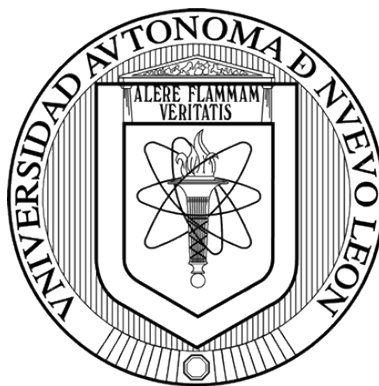


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS
MADRE DE PULPA DENTAL HUMANA Y SU DIFERENCIACIÓN
A LINAJE OSTEOGÉNICO *IN VITRO* UTILIZANDO FACTOR DE
CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y FACTOR DE CRECIMIENTO
FIBROBLÁSTICO BÁSICO

Por

CD, MOA. CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Orientación en Biotecnología

Noviembre, 2015

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE
PULPA DENTAL HUMANA Y SU DIFERENCIACIÓN A LINAJE OSTEOGÉNICO
IN VITRO UTILIZANDO FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y FACTOR
DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO

Comité de Tesis

DRA. YOLANDA GUTIÉRREZ PUENTE
Presidente

DRA. ELVA TERESA ARÉCHIGA CARVAJAL
Secretario

DR. ROBERTO MERCADO HERNÁNDEZ
Vocal

DR. CARLOS EDUARDO HERNÁNDEZ LUNA
Vocal

DRA. LILIA HORTENCIA MORALES RAMOS
Vocal

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE
PULPA DENTAL HUMANA Y SU DIFERENCIACIÓN A LINAJE OSTEOGÉNICO
IN VITRO UTILIZANDO FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y FACTOR
DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO

Dirección de Tesis

DRA. YOLANDA GUTIÉRREZ PUENTE
Director

DRA. MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS
Asesor Externo

AGRADECIMIENTOS

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)* por la beca económica otorgada durante todo el programa de Doctorado, así como el apoyo para realizar la estancia Doctoral en el Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia.

A la *Dra. Yolanda Gutiérrez Puente*, por su invaluable asesoría y dirección en la realización de este proyecto, gracias a su paciencia y confianza se logró un objetivo más en mi carrera profesional.

A la *Dra. Myriam Angélica De la Garza Ramos*, por su apoyo y asesoría brindada a lo largo de todo el Doctorado, proporcionando todos los medios necesarios para hacer posible este trabajo, siempre con disposición y una gran vocación por la investigación.

Al *Dr. Carlos Eduardo Medina De la Garza*, por dar seguimiento a este estudio, así como brindar las posibilidades para desarrollarlo dentro del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS).

A la *CD, MOA. Ada Pricila López Lozano* por su importante contribución y apoyo durante todo el Doctorado, gracias por todo.

Al *Dr. Alberto Gómez Treviño, QCB. Andrés Mendiola Jiménez, Dr. José Luis Montiel Hernández, LBG. Ricardo Emmanuel Romero Zavaleta, Dr. Ismael Malagón Santiago y Dr. Sergio Lozano Rodríguez* por su colaboración y experiencia aportada para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la *Dra. Marcela Márquez, Dr. Anders R. Holmberg y Dr. Jesús Áncer Rodríguez* por su gran contribución intelectual brindando las facilidades para realizar la estancia Doctoral en el Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia.

A la *Dra. Erandi Escamilla García, Dra. Andrea Alcázar Pizaña* y al *CD, MC. Salvador Pinales Armendaris* por su paciencia y contribución durante el Doctorado.

DEDICADORIA

Primeramente a **DIOS**, mi guía en todo momento, por brindarme el entusiasmo y sabiduría para poder iniciar, desarrollar y concluir satisfactoriamente este proyecto profesional.

A mis padres, **Casiano Del Angel Hernández** y **María Magdalena Mosqueda Chávez**, por su fortaleza, paciencia y amor incondicional en los momentos más difíciles durante este y cada uno de los proyectos tanto en mi vida personal como profesional. Dios los conserve a mi lado por muchos años más, los quiero con todo mi corazón y nunca dejare de agradecer toda la educación de vida que me han brindado con mucho cariño.

A mis hermanos, **Jorge Alberto Del Angel Mosqueda** y **Rene Del Angel Mosqueda**, grandes amigos y compañeros incondicionales a lo largo de mi vida, siempre contribuyendo de manera importante para la realización de las metas trazadas, gracias por siempre tener un consejo alentador, los quiero mucho.

A mi hijo, **Franco Del Angel Rodríguez**, la razón y motor que me impulsa a continuar superándome, gracias por darme tanto aprendizaje, satisfacción y momentos inolvidables llenos de felicidad los cuales conservo dentro de mi corazón, te amo por siempre.

A mis sobrinos, **Jorgito** y **Emilio**, siempre con una sonrisa llena de inocencia y alegría, con mucho cariño, los quiero.

LUGAR DE TRABAJO

El presente proyecto de investigación titulado “AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL HUMANA Y SU DIFERENCIACIÓN A LINAJE OSTEOGÉNICO *IN VITRO* UTILIZANDO FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO” se llevó a cabo en la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), así como en el Cáncer Center (CCK) del Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
LUGAR DE TRABAJO.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos específicos.....	4
4. HIPÓTESIS.....	5
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1 Células madre.....	6
5.1.1 Células madre embrionarias (ESC).....	7
5.1.2 Células madre pluripotentes inducidas (iPS).....	9
5.1.3 Células madre mesenquimales (MSCs).....	10

5.1.3.1	Células madre derivadas de medula ósea (BMSCs).....	12
5.1.3.2	Células madre adiposas (ASCs)	12
5.1.3.3	Células madre dentales (DSCs).....	13
5.1.3.3.1	Células madre de pulpa dental (DPSCs).....	14
5.1.3.3.2	Células madre de ligamento periodontal (PDLSCs).....	15
5.1.3.3.3	Células madre de la papila apical (SCAPs).....	16
5.1.3.3.4	Células madre de folículo dental (DFSCs).....	16
5.1.3.3.5	Células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED).....	17
5.2	Diferenciación osteogénica y remodelado óseo	18
5.2.1	Osteoblastos y proteínas de mineralización	20
5.2.2	Matriz extracelular ósea.....	21
5.3	Factores de crecimiento.....	22
5.3.1	Factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	23
5.3.2	Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).....	24
5.3.3	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).....	25
5.3.4	Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF).....	25
5.3.5	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	26
5.3.6	Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).....	27
5.3.7	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).....	28
5.3.8	Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)	29
5.4	Señales químicas: dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerofosfato	30
6.	MÉTODOS.....	31
6.1	Selección de pacientes	32
6.2	Extracción de piezas dentales	32
6.3	Obtención de pulpa dental	34
6.4	Disgregación de tejido pulpar.....	35
6.5	Cultivo celular	36
6.6	Separación magnética	36

6.7	Criopreservación celular.....	37
6.8	Citometría de flujo.....	38
6.9	Ensayo de auto-fluorescencia inducida por formalina	38
6.10	Inmunocitoquímica.....	39
6.11	Diferenciación osteogénica.....	40
6.12	Ensayo de alizarina roja.....	40
6.13	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)	41
6.14	Análisis estadístico	44
7.	RESULTADOS	45
7.1	Aislamiento y caracterización inmunofenotípica de las DPSCs	45
7.2	Cambios morfológicos durante la diferenciación osteogénica	50
7.3	Expresión de los marcadores de superficie CD146 y CD10	51
7.4	Deposición de calcio extracelular mediante el ensayo de alizarina roja ...	52
7.5	Expresión génica por RT-PCR	57
8.	DISCUSIÓN.....	59
9.	CONCLUSIONES.....	63
10.	PERSPECTIVAS	64
11.	LITERATURA CITADA.....	65
12.	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Condiciones y secuencias de oligonucleótidos.....	43
2	Resultados cuantitativos de alizarina roja ($\mu\text{g/ml}$)	55
3	Lecturas de absorbancia con el blanco	55
4	Lecturas de absorbancia sin el blanco	55
5	Lecturas de absorbancia en $\mu\text{/ml}$ de alizarina roja	56
6	Prueba estadística ANOVA de un factor	57
7	Prueba estadística de Tukey	57

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Células madre dentales (DSCs)	14
2	Dientes premolares humanos.....	33
3	Medio de transporte para órganos dentarios.....	34
4	Odontosección selectiva y pulpa dental.....	34
5	Disociación tisular mecánico-enzimática	35
6	Cultivo celular primario.....	36
7	Separación magnética	37
8	Criopreservación celular.....	37
9	Citometría de flujo.....	38
10	Microscopia de fluorescencia	39
11	Inmunocitoquímica.....	40
12	Tinción de alizarina roja	41
13	Electroforesis y RT-PCR.....	42
14	Células clasificadas con separación magnética	45
15	Tinción con azul de toluidina	46
16	Análisis de citometría de flujo para el control de isotipo	46
17	Análisis de citometría de flujo para CD105-FITC	47
18	Análisis de citometría de flujo para CD73-PE	47
19	Análisis de citometría de flujo para CD90-FITC	47
20	Análisis de citometría de flujo para CD13-PE	48
21	Análisis de citometría de flujo para CD45-FITC	48
22	Análisis de citometría de flujo para CD34-PE	48
23	Análisis de citometría de flujo para HLA-DR-PerCP	49
24	Análisis de citometría de flujo para CD14-PE	49

25	Análisis de citometría de flujo para CD11b-PE	49
26	Cambios morfológicos durante la diferenciación osteogénica	50
27	Expresión de CD146 por inmunocitoquímica	51
28	Expresión de CD10 por inmunocitoquímica	52
29	Mineralización osteogénica	53
30	Mineralización osteogénica en α -MEM	53
31	Mineralización osteogénica en OM.....	53
32	Mineralización osteogénica en OM + EGF	54
33	Mineralización osteogénica en OM + bFGF	54
34	Cuantificación de calcio extracelular	54
35	Curva de calibración.....	56
36	Análisis de la expresión génica	58

LISTA DE ABREVIATURAS

α-MEM	Alfa modified Eagle's medium
ALP	Fosfatasa alcalina
ANOVA	Análisis de varianza
ASCs	Células madre adiposas
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
BMP-2	Proteína morfogenética ósea 2
BMSCs	Células madre estromales de medula ósea
BSA	Albumina sérica bovina
BSP	Sialoproteína ósea
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CFU-F	Unidades formadoras de colonias fibroblásticas
CHX	Clorhexidina
CPC	Cloruro de cetilpiridinio
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DFSCs	Células madre de folículo dental
DMP-1	Proteína de la matriz dentinaria 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPCs	Células de pulpa dental
DPSCs	Células madre de pulpa dental
DSCs	Células madre dentales
DSPP	Sialofosfoproteína dentinaria

EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ESC	Células madre embrionarias
FBS	Suero fetal bovino
HA/TCP	Fosfato tricálcico/hidroxiapatita
HPDLCs	Células humanas de ligamento periodontal
HSC	Células madre hematopoyéticas
ICM	Masa celular interna
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
iPS	Células madre pluripotentes inducidas
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSCs	Células madre mesenquimales
OCN	Osteocalcina
OM	Medio osteogénico
OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
PBS	Buffer de fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDLSCs	Células madre de ligamento periodontal
PTH	Hormona paratiroidea
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RUNX-2	Factor de transcripción 2 relacionado con el gen Runt
SCAPs	Células madre de papila apical
SCNT	Transferencia nuclear de células somáticas

SHED	Células madre de dientes deciduos humanos exfoliados
SPARC	Osteonectina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
Wnt	Vía wingless

RESUMEN

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) juegan un importante papel en la mineralización de la matriz extracelular, un proceso complejo requerido para una apropiada regeneración ósea, uno de los mayores retos en odontología regenerativa. El propósito de este estudio fue evaluar el potencial osteogénico de EGF y bFGF en células madre de pulpa dental (DPSCs). Las DPSCs humanas fueron aisladas utilizando microperlas magnéticas anti-CD105 y caracterizadas por citometría de flujo. Para inducir la diferenciación a osteoblastos, estas células fueron cultivadas en medio osteogénico suplementado con EGF y bFGF a baja concentración. La morfología celular y la expresión de los marcadores de superficie CD146 y CD10 fueron analizadas mediante microscopia de fluorescencia. Para medir la mineralización, se realizó un ensayo de alizarina roja y fueron evaluados los marcadores típicos de fenotipo osteoblástico mediante RT-PCR. El tratamiento con EGF indujo cambios morfológicos y supresión de los marcadores CD146 y CD10. Adicionalmente, las células fueron capaces de producir depósitos de calcio e incrementar la expresión de mRNA para fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OCN) en relación con los grupos control ($p < 0.001$). Sin embargo, bFGF mostro un efecto inhibitorio. Estos datos sugieren que las DPSCs en combinación con EGF podrían ser una efectiva terapia basada en células madre para ingeniería de tejido óseo en periodoncia e implantología oral.

ABSTRACT

Epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) play an important role in extracellular matrix mineralization, a complex process required for proper bone regeneration, one of the biggest challenges in dentistry. The purpose of this study was to evaluate the osteogenic potential of EGF and bFGF on dental pulp stem cells (DPSCs). Human DPSCs were isolated using anti-CD105 magnetic microbeads and characterized by flow cytometry. To induce osteoblast differentiation, the cells were cultured in osteogenic medium supplemented with EGF or bFGF at a low concentration. Cell morphology and expression of CD146 and CD10 surface markers were analyzed using fluorescence microscopy. To measure mineralization, an alizarin red S assay was performed and typical markers of osteoblastic phenotype were evaluated by RT-PCR. EGF treatment induced morphological changes and suppression of CD146 and CD10 markers. Additionally, the cells were capable of producing calcium deposits and increasing the mRNA expression to alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) in relation to control groups ($p < 0.001$). However, bFGF treatment showed an inhibitory effect. These data suggests that DPSCs in combination with EGF could be an effective stem cell-based therapy for bone tissue engineering applications in periodontics and oral implantology.

1. INTRODUCCIÓN

La capacidad de diferenciación multilínea de las células madre mesenquimales (MSCs) ha sido ampliamente estudiada en años recientes debido a su implicación en ingeniería tisular y medicina regenerativa (Bianco and Robey 2001; Pittenger *et al.*, 1999); sin embargo, este campo de investigación está actualmente enfrentándose con el desafío de desarrollar nuevas estrategias para regenerar defectos óseos extensos.

