (10): 3856–63. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.04.009>.
- Wang, Jing, Haiyun Ma, Xiaobing Jin, Jiang Hu, Xiaohua Liu, Longxing Ni, and Peter X. Ma. 2011. “The Effect of Scaffold Architecture on Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells.” *Biomaterials* 32 (31): 7822–30.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.034>.
- Wen, Li, Meidong Zhu, Michele C. Madigan, Jingjing You, Nicholas J.C. King, Francis A. Billson, Kathryn McClellan, Gerard Sutton, and Con Petsoglou. 2014. “Immunomodulatory Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on pro-Inflammatory Cytokine-Stimulated Human Corneal Epithelial Cells.” *PLoS ONE* 9 (7): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101841>.
- Winning, Tracey A., and Grant C. Townsend. 2000. “Oral Mucosal Embryology and Histology.” *Clinics in Dermatology*. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(00\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(00)00140-1).
- Yianni, V., and P. T. Sharpe. 2019. “Perivascular-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Journal of Dental Research* 98 (10): 1066–72.
<https://doi.org/10.1177/0022034519862258>.
- Zhang, Qunzhou, Shihong Shi, Yi Liu, Jettie Uyanne, Yufang Shi, Songtao Shi, and Anh D Le. 2009. “Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (12): 7787–98.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=19923445&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.P

ubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

Zomer, Helena Debiazi, Kelly C.S. Roballo, Thais Borges Lessa, Fabiana Fernandes Bressan, Natália Nardeli Gonçalves, Flávio Vieira Meirelles, Andrea Gonçalves Trentin, and Carlos Eduardo Ambrósio. 2018. "Distinct Features of Rabbit and Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Implications for Biotechnology and Translational Research." *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 11: 43–54. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S175749>.

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. LAS CÉLULAS MADRE	6
1.1.1. <i>La investigación actual en células madre: propiedades biológicas generales</i>	7
1.1.2. <i>Células madre de pulpa dental humana (hDPSCs)</i>	9
1.1.3. <i>Diferenciación odontogénica de células madre de pulpa dental humana (hDPMSC)</i>	12
1.1.4. <i>Diferenciación de hDPSC hacia la formación ósea</i>	15
1.2.1. <i>La pulpa irreversible y su diagnóstico</i>	16
1.2.2. <i>Procedimientos de extracción de pulpa dental. Obtención de hDPMSC</i>	17
1.3.1. <i>La regeneración ósea y su problemática</i>	19
1.3.2. <i>Propiedades de adherencia de las hDPMSC en distintas superficies</i>	22
1.3.3. <i>Las MSC producen mediadores celulares inflamatorios: citoquinas</i>	23
1.5.1. <i>Objetivo General</i>	26
1.5.2. <i>Objetivos Particulares</i>	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1.1. <i>Criterios de selección</i>	29
2.1.2. <i>Procedimientos quirúrgicos empleados</i>	29
2.2.1. <i>Digestión del tejido pulpar</i>	29
2.2.2. <i>Recuperación de hDPMSC y amplificación</i>	31
2.2.3. <i>Cultivos de línea</i>	32
2.2.4. <i>Mantenimientos de los cultivos</i>	33
2.2.5. <i>Preservación de las células en nitrógeno líquido</i>	33
2.3.1. <i>Evaluación de viabilidad y/o proliferación celular con MTT</i>	34
2.3.2. <i>Determinación de parámetros cinéticos (K crecimiento y t` de duplicación)</i>	34
2.3.3. <i>Ensayos de scratch wound healing (Invasividad celular)</i>	35
2.4.1. <i>Extracción de RNA</i>	36
2.4.2. <i>Síntesis de cDNA</i>	36
2.4.3. <i>PCR cuantitativa</i>	37
2.4.4. <i>Control de especificidad de los cebadores</i>	37
RESULTADOS.....	42
3.1.1. <i>Procedimientos quirúrgicos</i>	43
3.1.2. <i>Procedimientos previos al cultivo celular primario de expansión de hDPMSC</i>	43
3.2.1. <i>Digestión del tejido pulpar</i>	43
3.3.2. <i>Evaluación de la expansión de cultivos hDPMSC</i>	46
3.3.3. <i>Morfología de hDPMSC</i>	48
3.3.1. <i>Determinación de parámetros cinéticos (K crecimiento y t` de duplicación)</i>	49
3.3.2. <i>Ensayos de scratch wound healing (Invasividad celular)</i>	50
3.4.1. <i>Evaluación por qPCR de marcadores fenotípicos</i>	52
3.5.1. <i>Producción de citoquinas antiinflamatorias</i>	57
3.5.2. <i>Ensayos de adhesión celular</i>	59
3.6.1. <i>Diseño e impresión de andamios</i>	60

3.6.2. Experimentos *in vitro* con andamios y líneas celulares. Evaluación de la adherencia celular. 63

3.6.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de los andamios..... 63

CONCLUSIONES 67

RESÚMEN 69

BIBLIOGRAFÍA 71

ÍNDICE 80