Algunos años atrás, Gronthos y colaboradores aislaron células madre de pulpa dental (DPSCs) de terceros molares humanos confirmando que estas células presentan la habilidad de diferenciarse en células odontogénicas/osteogénicas (Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003). Previos reportes han demostrado que la diferenciación osteogénica es exitosamente inducida por señales químicas tales como dexametaxona, ácido ascórbico y β -glicerofosfato (Riccio *et al.*, 2010; Langenbach and Handschel 2013; Yu *et al.*, 2010). Aunque estos compuestos tienen probada eficacia, el rol de los factores de crecimiento durante la osteogénesis ha sido el objetivo de muchos estudios enfocados en mejorar la mineralización de la matriz extracelular, un proceso fisiológico caracterizado por alta expresión de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OCN), seguida por deposición de calcio (Hoemann *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2007).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) son potentes mitógenos para muchos tipos de células incluidas las MSCs (Rodrigues *et al.*, 2010; Carpenter and Cohen 1990; Mroczkowski *et al.*, 1989). Idealmente, se espera que esos factores mantengan la capacidad de autorenovación y multipotencialidad de estas células (Tamama *et al.*, 2006), pero es sabido que dichos factores pueden promover la diferenciación hacia linajes especializados tales como los osteoblastos, un proceso complejo controlado por varios factores de crecimiento (Tsutsumi *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2007).

Ciertos estudios han demostrado que el bFGF afecta la diferenciación osteogénica de las DPSCs a través de inhibir la actividad enzimática de ALP y la mineralización (Qian *et al.*, 2014; Osathanon *et al.*, 2011). Este efecto ha sido observado también en células

madre de dientes deciduos humanos exfoliados (SHED) y células madre de ligamento periodontal (PDLSCs) (Li *et al.*, 2012; Osathanon *et al.*, 2013).

Por otra parte, es sabido que una gran variedad de células mesenquimales expresan normalmente el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un receptor tirosina-quinasa que activa rutas de señalización intracelular que determinan el destino de la célula (Fan *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2003). Evidencia emergente sugiere que el EGF trabaja como un potenciador de la mineralización durante la diferenciación osteogénica de las MSCs derivadas de medula ósea (Kratchmarova *et al.*, 2005; Platt *et al.*, 2009), sin embargo, el efecto de EGF en la diferenciación osteogénica de las DPSCs aún es desconocido.

El propósito de este estudio fue evaluar el papel de EGF y bFGF con la finalidad de identificar factores de crecimiento asociados a un efecto potenciador sobre la diferenciación osteogénica de las DPSCs. Tenemos la hipótesis de que la suplementación con EGF puede incrementar la mineralización en la diferenciación osteogénica de estas células. Nuestros resultados proveen evidencia que el tratamiento con EGF, pero no con bFGF, es capaz de incrementar la formación de depósitos de calcio, así como la expresión génica de ALP y OCN comparado con el medio osteogénico tradicional. Estas observaciones indican que EGF podría ser un efectivo adyuvante para mejorar la regeneración ósea en periodoncia e implantología oral.

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las fuentes tradicionales para obtención de MSCs (medula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical etc.) resultan muy costosas y requieren manejo hospitalario representando limitaciones importantes para su obtención. Por otra parte, estudios anteriores han demostrado el papel de algunos factores de crecimiento durante la osteogénesis, sin embargo, el efecto del EGF en la diferenciación osteogénica de las DPSCs aún es desconocido.

Estandarizar protocolos para la obtención, aislamiento y cultivo de las DPSCs, es de gran utilidad en el desarrollo de enfoques regenerativos en odontología basados en terapia celular, brindando de esta manera nuevos tratamientos clínicos que mejoren el pronóstico favorable de pacientes con algún déficit en el metabolismo óseo, los cuales tienen un pronóstico pobre en tratamientos implantológicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Aislar, caracterizar y cultivar una subpoblación de DPSCs CD105⁺ derivadas de premolares humanos y evaluar su potencial osteogénico *in vitro* utilizando EGF y bFGF.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar una subpoblación de DPSCs CD105⁺ y disociar el tejido pulpar de premolares humanos.
- Caracterizar inmunofenotípicamente las DPSCs CD105⁺ y estandarizar el cultivo celular primario.
- Evaluar el efecto de EGF y bFGF durante la diferenciación osteogénica *in vitro* de las DPSCs CD105⁺.
- Analizar los cambios morfológicos y expresión de los marcadores de superficie CD146 y CD10 durante la diferenciación osteogénica de las DPSCs CD105⁺.
- Analizar la expresión génica para las proteínas de mineralización en las DPSCs CD105⁺ diferenciadas a linaje osteogénico.

4. HIPÓTESIS

El EGF en baja concentración (10ng/ml) es capaz de incrementar la formación de nódulos mineralizados durante la diferenciación osteogénica *in vitro* de la subpoblación de DPSCs CD105⁺.

5. ANTECEDENTES

5.1 Células madre

Los mecanismos que posee el organismo de regeneración, reparación y renovación de tejidos son limitados y dependientes de la rapidez de instauración del daño o degeneración. En 1916 Danchakoff describe la presencia de una célula como precursora de otras en la médula ósea, lo que fue confirmado posteriormente por Sabin y Maximow, constituyendo estos hallazgos las primicias de los sucesos asociados a las células madre.

Una célula madre es una célula capaz de hacer réplicas exactas de sí misma indefinidamente. Además, dicha célula tiene la capacidad de producir líneas celulares especializadas para varios tejidos del cuerpo, tales como: músculo cardíaco, tejido cerebral, tejido hepático, fibras periodontales y dentina, entre otros; asimismo se le han atribuido propiedades funcionales tales como la capacidad de implantación persistente, tanto en tejidos dañados como en sanos (Danchakoff, 1916).

Las células madre fueron estudiadas de manera formal por primera vez en 1963 por Ernest A. McCulloch y James E. Till, cuando células de la médula ósea fueron inyectadas en ratones irradiados observando el crecimiento de tumores en los bazo de los animales. Los científicos llegaron a la conclusión de que los nódulos surgieron de una sola célula de la médula ósea. Además, encontraron que estas células eran capaces de autorenovarse, fenómeno y característica clave para su aplicación en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos. Existen 2 tipos principales de células madre, embrionarias y no embrionarias (Becker *et al.* 1963).

Las células madre se clasifican por su potencialidad en:

Totipotentes: Son aquellas que en las condiciones apropiadas son capaces de formar un individuo completo, pues pueden producir tejido embrionario y extra-embrionario.

Pluripotentes: Son las que tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias, aunque estas células por sí solas no pueden producir un individuo, ya que necesitan el trofoblasto; pero sí originan todos los tipos de células y tejidos del organismo. En esta categoría estarían las células provenientes de la masa celular interna (ICM).

Multipotentes: Estas pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos (Poulsom *et al.*, 2002; Bonner-Weir *et al.*, 2002).

Todas las células somáticas del organismo tienen, en principio, el mismo contenido genético no obstante, lo que distingue las células de una estirpe a otra no es la información genética de que disponen, sino la expresión diferencial de unos u otros genes, así, las células que expresan determinados genes, producen proteínas específicas.

Lo que determina qué genes expresa una célula, no es el contenido genético de la célula, sino factores externos al genoma, entre los que se hallan el microambiente en que vive la célula, que contiene gran cantidad y diversidad de señales que le indican y ordenan cuál debe ser su patrón de comportamiento. Estas señales se denominan factores epigenéticos (pueden ser factores externos a la célula o bien factores intracelulares).

5.1.1 Células madre embrionarias (ESC)

Las ESC son células pluripotentes que dan lugar a todos los tipos de células somáticas en el embrión. Las ESC puede ser una herramienta valiosa para la comprensión de los complejos mecanismos implicados en el desarrollo de células especializadas y el establecimiento de estructuras de órganos.

Por otra parte, la capacidad de autorenovación indefinida y plasticidad de las ESC permite la generación *in vitro* de un número ilimitado de linajes celulares distintos, y ha abierto nuevas vías para la medicina regenerativa (Klimanskaya *et al.*, 2006).

La mayor promesa terapéutica de las ESC humanas es generar células especializadas para sustituir tejidos dañados en pacientes que sufren de diversas enfermedades degenerativas. Sin embargo, los mecanismos de señalización implicados en la restricción del linaje de las ESC para adoptar diferentes fenotipos celulares aún están bajo investigación.

Por otra parte, para la progresión de las terapias basadas en células madre hacia aplicaciones clínicas, las condiciones de cultivo apropiadas deben ser desarrolladas para generar poblaciones homogéneas de células genéticamente estables, para evitar posibles efectos adversos tras el trasplante. Otros desafíos críticos que deben ser abordados para la implantación exitosa de células incluyen problemas relacionados con la supervivencia y la eficacia funcional de las células injertadas (Strelchenko *et al.*, 2004).

La generación de líneas de ESC a partir de la ICM en la etapa de blastocisto ha obligado hasta el momento a la destrucción del embrión, lo que ha suscitado preocupaciones éticas y políticas. Con el fin de abordar esta cuestión, muchos trabajos se han dedicado a aislar células en las primeras etapas del desarrollo embrionario sin destrucción del embrión. Los primeros intentos de eliminación de una célula en la etapa de 8 células o mórula resultaron en tasas de éxito variables y requieren co-cultivo de blastómeros aislados con líneas de ESC establecidas (Klimanskaya *et al.*, 2007).

La diferenciación de blastómeros de la ICM es altamente ineficiente porque los agregados de blastómeros dan mayormente lugar a vesículas. Para eludir este problema y aumentar la eficiencia de la derivación de líneas, se ha empleado un enfoque modificado usando medios de cultivo suplementados con laminina (Chung *et al.*, 2008).

Esta estrategia fue casi tan eficaz como los métodos convencionales utilizados para derivar líneas de células madre a partir de blastocistos enteros. La razón que sugirió este efecto esencial de la laminina es la simulación del nicho natural de la ICM, lo que impidió la polarización de los blastómeros en la ICM. Además, la optimización de las condiciones de cultivo para este nuevo procedimiento permite la generación con éxito de células madre derivadas de blastómeros en condiciones de alimentación libre, eliminando la necesidad de co-cultivos con capas de alimentación derivadas de animales o líneas de células madre previamente establecidas.

5.1.2 Células madre pluripotentes inducidas (iPS)

Las iPS se pueden derivar de células somáticas de ratón a través de la expresión ectópica de 4 factores definidos, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (también conocidos como factores Yamanaka) (Takahashi and Yamanaka 2006).

Las células iPS de ratón expresan marcadores de pluripotencia y los 2 cromosomas X se reactivan, permitiendo la diferenciación en diversos tipos de células de las 3 capas germinales cuando se inyectan en un blastocito. Esta tecnología hace la reprogramación mucho más fácil en comparación con los primeros métodos, tales como la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) acarreando problemas éticos derivados de la utilización de ovocitos humanos. Además, la generación de células iPS específicas del paciente podría ser utilizada para hacer nuevos fármacos (Mou *et al.*, 2012).

En la actualidad hay varias limitaciones clínicas en la aplicación de las células iPS. La eficiencia de la conversión de células somáticas a células iPS es todavía muy pobre. En particular, sólo aproximadamente del 0.1% al 1% de las células somáticas experimentan cambios en el nivel transcripcional y finalmente llegan a ser células madre pluripotentes cuando son utilizados enfoques de no integración.

Por otra parte, en comparación con las ESC, la capacidad potencial de desarrollo y diferenciación de las células iPS se reduce significativamente y no aumenta la variabilidad entre las líneas de células iPS. En ratones, sólo pequeñas proporciones de

estas células se reprograman totalmente basado en el ensayo más riguroso de complementación tetraploide para evaluar la pluripotencia. Por lo tanto, es necesario establecer un sistema molecular estricto para distinguir las células iPS reprogramadas plenamente de aquellas parcialmente reprogramadas, ya que actualmente se carece de pruebas adecuadas *in vivo* (Liang *et al.*, 2010).

Las iPS derivadas de células somáticas de los pacientes y representan una muy importante herramienta en el área de la biomedicina, ya que estas pueden proporcionar muchas fuentes de reemplazo. El uso de virus utilizados para la reprogramación representa una importante limitación en la tecnología actual ya que una expresión baja puede alterar la diferenciación de las iPS.

Las iPS, poseen alta capacidad de proliferación y diferenciación, se consideran una opción atractiva para la diferenciación osteogénica y regeneración ósea. Los descubrimientos recientes han demostrado que las células pueden diferenciarse en osteoblastos, lo que sugiere que las iPS tienen el potencial para avanzar en un futuro hacia terapias regenerativas para hueso. La diferenciación osteogénica y la regeneración ósea, han indicado que las iPS son una herramienta ideal para las terapias regenerativas con células y podría contribuir al desarrollo de una futura estrategia en ingeniería de tejido óseo (Soldner *et al.*, 2009).

5.1.3 Células madre mesenquimales (MSCs)

Las MSCs fueron caracterizadas por primera vez en 1976 por Friedenstein y colaboradores definiéndose como una célula multipotencial indiferenciada, no hematopoyética, capaz de proliferar y diferenciarse en distintos tipos celulares para luego constituir un tejido u órgano (Lymeri *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2013).

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso 3 criterios para definir las MSCs:

1. Adherencia en cultivo
2. Expresión positiva de los marcadores de membrana CD73, CD90 y CD105 en ausencia de marcadores hematopoyéticos tales como CD34, CD45, HLA-DR, CD14 y CD11b, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B.
3. Capacidad de diferenciación *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (Dominici *et al.*, 2006).

Las MSCs humanas son células multipotentes que están presentes en diversos tejidos en el adulto, estas pueden replicarse como células indiferenciadas y tienen el potencial de diferenciarse a linajes de tejidos mesenquimales, incluyendo hueso, cartílago, tejido adiposo, tendón y músculo (Pittenger *et al.*, 1999).

La transición epitelial-mesenquimal es crítica para el desarrollo embrionario adecuado, y este proceso se vuelve evidente en los adultos durante la cicatrización de heridas, regeneración de tejidos, fibrosis de órganos y la progresión del cáncer (Kalluri and Zeisberg 2006).

Las MSCs han sido aisladas principalmente de la médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo. También se han aislado del páncreas, hígado, musculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, tejido pulmonar, líquido articular, líquido amniótico y pulpa dental (Lymperi *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2009).

Su morfología ha sido descrita como células fibroblásticas alargadas, pero puede variar según la fuente de obtención (Gronthos *et al.*, 2000; Tuan *et al.*, 2002; Lymperi *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2013).

Actualmente dichas células son objeto de investigación clínica, ya que se sabe que pueden inducir regeneración ósea y se cree que pueden modular el sistema inmunológico, capacidad fundamental en trasplantes alogénicos. Sin embargo, no está

claro si las células alogénicas inducen diferenciación conservando sus características inmunomoduladoras (Ferrari *et al.*, 1998).

5.1.3.1 Células madre estromales de médula ósea (BMSCs)

El estroma de la médula ósea primitiva incluye las BMSCs. Estas son células progenitoras esqueléticas que se originan fuera de la cavidad ósea (del periostio y pericondrio primitivo) y se forman a lo largo de los vasos sanguíneos. Las BMSCs aparecen como células grandes que tienen nucléolos prominentes y difieren en gran medida de la morfología en forma de huso de los típicos cultivos de MSCs.

Las BMSCs en la médula ósea posnatal residen alrededor de los sinusoides, y mantienen un nicho de células madre hematopoyéticas (HSC), que, a su vez, apoyan la hematopoyesis. Las BMSCs también generan cartílago en condiciones específicas, tales como trauma. Además, son capaces de diferenciarse en adipocitos, astrocitos, condrocitos, hepatocitos, músculo, neuronas y osteoblastos.

5.1.3.2 Células madre adiposas (ASCs)

El tejido adiposo tiene una numerosa cantidad de células incluyendo adipocitos, células endoteliales, células de músculo liso y células que tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tejidos como hueso, cartílago, músculo esquelético, liso y cardíaco, endotelio, hepatocitos y células neuronales. Se ha demostrado que las ASCs tienen un gran potencial de diferenciación. Se ha observado *in vitro* que las ASCs se han diferenciado en células osteoblásticas que son capaces de depositar matriz extracelular mineralizada (Fraser *et al.*, 2006).

Por ejemplo, en un estudio se aislaron en gran número ASCs procedentes del tejido adiposo derivado de la liposucción y se examinó el potencial osteogénico de las células aspiradas. Las células aspiradas por liposucción se sometieron a una digestión proteolítica. Posteriormente se expusieron a la proteína morfogenética 2 (BMP-2)

exógena durante 4 o 7 días produciendo más precursores óseos que los osteoblastos (Dragoo *et al.*, 2003).

En un medio adecuado y usando una matriz extracelular artificial se puede obtener una diferenciación exitosa de las ASCs en osteoblastos. Las células generadas poseen capacidades similares al hueso. Las células tratadas con BMP-2 recombinante se diferencian rápidamente (Meruane *et al.*, 2010).

5.1.3.3 Células madre dentales (DSCs)

Las células que están implicadas en el proceso de odontogénesis tienen origen tanto ectodérmico como mesenquimal. Las células ectodérmicas son responsables de la formación del esmalte y se pierden después de la erupción de los dientes. Por lo tanto, las células MSCs son las que están disponibles para terapia celular. Yalvac y colaboradores demostraron que los gérmenes de dientes humanos contienen células pluripotentes que dan lugar a estructuras dentales y periodontales. Desde entonces, se ha descubierto que las DSCs son una fuente particularmente atractiva para futuras aplicaciones debido a sus propiedades combinadas (Yalvac *et al.*, 2010).

Un número de células madre postnatales de origen dental se han identificado y clasificado de acuerdo a su localización en las estructuras del diente:

- Células madre de pulpa dental (DPSCs)
- Células madre de folículo dental (DFSCs)
- Células madre de ligamento periodontal (PDLSCs)
- Células madre de papila apical (SCAPs)
- Células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED)

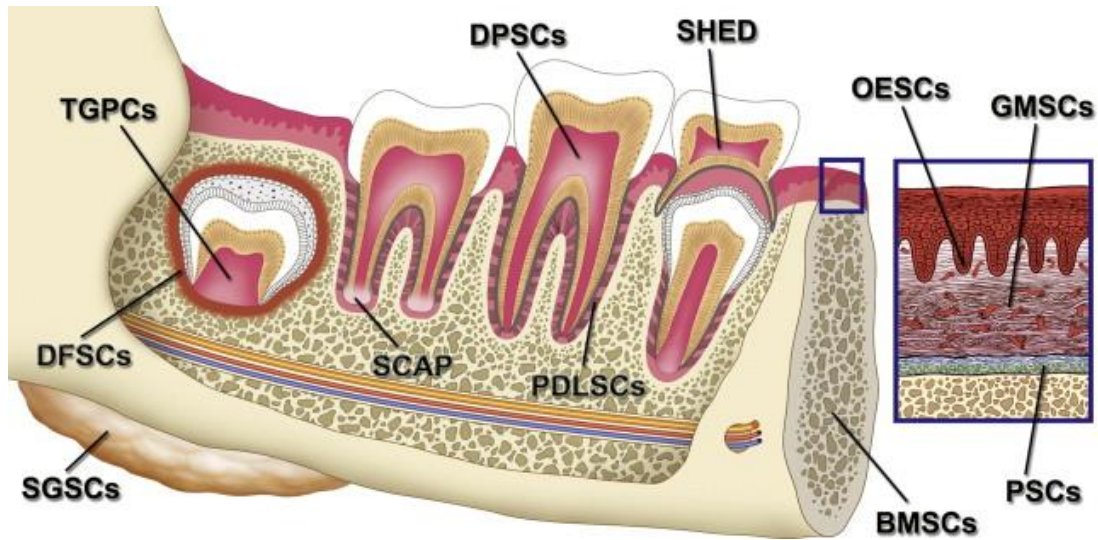


Figura 1. Células madre dentales (DSCs). Esquema que muestra las diferentes fuentes de obtención de las DSCs.

5.1.3.3.1 Células madre de pulpa dental (DPSCs)

Las DPSCs son una prometedora fuente de células para numerosas y variadas aplicaciones en medicina regenerativa. Su función natural es la producción y diferenciación a odontoblastos para crear dentina reparadora en respuesta a la lesión de estructuras dentales. Sin embargo, también se está investigando su potencial para la regeneración de tejidos fuera del diente.

La facilidad de aislamiento de las DPSCs desde la pulpa de dientes extraídos por razones de ortodoncia ofrece una prometedora fuente de células autólogas, y sus similitudes con las BMSCs sugieren aplicaciones regenerativas de origen músculo-esquelético.

Las DPSCs se derivan de la cresta neural y, por lo tanto, tienen un origen diferente que las BMSCs. Estas diferencias en el origen embrionario y fenotipo de las DPSCs son explotadas en la parte neurológica y otras aplicaciones.

Las DPSCs tienen un alto potencial de proliferación y diferenciación a odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos, neuronas y células del epitelio corneo (Munevar *et al.*, 2015).

A pesar de que los odontoblastos no pueden reparar dentina *in vivo*, las células progenitoras son capaces de migrar en el superficie dentinaria y diferenciarse en odontoblastos formando dentina de reparación (Liu *et al.*, 2006). Gronthos y colaboradores hace más de una década lograron aislar y caracterizar las DPSCs. Ellos demostraron posteriormente que una gran mayoría de las DPSCs expresan el marcador de pericitos 3G5 en comparación con una expresión menor en las BMSCs, lo que sugiere un rol perivascular.

La regeneración de tejido óseo es un área de la medicina que esta rápidamente evolucionando. Estas células pueden ser tratadas con diferentes combinaciones de factores de crecimiento. Las DPSCs son un candidato prometedor para la ingeniería tisular enfocada a estructuras mineralizadas como el hueso (Asutay *et al.*, 2015).

5.1.3.3.2 Células madre de ligamento periodontal (PDLSCs)

Las PDLSCs que residen en el espacio perivascular del periodonto, poseen características de MSCs y son una herramienta prometedora para la regeneración periodontal. Algunas investigaciones están intentando maximizar la proliferación y diferenciación potencial de las PDLSCs modificando las condiciones de cultivo y factores de crecimiento. Estas células se encuentran agrupadas en el ligamento periodontal y tienen características perivasculares, ellas pueden diferenciarse en fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos y osteoclastos.

El periodonto es un órgano complejo compuesto por epitelio mineralizado y tejido conectivo. En un estudio que tuvo como objeto evaluar el efecto osteogénico de la dexametasona sobre las PDLSCs se observó que esta puede estimular la proliferación de osteoblastos y fibroblastos. Las PDLSCs demostraron la capacidad de generar cemento y contribuir a la reparación de los tejidos periodontales. Por lo tanto, la aplicación de las PDLSCs puede ser una herramienta prometedora con enfoque terapéutico para la

reconstrucción de tejidos destruidos por enfermedades periodontales (Zhu and Liang 2015; Roozegar *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2015).

5.1.3.3.3 Células madre de la papila apical (SCAPs)

La papila apical hace referencia al tejido blando situado en los ápices de los dientes permanentes que se están formando. Existe una zona muy rica en células entre la papila apical y la pulpa dental, ahí residen las SCAPs.

Las SCAPs son células precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular, mientras que las DPSCs son, probablemente, las precursoras de los odontoblastos que forman la dentina reparativa (Sonoyama *et al.*, 2008).

Las SCAPs presentan ventajas para su utilización en reconstrucción de tejidos y estructuras dentales en comparación con las DPSCs (Bakopoulou *et al.*, 2011).

Los tratamientos regenerativos endodónticos son una alternativa para los dientes inmaduros con necrosis pulpar por medio de pastas antibióticas e hidróxido de calcio para desinfección (Nikita *et al.*, 2012).

Algunos dientes incluso después de un tratamiento endodóntico conservador sufren complicaciones y es ahí donde el tratamiento de regeneración tisular utilizando las SCAPs podría surgir como opción terapéutica (Huang *et al.*, 2008).

5.1.3.3.4 Células madre de folículo dental (DFSCs)

El folículo dental es un tejido conectivo laxo que rodea un diente no erupcionado. Desempeña un papel importante en la coordinación de la erupción de los dientes (Wise *et al.*, 2010). Este tejido produce factores de crecimiento y citocinas para regular la osteoclastogénesis y osteogénesis, ambas requeridas para la erupción dentaria (Wise *et al.*, 2002).

Algunos estudios han reportado el aislamiento de células progenitoras a partir del folículo dental. La población de células aisladas se identificó como DFSCs las cuales poseen capacidad de diferenciación multilinaje (Yao *et al.*, 2008). Similar a otras MSCs, las DFSCs se adhieren al plástico y pueden formar colonias (Morsczeck *et al.*, 2005). Además, se caracterizan por una alta tasa de proliferación, así como la expresión de marcadores de superficie característicos de MSCs (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2011).

La capacidad de diferenciación de las DFSCs se ha demostrado *in vitro* en estudios previos. Se ha observado que las DFSCs tienen una mayor capacidad de diferenciación hacia linaje osteogénico en comparación con las DPSCs que pueden diferenciarse también en odontoblastos (Yagyuu *et al.*, 2010). Por otra parte, otros estudios revelaron que el folículo dental contiene células madre heterogéneas que constan de diferentes subpoblaciones que varían en su morfología celular, patrón de expresión génica, así como la capacidad de diferenciación. Sin embargo, la heterogeneidad en la población no afecta su capacidad de formación de tejido mineralizado (Honda *et al.*, 2011).

La capacidad de diferenciación osteogénica *in vitro* de las DFSCs sugiere que pueden ser utilizadas para la regeneración de hueso *in vivo*. Sin embargo, pocos estudios se han efectuado para evaluar la formación ósea *in vivo* de las DFSCs. El trasplante subcutáneo de las DFSCs bovinas y humanas mezcladas con fosfato tricálcico/hidroxiapatita (HA/TCP) mostró la formación de estructura mineralizada (Yagyuu *et al.*, 2010).

5.1.3.3.5 Células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED)

Las SHED fueron aisladas por Miura y colaboradores en el año 2003 en pulpas dentales de dientes primarios y estas se caracterizaron por ser células que poseían una alta tasa de proliferación y capacidad de diferenciación a diversos linajes celulares tales como osteoblastos, células neurales, adipocitos y odontoblastos (Miura *et al.*, 2003).

Al igual que las DPSCs obtenidas de los dientes permanentes, estas células también pueden generar tejido pulpar y dentina, demostrando capacidad de diferenciación a células similares a odontoblastos y dentina mineralizada cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes en un andamio de HA/TCP (Shi *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que las SHED tienen una capacidad proliferativa mayor que las DPSCs aisladas de terceros molares, incisivos, o dientes supernumerarios e inclusive más que las BMSCs, debido a que representan una población de células madre en un estado más inmaduro (Sakai *et al.*, 2010).

Los estudios de Suchánek y colaboradores demostraron que las SHED tienen un tiempo de duplicación más alto que las DPSCs, en el que 69.8% de las células SHED estaban en fase S y G2, pero sólo el 56% de las DPSCs estaban en dichas fases. Además se ha observado que el perfil de marcadores de superficie de las células SHED difiere del encontrado en las DPSCs y BMSCs. Las SHED expresan genes de pluripotencia tales como OCT3/4, SOX2, y NANOG en niveles más altos que las DPSCs lo que abre su aplicación para regeneración de tejidos derivados de diferentes capas embrionarias (Govindasamy *et al.*, 2010).

5.2 Hueso, diferenciación osteogénica y remodelado óseo

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que exhibe 4 tipos de células: osteoblastos, células de revestimiento, osteocitos y osteoclastos. El tejido óseo ejerce funciones importantes en el cuerpo, tales como locomoción, apoyo y protección de los tejidos blandos así como almacenamiento de fosfato y calcio. A pesar de su apariencia inerte, el hueso es un órgano altamente dinámico que se reabsorbe de forma continua por los osteoclastos y es neoformado por los osteoblastos (Robling *et al.*, 2006).

Existe evidencia de que los osteocitos actúan como orquestadores de este proceso de remodelación ósea. Por otra parte, la función de las células óseas de revestimiento no

está bien clara, pero estas células parecen jugar un papel importante en el acoplamiento de la reabsorción ósea a formación ósea (Everts *et al.*, 2002).

La remodelación ósea es un proceso altamente complejo por el cual el hueso viejo se sustituye por nuevo hueso en un ciclo que consta de 3 fases:

- Iniciación de la resorción ósea por los osteoclastos
- Transición de resorción y formación de *novo* del hueso
- Formación de hueso por los osteoblastos (Sims and Gooi 2008).

Este proceso se produce debido a las acciones coordinadas de los osteoclastos, osteoblastos, osteocitos y otras células óseas. El proceso normal de remodelado óseo es necesario para la regeneración de la fractura y la adaptación del esqueleto para uso mecánico, así como para la homeostasis del calcio (Dallas *et al.*, 2013).

Por otro lado, un desequilibrio en la formación y resorción ósea resulta en el desarrollo de varias enfermedades óseas. Por ejemplo, la reabsorción excesiva por los osteoclastos sin la correspondiente cantidad de hueso neoformada por los osteoblastos contribuye a la pérdida ósea y osteoporosis, mientras que por el contrario puede dar lugar a una osteopetrosis. Por lo tanto, el equilibrio entre la formación ósea y la resorción es necesario y depende de la acción de varios factores locales y sistémicos incluyendo hormonas, citocinas y estimulación biomecánica.

Estudios recientes han demostrado que el hueso influye en la actividad de otros órganos y el hueso también se ve influido por órganos y sistemas del cuerpo, proporcionando nuevos conocimientos que evidencian la complejidad y la naturaleza dinámica del tejido óseo (Fukumoto and Martin 2009).

5.2.1 Osteoblastos y proteínas de mineralización

Los osteoblastos son células cúbicas que se encuentran a lo largo de la superficie del hueso y estos comprenden el 6.4% del total de células óseas residentes, siendo ampliamente conocidos por su función de formación ósea. Estas células muestran algunas características morfológicas como abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi prominente, así como diversas vesículas secretoras. Como células polarizadas, los osteoblastos secretan el osteoide hacia la matriz ósea.

Los osteoblastos se derivan de las MSCs. El compromiso de las MSCs hacia el linaje osteoprogenitor requiere la expresión de genes específicos, siguiendo algunos pasos programados, incluyendo la síntesis de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y miembros de la vía Wntless (Wnt).

La expresión de factores de transcripción relacionados con la osteogénesis, es crucial para la diferenciación hacia osteoblastos. Por ejemplo, en un estudio se observó que ratones deficientes del factor de transcripción 2 relacionado con el gen Runt (RUNX-2) se encontraban desprovistos de osteoblastos. RUNX-2, es un factor maestro en la diferenciación osteogénica y tiene un papel sobre-regulador en genes relacionados con fenotipo osteoblástico, tales como, ALP, sialoproteína ósea (BSP) y OCN (Fakhry *et al.*, 2013).

Una vez que un grupo de progenitores de osteoblastos expresan RUNX-2, se ha establecido que durante la diferenciación en osteoblastos, hay una fase de proliferación. En esta fase, los osteoprogenitores muestran actividad ALP y se consideran pre-osteoblastos. La transición de pre-osteoblastos a osteoblastos maduros se caracteriza por un aumento en la expresión de Osterix (OSX) y en la secreción de proteínas de la matriz ósea, tales como la OCN, BSP y colágeno tipo I. Además, los osteoblastos experimentan evidentes cambios morfológicos, convirtiéndose en células grandes y cúbicas (Ducy *et al.*, 1997).

La síntesis de la matriz ósea por los osteoblastos se produce en 2 pasos principales: la deposición de matriz orgánica y su posterior mineralización. En el primer paso, los osteoblastos secretan colágeno tipo I y proteínas no colágenas. A partir de entonces, la mineralización de la matriz ósea se lleva a cabo en 2 fases: la vesicular y la fibrilar. La fase vesicular se produce cuando porciones con un diámetro variable, que va desde 30 a 200 nm, llamadas vesículas de matriz, son liberadas por los osteoblastos en la matriz ósea recién formada en el que se unen los proteoglicanos y otros componentes orgánicos. Debido a su carga negativa, los proteoglicanos sulfatados inmovilizan iones de calcio que se almacenan dentro de las vesículas de la matriz. Cuando los osteoblastos secretan enzimas que degradan proteoglicanos, los iones de calcio son liberados de los proteoglicanos y se cruzan con los canales de calcio. Estos canales están formados por proteínas llamadas anexinas (Anderson, 2003).

Por otra parte, los compuestos que contienen fosfato se degradan por la ALP secretada por los osteoblastos y producen la liberación de iones fosfato dentro de las vesículas de matriz. A continuación, los iones de fosfato y calcio nucleon dentro de las vesículas, formando los cristales de hidroxiapatita. La fase fibrilar se produce cuando la sobresaturación de iones calcio y fosfato en el interior de las vesículas de matriz conduce a la ruptura de estas estructuras y los cristales de hidroxiapatita se extienden a la matriz circundante (Boivin and Meunier 2002).

5.2.2 Matriz extracelular ósea

El hueso está compuesto por sales inorgánicas y matriz orgánica. La matriz orgánica contiene proteínas de colágeno (90%), predominantemente colágeno tipo I, proteínas no colágenas que incluyen la OCN, osteonectina (SPARC), osteopontina (OPN), fibronectina, BSP, BMPs y factores de crecimiento. También hay pequeños proteoglicanos ricos en leucina incluyendo decorina, biglicano, osteoaderina y proteínas séricas.

El material inorgánico del hueso está compuesto fundamentalmente de iones fosfato y calcio; sin embargo, cantidades significativas de bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, fluorita, zinc, bario y estroncio también están presentes. Los iones de calcio y fosfato nucleon para formar los cristales de hidroxiapatita, que se representan por la fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Junto con el colágeno, las proteínas no colágenas de la matriz forman un andamio para la deposición de hidroxiapatita y dicha asociación es responsable de la rigidez y la resistencia típica del tejido óseo (Aszódi *et al.*, 2000).

La matriz ósea constituye un marco complejo y organizado que proporciona soporte mecánico y ejerce un papel esencial en la homeostasis ósea. La matriz ósea puede liberar varias moléculas que interfieren en la actividad de las células óseas y, en consecuencia, tiene una participación en la remodelación ósea. Dado que la pérdida de masa ósea por sí sola es insuficiente para causar fracturas óseas, se sugiere que otros factores, como modificaciones en las proteínas de la matriz ósea, son de crucial importancia para la comprensión y la predicción de fracturas óseas. De hecho, se sabe que el colágeno juega un papel crítico en la estructura y función del tejido óseo (Viguet-Carrin *et al.*, 2006).

De acuerdo con ello, se ha demostrado que existe una variación en la concentración de proteínas de la matriz ósea de acuerdo a la edad, nutrición, enfermedad y tratamientos anti-osteoporóticos, que pueden contribuir a deformación y fractura del hueso. Por ejemplo, se conoce que *in vivo* e *in vitro* el aumento en la síntesis de ácido hialurónico después del tratamiento con hormona paratiroidea (PTH) se relaciona con una resorción ósea posterior, lo que sugiere una posible relación entre la síntesis de ácido hialurónico y el aumento de la actividad osteoclástica (Owen and Shetlar 1968).

5.3 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos de señalización solubles capaces de instruir respuestas celulares específicas en un entorno biológico (Cross and Dexter

1991). La respuesta celular específica desencadenada por la señalización del factor de crecimiento puede resultar en una muy amplia gama de acciones celulares, incluyendo la supervivencia celular, control de la migración y diferenciación o la proliferación de un subconjunto específico de células.

La matriz extracelular contiene numerosos componentes tales como moléculas adhesivas, de señalización y de adhesión que se unen modulando la actividad de un gran número de factores de crecimiento (Ramirez and Rifkin 2003). El mecanismo de transmisión de la señal inicia con la secreción de factores de crecimiento por la célula productora. Los factores de crecimiento instruyen el comportamiento de la célula mediante la unión a receptores específicos transmembrana sobre las células diana. La maquinaria que participa en la unión del factor de crecimiento al núcleo de la célula implica una compleja serie de eventos como la fosforilación de proteínas del citoesqueleto, flujo de iones, cambios en el metabolismo, expresión génica, síntesis de proteínas y, finalmente, una respuesta biológica integrada (Cohen and Ren 1995).

5.3.1 Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

En 1986, Stanley Cohen recibió el Premio Nobel por dilucidar el papel del EGF en la regulación de la proliferación celular y el desarrollo (Carpenter and Cohen 1990). Se encontró que esta proteína pequeña (53 aminoácidos) mejoraba el crecimiento epidérmico y la queratinización. El trabajo de Cohen y colaboradores demostró que el EGF estimula directamente la proliferación de las células de la epidermis, y esta acción estimulante no dependía de otras influencias sistémicas u hormonales.

Las células que responden a EGF pueden hacerlo debido a que tienen receptores en la membrana celular que reconocen el factor. El EGF tiene afinidad por el EGFR que pertenece a una familia de receptores de tirosina-quinasa. Estos receptores están anclados en la membrana citoplasmática y comparten una estructura similar que se compone de un dominio extracelular de unión a ligando, una región hidrofóbica

transmembrana y un dominio tirosina-quinasa intracitoplasmática (Yarden and Sliwkowski 2001).

La unión del factor de crecimiento al receptor inicia una cascada de eventos moleculares que implican a la vía de señalización ERK/MAPK la cual finalmente conducirá, entre otros efectos, a la división celular. EGF tiene que estar presente en concentraciones muy bajas para efectuar cambios importantes en las células debido a que la señal que se inicia cuando un factor de crecimiento se une al receptor en la superficie celular se amplifica a través de la vía ERK/MAPK y termina cuando el DNA expresa una proteína y produce algún cambio en la célula (Heck *et al.*, 1992).

5.3.2 Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)

El bFGF es de gran importancia en aplicaciones clínicas debido a su actividad moduladora sobre la diferenciación celular así como el desarrollo de cartílago y tejido óseo (Banfi *et al.*, 2000).

Diversos estudios *in vitro* han atribuido varias funciones para el bFGF, entre ellas la estimulación de condrocitos, osteoblastos, angiogénesis y regulación de la hematopoyesis. Tanto las BMSCs como los osteoblastos producen bFGF y se ha demostrado que este factor se encuentra en abundancia dentro de la matriz ósea. También se ha sugerido que el bFGF puede preferentemente ser atrapado en la matriz ósea por proteínas de unión específicas, además de ser sintetizado por las células óseas. Se ha determinado que la función primaria del bFGF es mitogénica, específicamente, reduciendo el tiempo medio de replicación celular acortando la fase G1 del ciclo celular. Estas observaciones indican que el bFGF es capaz de aumentar la osteogénesis mediante la estimulación y replicación de células óseas, lo que aumenta el número de células que sintetizan colágeno, pero tiene un efecto inhibitorio osteoblástico sobre la síntesis de colágeno (Canalis *et al.*, 1988).

En un estudio con células derivadas de periostio, se observó una disminución en todos los parámetros osteoblásticos, es decir, la expresión génica de OCN, colágeno, actividad de la ALP y contenido de calcio.

En otro estudio se demostró que el bFGF también es un potente inhibidor de la diferenciación, impidiendo a las MSCs del periostio diferenciarse en condroblastos u osteoblastos (Iwasaki *et al.*, 1995).

5.3.3 Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

El PDGF, al igual que sus homólogos, inicia una serie de respuestas biológicas en las MSCs que incluyen proliferación, quimiotaxis y degradación de la matriz extracelular; especialmente es expresado durante la cicatrización de la fractura ósea, además dicho factor es mitogénico y quimiotáctico para células osteoblásticas *in vitro* estimulando la formación de nuevo hueso *in vivo* (Pfeilschifter *et al.*, 1992).

Los efectos de PDGF son bastante similares a los de bFGF; además, PDGF puede inhibir el fenotipo osteoblástico por la disminución de la actividad de ALP y la síntesis de colágeno en la matriz, o no tener algún efecto, por ejemplo, en la producción de OCN.

Generalmente, el PDGF tiende a aumentar la replicación pero no la diferenciación osteogénica. En contraste con bFGF, el PDGF estimula la resorción ósea, aumentando significativamente el número de osteoclastos y la degradación del colágeno, posiblemente debido a una elevación en los niveles de colagenasa (Canalis *et al.*, 1989).

5.3.4 Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)

El IGF, también conocido como somatomedina C, es una hormona de crecimiento sintetizada en órganos viscerales, tejido neural y células esqueléticas. Actúa como un modulador sistémico y local del crecimiento esquelético así como de agentes sistémicos

tales como algunas hormonas. El suero humano contiene varios tipos de IGF, las 2 formas principales son IGF-1 e IGF-2, siendo IGF-1 el de mayor papel osteogénico. En cuanto a sus efectos, IGF-1 funciona de manera autocrina/paracrina, regulando las funciones proliferativas y de diferenciación en células óseas (Baylink *et al.*, 1993).

A diferencia de bFGF y PDGF, el IGF-1 ha demostrado estimular la proliferación y síntesis de matriz ósea *in vitro*, es decir, aumenta la replicación de las células de linaje osteoblástico (probablemente pre-osteoblastos) además de incrementar la síntesis de colágeno así como la expresión de proteínas como ALP y OCN. Este efecto parece ser debido a 2 señales reguladoras: en primer lugar, su influencia directa sobre los osteoblastos diferenciados (aumento de la producción de colágeno tipo I) y en segundo lugar, un aumento de la replicación de las células osteoprogenitoras, dando un mayor número de osteoblastos funcionales; estos efectos pueden ser disociados entre sí bioquímicamente, sugiriendo mecanismos independientes (Hock *et al.*, 1988).

La insulina, en comparación, también estimula la síntesis de colágeno en la matriz ósea, pero no altera la replicación celular. Al igual que muchos otros factores locales, IGF-1 actúa tanto en la formación de hueso como en la resorción ósea (Kream *et al.*, 1985).

5.3.5 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

La ingeniería de tejido óseo basado en terapia celular se ha convertido en un enfoque prometedor para la regeneración ósea *in vivo*. Sin embargo, la vascularización insuficiente durante el proceso de remodelado óseo, en especial en grandes defectos presenta resultados deficientes en la formación ósea debido a una necrosis del hueso. Por lo tanto, la vascularización después de la implantación *in vivo* es esencial para la formación exitosa de nuevo tejido óseo. Este proceso de vascularización está regulado por múltiples factores, entre ellos el VEGF que actúa como factor clave en estos procesos (Kang *et al.*, 2015).

El VEGF es un conocido mediador de vías de señalización en la angiogénesis y osteogénesis. La angiogénesis y la formación ósea se acoplan durante el desarrollo postnatal del esqueleto para una efectiva remodelación ósea (Marini *et al.*, 2015).

Además, uno de los factores pro-angiogénicos más importantes es el VEGF que también incrementa la permeabilidad microvascular, que puede preceder y acompañar a la angiogénesis (Hoeben *et al.*, 2004).

La comprensión de los mecanismos por los que las BMSCs se diferencian en osteoblastos formando el hueso es crucial para desarrollar estrategias en el tratamiento de varias enfermedades óseas, por lo tanto, los descubrimientos recientes han proporcionado importantes conocimientos nuevos sobre los mecanismos por los que el VEGF interactúa con las BMSCs (Berendsen and Olsen 2015).

5.3.6 Factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β)

El TGF- β es una superfamilia compuesta por más de 40 miembros, tales como TGF-betaS, Nodal, activina y las BMPs. TGF- β transmite señales a través de la membrana plasmática mediante la formación de complejos heteroméricos de tipo I y tipo II específicos de receptores serina/reonina quinasa (Guo and Wang 2009).

El TGF- β y las BMPs tienen un importante papel en la formación de hueso durante el desarrollo de los mamíferos y llevan a cabo funciones versátiles en el cuerpo. Las interrupciones en la señalización de TGF- β /BMPs han sido implicadas en múltiples enfermedades óseas incluyendo metástasis tumoral, braquidactilia tipo A2 y osteoartritis (Siegel and Massague 2003).

La estimulación autocrina y paracrina por el TGF- β es importante en el mantenimiento y la expansión de las células troncales y progenitores de osteoblastos (Derynck and Akhurst 2007). El hueso y cartílago contienen grandes cantidades de TGF- β y células diana con actividad para TGF- β .

En etapas del desarrollo, las poblaciones de osteoblastos de hueso fetal son más sensibles al efecto mitogénico de TGF- β en comparación con poblaciones similares de recién nacidos. Además, la señalización de TGF- β también promueve la proliferación de células osteoprogenitoras, diferenciación temprana y compromiso con la estirpe osteoblástica a través de la vía de las MAPKs.

5.3.7 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Para desarrollar una estrategia de ingeniería de tejidos eficaz aplicada a la regeneración ósea, los reguladores clave de este proceso deben ser identificados e incorporados. Las investigaciones hasta la fecha se han centrado en la inducción de la regeneración ósea a través de la entrega de varias moléculas bioactivas y células osteoprogenitoras. Sin embargo, la reciente información sobre el papel crítico de las citocinas pro-inflamatorias en la cicatrización ósea, incluyendo el TNF- α , ha dejado ver una nueva dirección en la bioingeniería y construcción de tejido óseo (Lin *et al.*, 2009).

Aunque se ha estudiado el impacto de la señalización del TNF- α en hueso maduro durante la osteoporosis, artritis reumatoide y otras patologías, el papel de la señalización de TNF- α durante la cicatrización ósea no está bien entendido.

Estudios recientes sugieren que el TNF- α juega un papel importante en la renovación ósea. La expresión del TNF- α se eleva inmediatamente después de la lesión ósea y se eleva de nuevo en etapas posteriores durante la regeneración ósea (Mountziaris and Mikos 2008). La ausencia de señalización por el TNF- α *in vivo* deteriora la reparación de la fractura ósea, lo que retrasa la osificación endocondral, sin tener efecto en el desarrollo esquelético, lo que sugiere que el TNF- α desempeña un papel único en la osteogénesis postnatal (Gerstenfeld *et al.*, 2003).

5.3.8 Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)

Las BMPs fueron descubiertas por Urist en 1960 y hasta la fecha, alrededor de 20 miembros de la familia de las BMPs se han identificado y caracterizado. Estas moléculas de naturaleza proteica tienen un rol en diversos procesos biológicos tales como patrones del tejido embrionario y homeostasis del tejido posnatal, principalmente a través de la activación de vías de señalización donde señales intracelulares juegan un papel central en la entrega de los mensajes extracelulares al núcleo.

Las BMPs son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la familia del TGF- β . Las moléculas de BMPs son capaces de inducir cartílago ectópico y formación de hueso, un proceso que imita la formación de hueso endocondral embrionario. Las BMPs con mayor capacidad osteogénica son BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, y BMP-9. La BMP-2 puede ser utilizada en diversas intervenciones terapéuticas, tales como defectos óseos, fracturas, osteoporosis y cirugía del conducto radicular (Chen *et al.*, 2004).

La BMP-2 se expresa en áreas circundantes a las condensaciones iniciales de cartílago, periostio y zonas osteogénicas actuando como mediador retinoide.

La BMP-2 y BMP-7 tienen una importancia significativa en el desarrollo óseo y en una amplia gama de tejidos fuera del hueso; la BMP-7 juega un papel clave en la diferenciación de osteoblastos y en el desarrollo renal.

El conocimiento de las características biológicas, mecanismos de acción y los métodos de funcionamiento de las BMPs es imprescindible para la regeneración ósea. La aplicación clínica actual de las BMPs es segura y eficaz como resultado de una cascada bien regulada de acontecimientos que conducen a la formación de hueso (Termaat *et al.*, 2005).

5.4 Dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerolfosfato

Diversos protocolos de diferenciación osteogénica con dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerolfosfato se utilizan con frecuencia para enfoques experimentales, incluyendo la ingeniería de tejidos o simplemente para probar las capacidades de diferenciación de algunos tipos de células en particular. Las células madre de varios tejidos son candidatas prometedoras para tales enfoques. Sin embargo, sólo unos pocos tipos de células son capaces de formar hueso heterotópico mientras que muchos tipos de células son capaces de formar tejido mineralizado.

La dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerolfosfato orquestan varios mecanismos de regulación durante un periodo de tiempo. Varios enfoques se han llevado a cabo con el fin de dilucidar la función de la dexametasona, que a menudo han dado lugar a resultados contradictorios debido a diferencias en el estado de diferenciación y el potencial osteogénico de las células (Robey, 2011).

El ácido ascórbico se requiere como co-factor para enzimas que hidroxilan prolina y lisina en pro-colágeno. En ausencia de ácido ascórbico, la prolina no puede ser hidroxilada y las cadenas de colágeno no son capaces de formar una estructura helicoidal adecuada. Por lo tanto, el papel del ácido ascórbico en la diferenciación osteogénica se atribuye principalmente a la secreción de colágeno tipo I en la matriz extracelular (Franceschi and Iyer 1992).

Finalmente, el β -glicerolfosfato juega un papel importante en la diferenciación osteogénica de las BMSCs. A pesar de ser la fuente de fosfato necesaria para producir el mineral hidroxiapatita, los hallazgos recientes han demostrado que el fosfato inorgánico actúa como una molécula de señalización intracelular para regular la expresión de muchos genes osteogénicos, incluyendo el gen de la BMP-2 (Tada *et al.*, 2011).

6. MÉTODOS

Universo de estudio

Humanos adultos jóvenes (18-24 años de edad) sin distinción de sexo

Criterios de inclusión

Dientes premolares superiores e inferiores erupcionados

Criterios de exclusión

- Dientes premolares seccionados o fracturados
- Dientes premolares con caries

Determinación del tamaño de muestra

Por las condiciones de la variable a evaluar del tipo cualitativa (diferenciación osteogénica de las DPSCs de dientes premolares humanos) donde además, se trata de una población infinita y se pretende que la muestra sea del tipo probabilístico, se estima el tamaño de la muestra con la aplicación de la siguiente fórmula general:

$$n = \frac{z^2 p(1-p)}{e^2}$$

Para una confianza del 95% se tiene el valor $Z= 1.96$, con un grado de error del 19% $e= 0.19$ y considerando una proporción p del 75% $p= 0.75$.

Para obtener el tamaño de la muestra se sustituyen los valores y se obtiene que:

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.25)(0.75)}{(0.19)^2} \quad n = 19.95 \approx 20$$

El número total de casos del proyecto será de 20 dientes premolares humanos a los cuales se les aplicará el procedimiento de odontosección selectiva para extraer el tejido pulpar para su estudio.

6.1 Selección de pacientes

El reclutamiento de pacientes voluntarios se llevó a cabo en el Posgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), donde se realizó a los candidatos a donador una historia clínica y examen radiográfico para la selección de dientes premolares a extraer, de esta manera se descartó la presencia de caries dental como factor bacteriano, así como patología a nivel de la zona periapical ó fractura dentaria.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la UANL y se llevó a cabo de acuerdo con las normas éticas establecidas en la Declaración de Helsinki, 1964 y sus modificaciones posteriores. Se explicó a los pacientes sobre las especificaciones e implicaciones del proyecto de investigación. El consentimiento informado se obtuvo de todos los donantes.

6.2 Extracción de piezas dentales

Para la extracción de las piezas dentales se utilizó un protocolo modificado para garantizar la vitalidad y óptimas condiciones del tejido pulpar. Primeramente se indicaron a los donadores colutorios bucales con clorhexidina (CHX) al 0.12% (Consepsis, Ultradent USA) previo a la cita durante 1 semana, esto con el objetivo de

disminuir la carga bacteriana evitando contaminación de los tejidos periapicales posterior a la extracción dental.

Una vez transcurrido el tiempo de profilaxis, se realizaron las extracciones de los dientes premolares aplicando benzocaína al 20% (Oralsone, USA) en el sitio de la punción e infiltrando mepivacaína al 3% (Septodont, USA) como anestésico local.

El procedimiento quirúrgico se realizó de manera atraumática en el menor tiempo posible para garantizar la integridad dental y pulpar, utilizando un instrumento quirúrgico tipo Hollenback (Hu-Friedy, USA) para la debridación del tejido blando y posteriormente las piezas dentales fueron luxadas utilizando elevadores rectos de hoja estrecha y ancha (Hu-Friedy) (Figura 2).

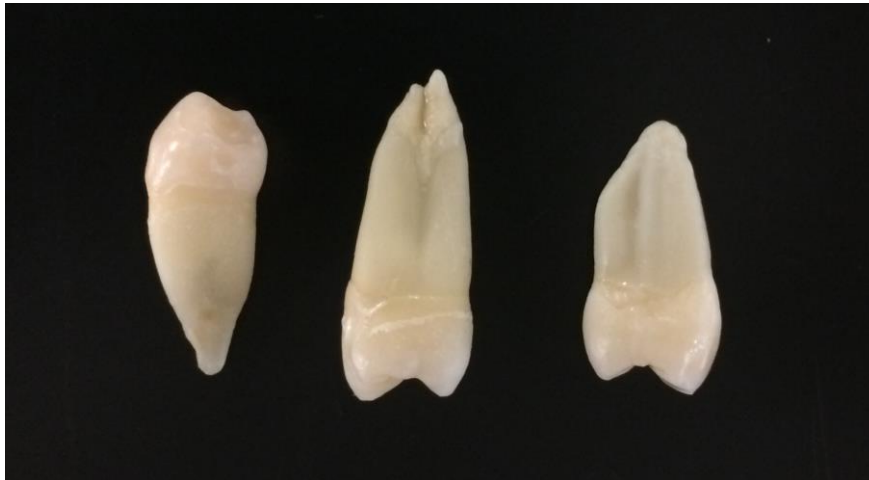


Figura 2. Dientes premolares humanos. Imagen donde se observa la diferente anatomía dental de dientes premolares inferiores y superiores extraídos por motivos de ortodoncia en pacientes adultos jóvenes.

Una vez extraídas las piezas dentales, se lavaron con buffer de fosfatos 1X (PBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para retirar restos de sangre e inmediatamente fueron inmersas en tubos estériles de 50 ml (Corning, NY, USA) que contenían una solución de transporte compuesta por PBS 1X, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Figura 3).

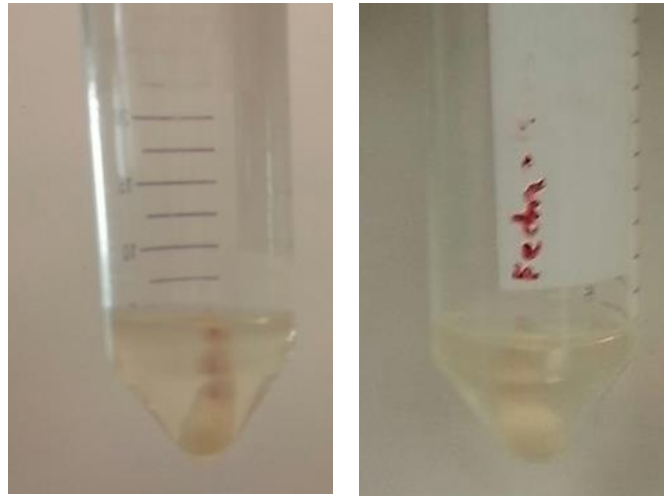


Figura 3. Medio de transporte para órganos dentarios. Imágenes de dientes premolares humanos dentro de la solución de transporte compuesta por PBS 1X, antibióticos y antimicótico.

6.3 Obtención de pulpa dental

Una vez en el laboratorio, los dientes premolares fueron seccionados mediante odontosección selectiva con un disco flexible de diamante con un diámetro de 0.10 mm (Brasseler, USA) que fue colocado en una pieza de mano de baja velocidad; el corte fue realizado a 800 rpm sobre la unión amelo-cementaria respetando la conformación y anatomía de la cámara pulpar para obtener lo más íntegro posible la porción radicular de la pulpa dental a extraer. Posteriormente, se contorneó la circunferencia de la raíz y simultáneamente se utilizó constante irrigación con PBS 1X para finalmente fracturar el diente exponiendo el tejido pulpar que fue extraído en condiciones de esterilidad (Figura 4).

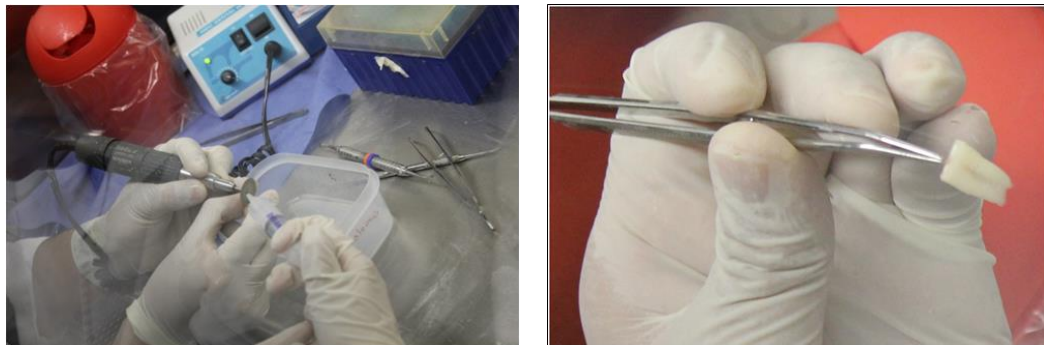


Figura 4. Odontosección selectiva y pulpa dental. Imágenes que muestran la fragmentación dental para extraer el tejido pulpar íntegro.

El tejido fue retirado utilizando pinzas de curación y colocado en tubos Eppendorf (Eppendorf, Inc., Enfield, USA) de 1.5 ml con 1 ml de solución de transporte, posteriormente se etiquetaron las muestras y se conservaron en refrigeración a 4° C. Las muestras de pulpa dental se obtuvieron de 20 dientes premolares humanos extraídos por razones de ortodoncia de pacientes sanos. Finalmente fue incluido dentro del estudio solamente las pulpas dentales del paciente más joven (18 años de edad) para garantizar una homología celular.

6.4 Disgregación de tejido pulpar

La disociación mecánico-enzimática del tejido pulpar se realizó utilizando la tecnología Alemana GentleMACS[®] Dissociator (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany) y enzimas. Las muestras de pulpa dental fueron colocadas dentro de un tubo C (Miltenyi Biotech), seleccionando el programa establecido para tejido tumoral adicionando 4.7 ml de PBS 1X comenzando con una disgregación mecánica a 1640 rpm. Posteriormente la porción disgregada se colocó en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37° C en baño de María. Pasado el tiempo de digestión enzimática se lavó la muestra 3 veces con PBS 1X utilizando centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos para finalmente re-suspender el botón celular y filtrar con una malla de nylon de 70 µm (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (Figura 5).

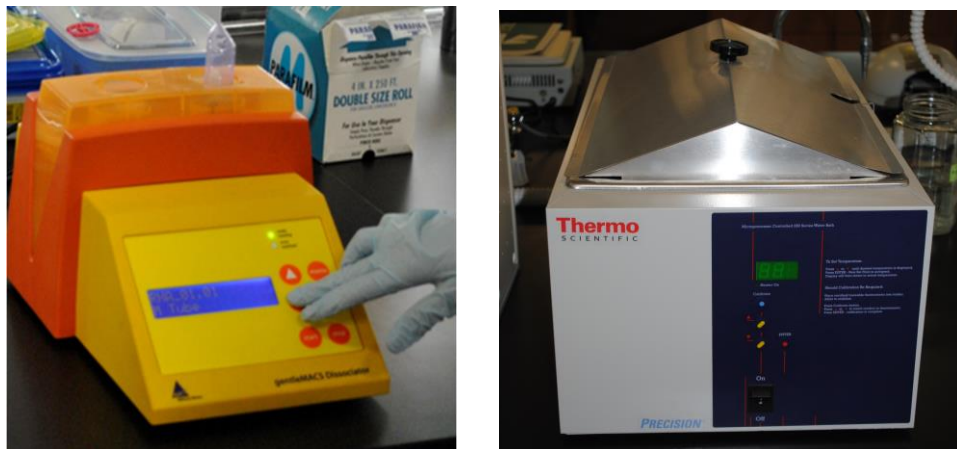


Figura 5. Disociación tisular mecánico-enzimática. Imágenes donde se observa la disociación mecánica del tejido pulpar utilizando GentleMACS[®] Dissociator e incubación con colagenasa tipo I y dispasa.

6.5 Cultivo celular

La suspensión de células de pulpa dental (DPCs) fue centrifugada a 1200 rpm durante 10 minutos realizando 2 lavados con PBS 1X; las células fueron resuspendidas en medio completo de crecimiento compuesto de α -modified Eagle's medium (α -MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y 0.25 μ g/ml de anfotericina B (Sigma-Aldrich). Las células fueron cultivadas a 37° C en una atmosfera con 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 3 semanas en frascos de 25 cm² (Corning). El medio fue renovado cada 3 días. Posterior al cultivo primario se realizó una expansión celular en frascos de 75 cm² (Corning) (Figura 6).

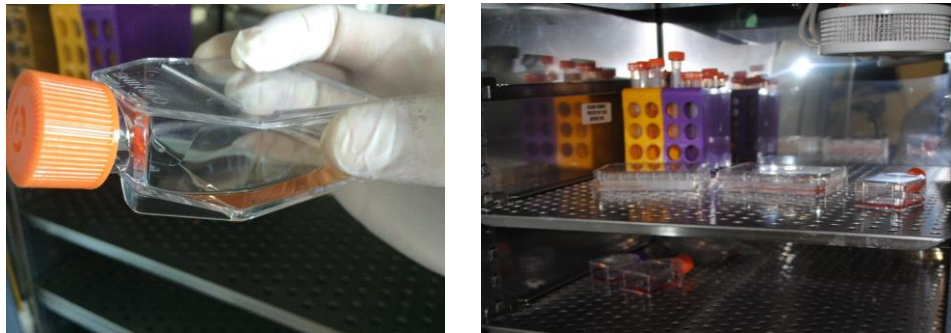


Figura 6. Cultivo celular primario. Imágenes donde se observa la incubación durante 3 semanas de las DPCs pase 0 en condiciones atmosféricas controladas a 37° C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

6.6 Separación magnética

Para la selección de la subpoblación de interés, se realizó una clasificación celular utilizando MACS® Pro-Separator con microperlas magnéticas biodegradables de 50 nm CD105 anti-humano de acuerdo al protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec). Las células marcadas con el anticuerpo monoclonal se colocaron en una columna MS compuesta por esferas ferromagnéticas (Miltenyi Biotec). La columna se colocó sobre el separador magnético y las esferas ampliaron el campo magnético 10,000 veces. Se realizó un lavado de la columna con 500 μ l de PBS 1X, se llevó la suspensión celular dentro de la columna y posteriormente mediante 3 lavados fue recolectada la fracción negativa de células no marcadas con el anticuerpo. Finalmente después de recolectar

esta fracción se retiró la columna MS y con la ayuda del embolo mediante empuje de una sola intension, la muestra celular fue introducida dentro de un tubo estéril de 15 ml (Corning) siendo esta la fracción positiva de interés, es decir la subpoblación celular CD105⁺ (Figura 7).



Figura 7. Separación magnética. Imágenes del MACS® Pro-Separator utilizado para clasificar las DPSCs CD105⁺ y la columna MS.

6.7 Criopreservación celular

Posterior a la clasificación magnética de las DPSCs CD105⁺, estas fueron almacenadas en crioviales (Corning) a una densidad de 1×10^6 células/ml, congeladas a -80° C y mantenidas en medio de criopreservación compuesto por 70% de medio completo de crecimiento, 20% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para ensayos posteriores, las DPSCs CD105⁺ fueron descongeladas utilizando la técnica de descongelación rápida incubando el vial en baño de María durante 1 minuto hasta su descongelación completa; inmediatamente después se eliminó el DMSO mediante 3 lavados con PBS 1X y centrifugación a 1200 rpm (Figura 8).



Figura 8. Criopreservación celular. Imágenes de las DPSCs CD105⁺ congeladas a -80° C.

6.8 Citometría de flujo

Para confirmar el inmunofenotipo de las MSCs, las DPSCs CD105⁺ aisladas por separación magnética se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales anti-humano: CD105-FITC, CD73-PE, CD13-PE, CD45-FITC, CD34-PE, HLA-DR-PerCP, CD14-PE, CD11b -PE (BD Biosciences) y CD90-FITC (Miltenyi Biotech). Los anticuerpos fueron añadidos a 1×10^5 células por muestra y después se incubaron durante 30 minutos a 4° C en oscuridad. Las células teñidas se lavaron y se resuspendieron en PBS 1X con paraformaldehído al 4%. Finalmente se analizaron todas las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences) (Figura 9).

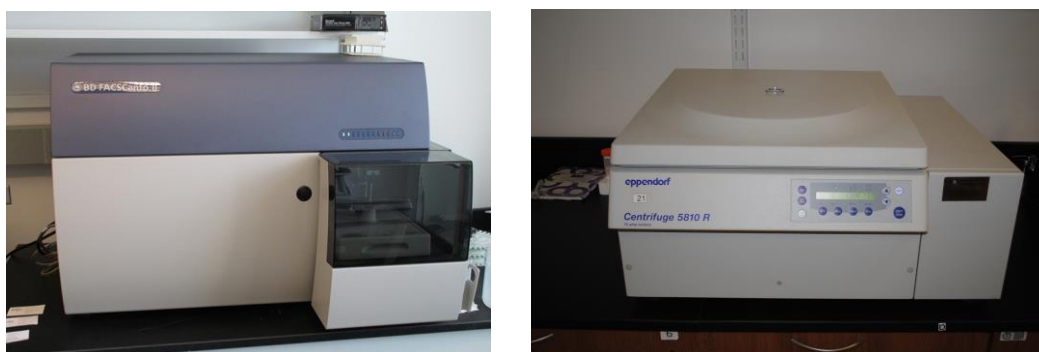


Figura 9. Citometría de flujo. Imágenes del citómetro de flujo FACSCalibur™ y centrifuga Eppendorf.

6.9 Ensayo de auto-fluorescencia inducida por formalina

Las DPSCs CD105⁺ se sembraron en placas de 6 pozos (Corning-Costar, Corning, New York, USA) a una densidad de 3×10^4 células por pozo y se cultivaron durante 7 días en α -MEM como control negativo y medio osteogénico (OM) como control positivo, compuesto de α -MEM, 10^{-7} M de dexametasona, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich). Al mismo tiempo, las células se incubaron con OM más 10 ng/ml de EGF humano (OM + EGF) (Miltenyi Biotech) y OM más 10 ng/ml de bFGF humano (OM + bFGF) (Life Technologies, Rockville, MD, USA). Las células cultivadas se lavaron y se fijaron con formalina al 10% amortiguada a pH neutro (BDH Chemicals, Ltd, UK) durante 30 minutos. Las células fijadas se

incubaron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a temperatura ambiente durante 5 minutos en oscuridad. Las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) (Figura 10).

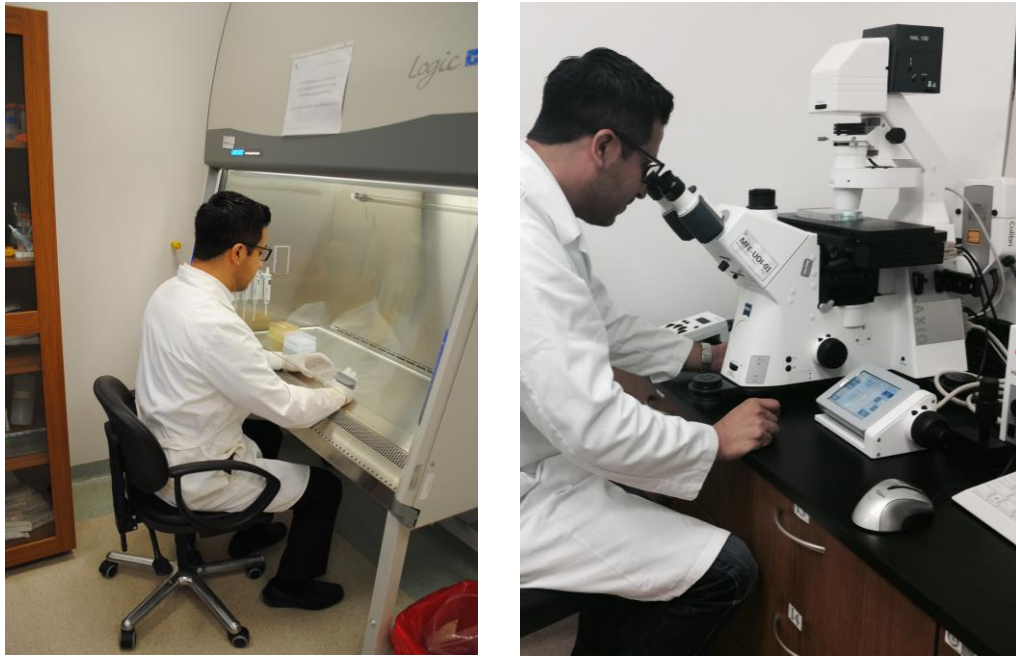


Figura 10. Microscopia de fluorescencia. Imágenes donde se observa la preparación de muestras dentro de una campana de flujo laminar así como el registro de micrografías en un microscopio Zeiss Axiovert 200 M.

6.10 Inmunocitoquímica

Las DPSCs CD105^+ se sembraron en cámaras para cultivo de 8 pozos con portaobjetos (cámara Lab-Tek Slide, Nunc, Germany) a una densidad de 2.5×10^3 células por pozo y se mantuvieron en α -MEM, OM, OM + EGF y OM + bFGF durante 7 días.

Las células cultivadas se fijaron con metanol frío durante 10 minutos y después se incubaron en PBS 1X con albumina sérica bovina (BSA) al 2% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células fijadas se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales obtenidos de ratón: CD146-FITC anti-humano (Miltenyi Biotech) y

CD10-FITC anti-humano (BD Biosciences). Finalmente, se realizó una contratinción con DAPI y después se analizó su expresión por microscopía de fluorescencia (Figura 11).

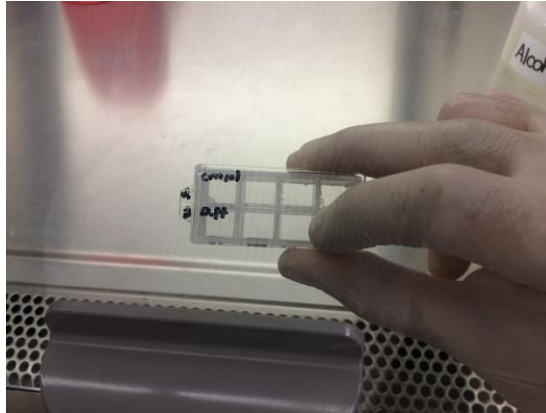


Figura 11. Inmunocitoquímica. Imagen que muestra la cámara de cultivo con fondo de cristal donde se realizó la inmunotinción con los anticuerpos marcados con FITC.

6.11 Diferenciación osteogénica

Las DPSCs CD105⁺ se sembraron en placas de 24 pozos (Corning-Costar) a una densidad de 6×10^3 células por pozo y se cultivaron en α -MEM durante 24 horas. Las DPSCs se lavaron con PBS 1X y fueron mantenidas en diferentes medios de cultivo: α -MEM, OM, OM + EGF y OM + bFGF a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 21 días. Todos los medios se renovaron cada 3 días.

6.12 Ensayo de alizarina roja

Después de 21 días de inducción osteogénica, las células se fijaron con formalina al 10% amortiguada a pH neutro durante 30 minutos. Las células fijadas se lavaron y después se incubaron con la tinción de alizarina roja al 2% (pH 4.2) (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad con agitación suave. Después de la tinción, se lavaron 4 veces con PBS 1X. Las células se analizaron por microscopía de luz y después se incubaron con cloruro de cetilpiridinio (CPC) en una concentración de 100 mM a 37° C durante 1 hora para solubilizar los depósitos de calcio extracelulares unidos a la alizarina roja. Se transfirieron 200 μ l de cada muestra a placas negras de 96

pozos (Corning-Costar). La concentración de alizarina roja se determinó por absorbancia a 495 nm en un lector de microplacas Imark™ (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) (Figura 12) (Stanford *et al.*, 1995).



Figura 12. Tinción de alizarina roja. Imagen donde se muestra la preparación de alizarina roja así como el lector de placas para determinar la absorbancia a 495 nm.

6.13 Purificación de RNA y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

El RNA se extrajo a partir de las células cultivadas en los 4 medios; α -MEM, OM, OM + EGF y OM + bFGF, utilizando *TRI reagent*™ (Molecular Research Center; Cincinnati, OH, USA) y siguiendo el protocolo del fabricante. Se tomaron 5×10^6 células, las cuales fueron incubadas con 1 ml de *TRI reagent*™ durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual, se añadieron 200 μ l de cloroformo. Después de mezclar intensamente y centrifugar a 12,000 g por 15 minutos a 4⁰ C, se colectó la fase superior en un tubo nuevo. Se añadieron 500 μ l de isopropanol y la mezcla resultante se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 12,000 g por 15 minutos a 4⁰ C para formar un botón de ácido ribonucleico (RNA). El botón de RNA fue lavado con 1 ml de etanol al 75% y secado al aire durante 5 minutos. El RNA fue resuspendido en 50 μ l de agua libre de RNasas.

El rendimiento de la extracción de RNA, fue estimado mediante lecturas de absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro *SmartSpec*™ Plus (Bio-Rad;

Hercules, CA, USA). La pureza fue calculada a partir de absorbancia a 260 nm/280 nm y la integridad se comprobó con una electroforesis en gel de agarosa al 1% suplementado con hipoclorito de sodio al 1% (Figura 13).



Figura 13. Electroforesis y RT-PCR. Para el análisis de la expresión génica se calculó la pureza del RNA y posteriormente se corrieron las muestras en un termociclador para finalmente ser resueltas en electroforesis de agarosa y visualizadas en un transiluminador.

Para el análisis de RT-PCR se realizó una síntesis de ácido desoxiribonucleico complementario (cDNA) utilizando el kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega; Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para descartar presencia de DNA genómico, la muestra fue tratada con DNAsa. Las reacciones de RT-PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador *MJ-Mini™ Personal*

Thermal (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Se utilizaron los oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento descritas en la Tabla 1. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, corriendo a 100 V durante 35 minutos, para después ser teñidos con bromuro de etidio 10 µg/ml (Bio Basic Inc; Markham, ON, CAN) y visualizados en un transiluminador *UV Gel Doc*TM Transilluminator (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Como control interno se utilizó el gen de la β-actina, y un control negativo que de todos los reactivos de PCR excepto el cDNA (Sambrook *et al.*, 2001).

Gen	Secuencia de Oligonucleotidos (5'- 3')	Tm ° C
β-Actina	Forward: GGCATCCTGACCCTGAAGTA	51
	Reverse: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA	
OCN	Forward: GAGCCCCAGTCCCCTACC	58
	Reverse: CCGATAGAGGTCCTGAAAG	
BSP	Forward: CAGCGGAGGAGACAATGGAG	58
	Reverse: TTCAACGGTGGTGGTTTTCC	
OPN	Forward: CAACGAAAGCCATGACCACA	54
	Reverse: CAGGTCCGTGGGAAAATCAG	
ALP	Forward: GGTGAACCGCAACTGGTACT	54
	Reverse: CCCACCTTGGCTGTAGTCAT	

Tabla 1. Condiciones y secuencias de oligonucleótidos. Análisis de la diferenciación osteogénica utilizando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

6.14 Análisis estadístico

Los niveles de alizarina roja se evaluaron con un análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos. Los valores de $p < 0.01$ fueron considerados estadísticamente significativos en todos los tratamientos. El análisis de datos se realizó con el software SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento y caracterización inmunofenotípica de las DPSCs

Las células adherentes sin clasificar mostraron diferentes tamaños y morfologías después de 3 semanas en condiciones de crecimiento celular, en contraste, las células magnéticamente separadas $CD105^+$ mostraron una morfología relativamente homogénea caracterizada por una forma de huso con núcleos ovals y centrales (Figura 14). Además, se observaron unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) hasta el pase 3 en cultivo celular (Figura 15).

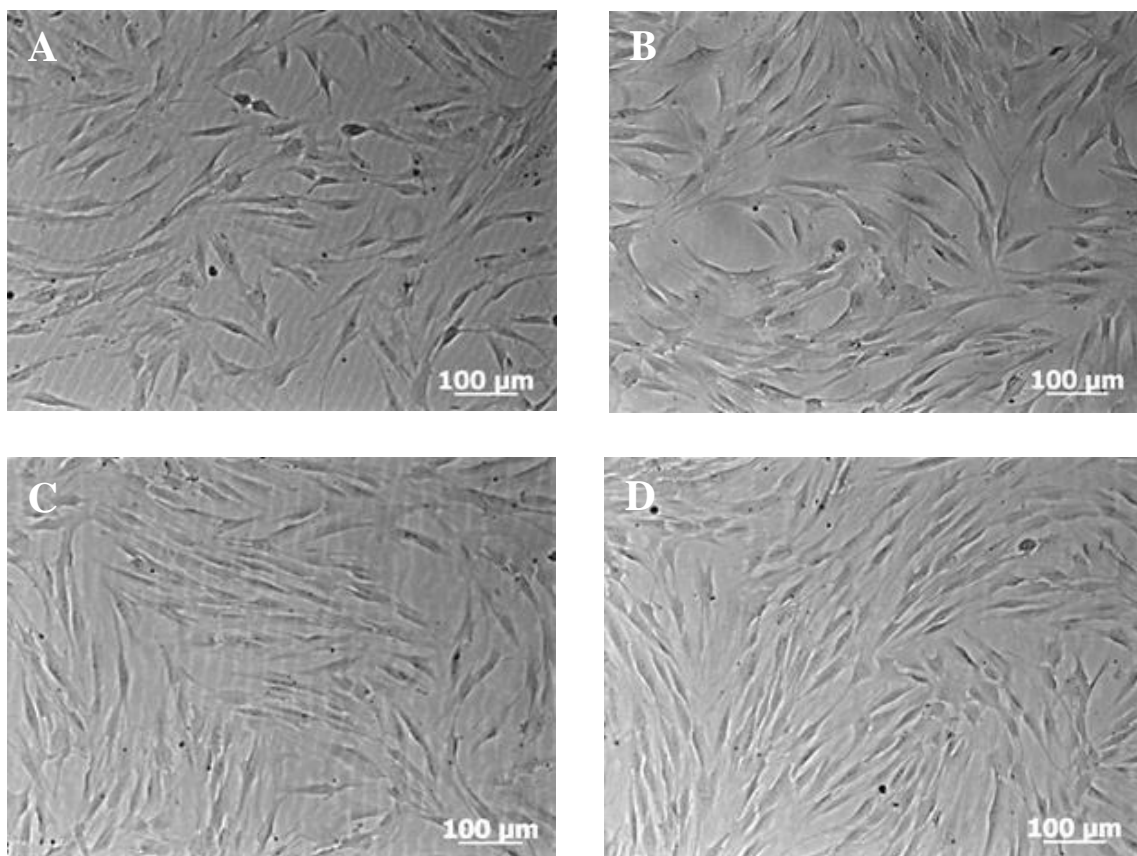


Figura 14. Células clasificadas por separación magnética. (A) Micrografía en contraste de fase de las DPSCs no clasificadas después de 14 días. (B) DPSCs $CD105^+$ pase 1 cultivadas en α -MEM sin inducción osteogénica. (C) DPSCs en pase 2. (D) DPSCs en pase 3. Se observa una morfología fibroblástica-alargada en las células clasificadas.



Figura 15. Tinción con azul de toluidina. Imagen y micrografía donde se observa la formación de múltiples CFU-F en fase 1, teñidas con el colorante azul de toluidina.

Las células clasificadas tuvieron expresión positiva o negativa evidenciada por un análisis de citometría de flujo para los siguientes marcadores de superficie: CD105-FITC 99.47%, CD73-PE 97.89%, CD90-FITC 85.03%, CD13-PE 86.76%, CD45-FITC 0%, CD34-PE 0.11%, HLA-DR-PerCp 0.02%, CD14-PE 0.38% y CD11b-PE 0.39 % (Figuras 16-25). Estos resultados confirman que el cultivo celular de las DPSCs clasificadas presentó el inmunofenotipo típico de MSCs: $CD105^+$ / $CD73^+$ / $CD90^+$ / $CD13^+$ / $CD45^-$ / $CD34^-$ / $HLA-DR^-$ / $CD14^-$ / $CD11b^-$

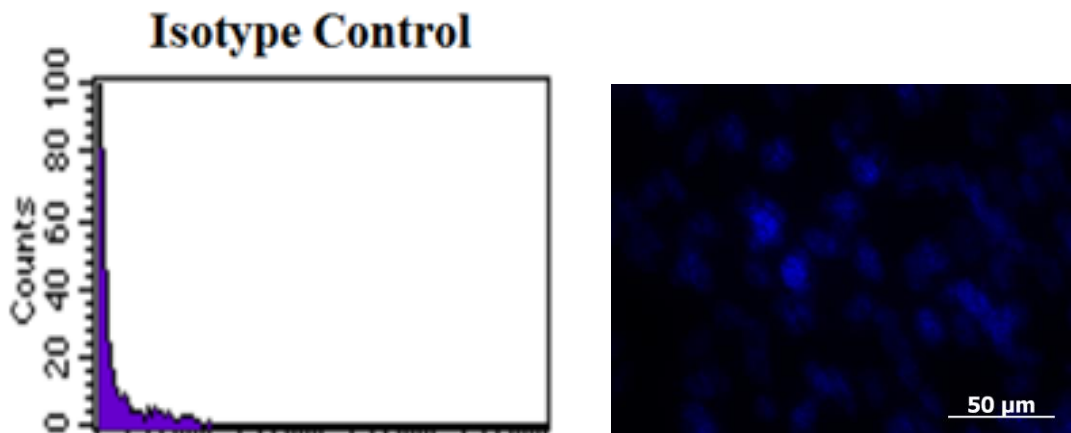


Figura 16. Análisis de citometría de flujo para el control de isotipo. Histograma y micrografía de microscopía de fluorescencia donde se observa la expresión negativa del control de isotipo.

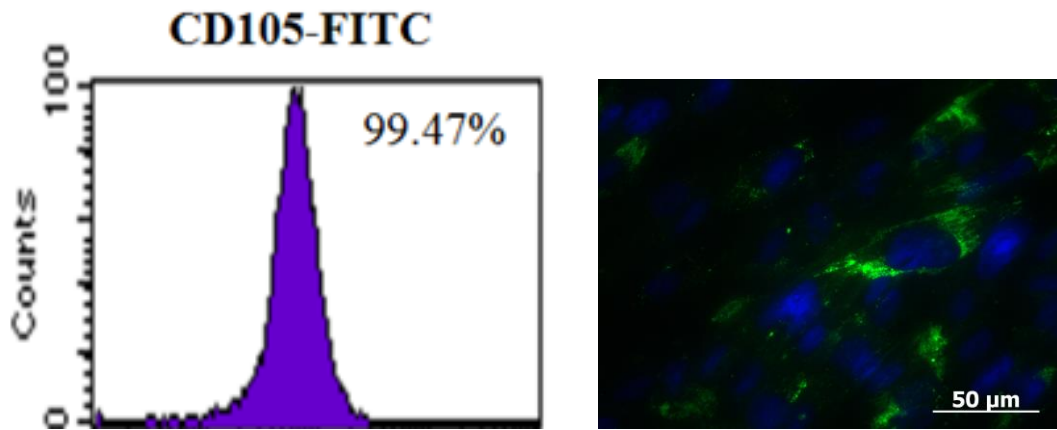


Figura 17. Análisis de citometría de flujo para CD105-FITC. Histograma y micrografía de microscopia de fluorescencia donde se observa la expresión positiva de CD105-FITC.

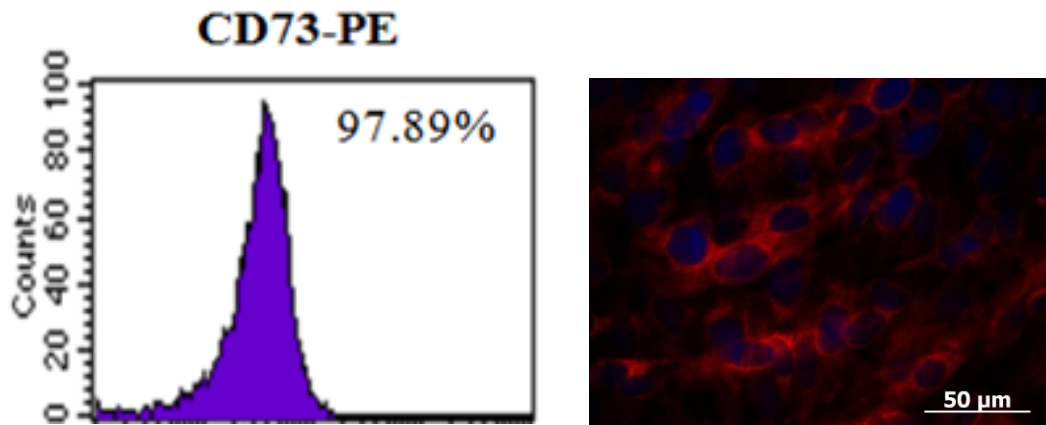


Figura 18. Análisis de citometría de flujo para CD73-PE. Histograma y micrografía de microscopia de fluorescencia donde se observa la expresión positiva de CD73-PE.

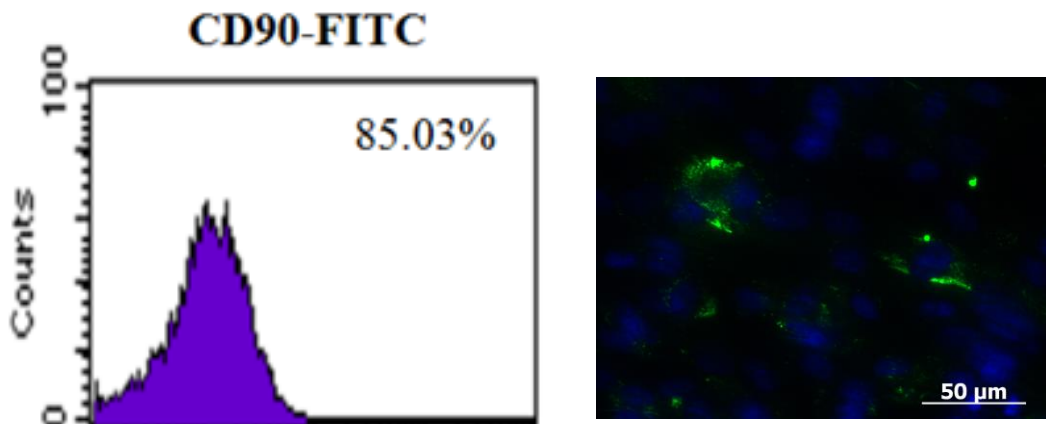


Figura 19. Análisis de citometría de flujo para CD90-FITC. Histograma y micrografía de microscopia de fluorescencia donde se observa la expresión positiva de CD90-FITC.

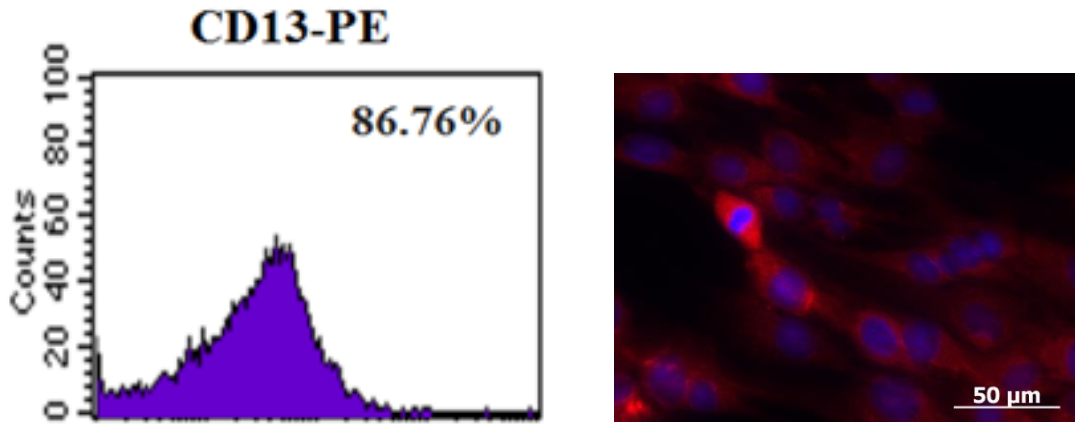


Figura 20. Análisis de citometría de flujo para CD13-PE. Histograma y micrografía de microscopia de fluorescencia donde se observa la expresión positiva de CD13-PE.

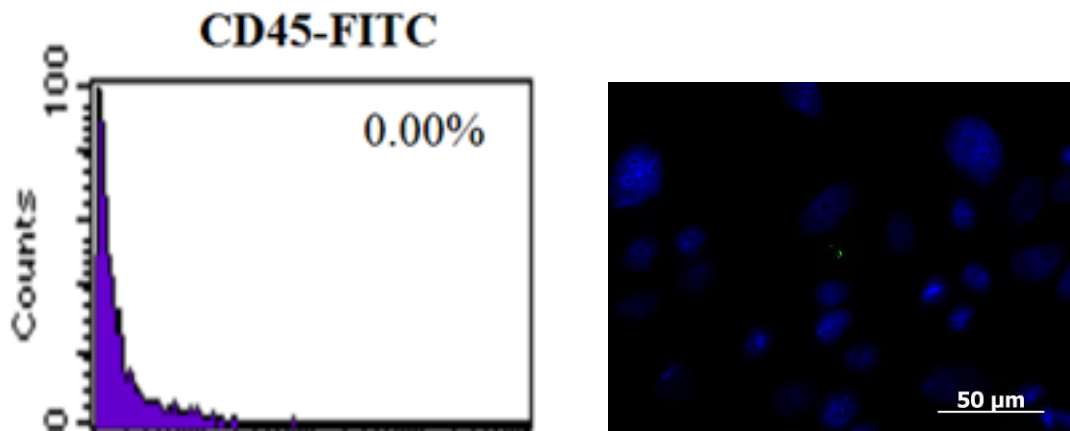


Figura 21. Análisis de citometría de flujo para CD45-FITC. Histograma y micrografía de microscopia de fluorescencia donde se observa la expresión negativa de CD45-FITC.

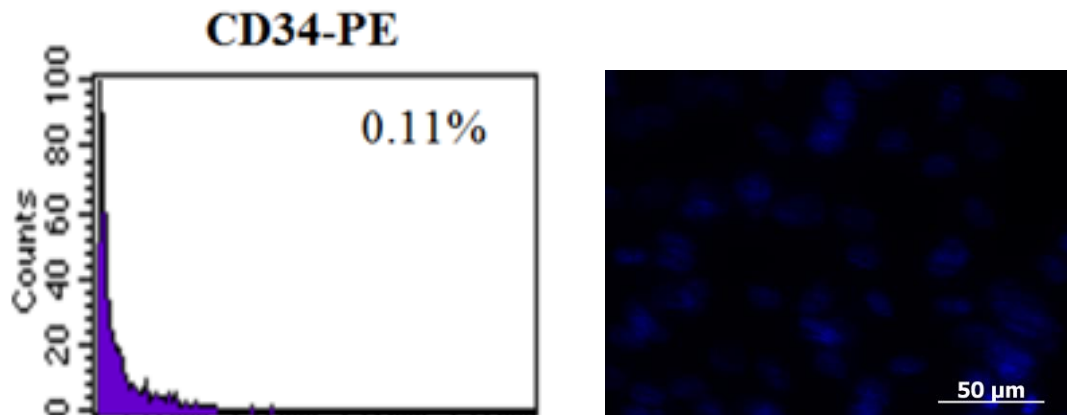


Figura 22. Análisis de citometría de flujo para CD34-PE. Histograma y micrografía de microscopia de fluorescencia donde se observa la expresión negativa de CD34-PE.

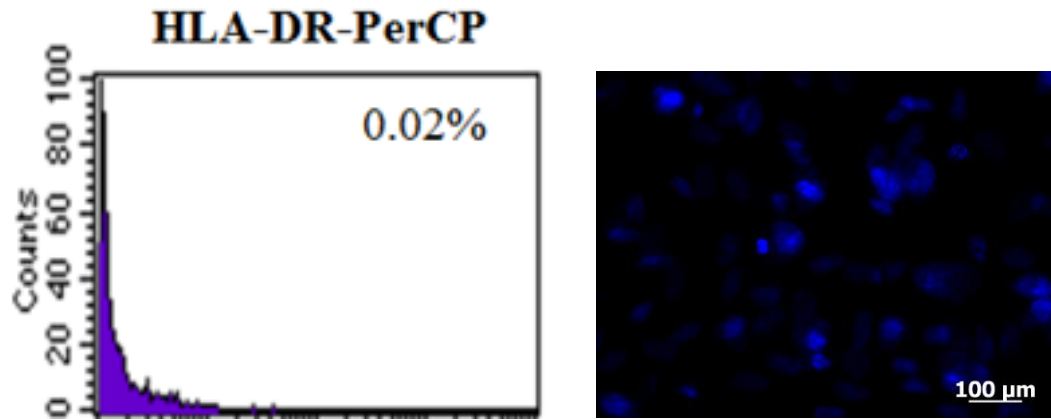


Figura 23. Análisis de citometría de flujo para HLA-DR-PerCP. Histograma y micrografía de microscopía de fluorescencia donde se observa la expresión negativa de HLA-DR-PerCP.

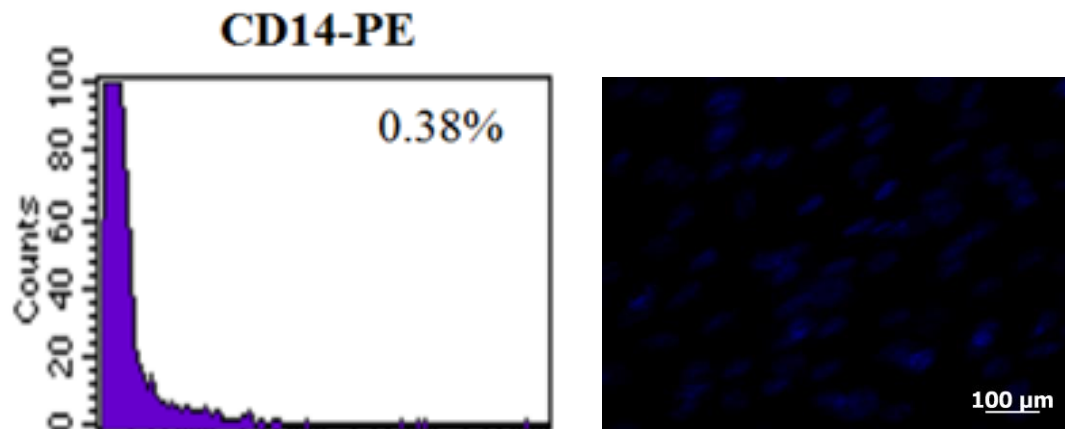


Figura 24. Análisis de citometría de flujo para CD14-PE. Histograma y micrografía de microscopía de fluorescencia donde se observa la expresión negativa de CD14-PE.

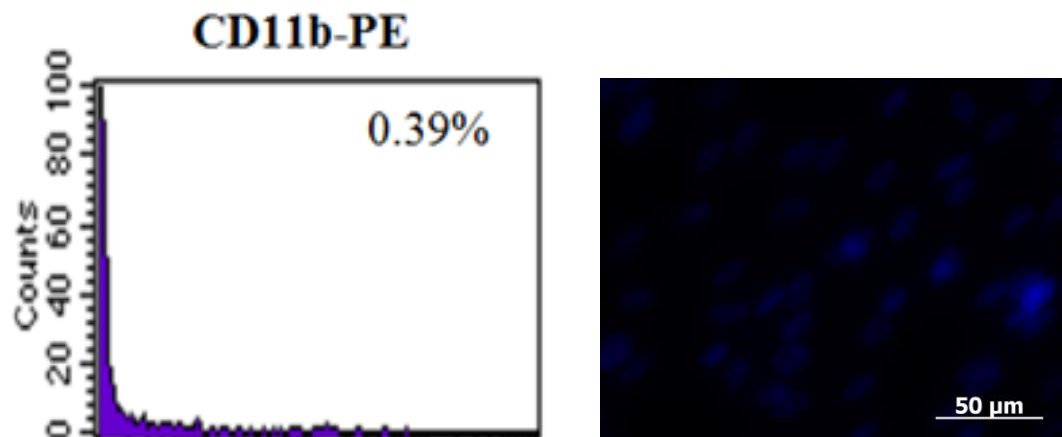


Figura 25. Análisis de citometría de flujo para CD11b-PE. Histograma y micrografía de microscopía de fluorescencia donde se observa la expresión negativa de CD11b-PE.

7.2 Cambios morfológicos durante la diferenciación osteogénica

Después de 7 días de incubación en α -MEM, las DPSCs CD105⁺ mostraron una morfología fibroblástica-alargada y tendieron a alinearse en líneas paralelas. Una morfología celular similar también se observó en las células tratadas con OM. Sin embargo, en el tratamiento con OM + EGF las DPSCs mostraron diferencias morfológicas claras, que se caracterizaron por la aparición de una forma poligonal con núcleos esféricos y periféricos así como un escaso citoplasma. Por otra parte, no se observaron estos cambios en el tratamiento con OM + bFGF (Figura 26).

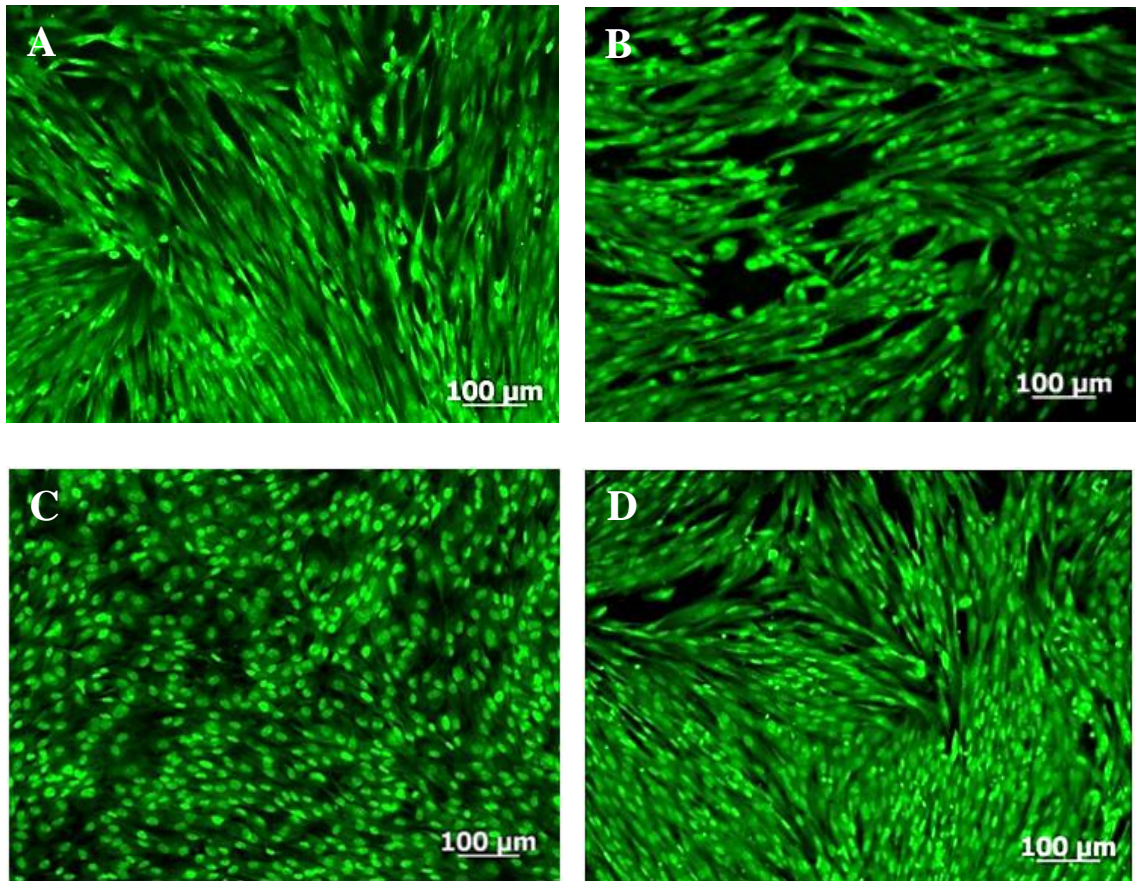


Figura 26. Cambios morfológicos en la diferenciación osteogénica. (A) Después de 7 días en α -MEM se puede observar que las DPSCs conservan la típica morfología de MSCs en forma de huso. (B) DPSCs en OM sin cambios significativos. (C) DPSCs en OM + EGF, donde existe un evidente cambio morfológico hacia fenotipo osteoblástico. (D) DPSCs en OM + bFGF manteniendo una morfología fibroblástica-alargada.

Además, la presencia de EGF fue capaz de inducir un patrón de organización diferente en cultivo celular en comparación con el grupo OM. La más alta confluencia celular se observó en las células incubadas con EGF o bFGF, en relación con los grupos control de α -MEM y OM (Figura 26).

7.3 Expresión de los marcadores de superficie CD146 y CD10

El análisis de inmunofluorescencia confirmó que las células cultivadas en α -MEM durante 7 días fueron altamente positivas para los marcadores de superficie CD146 y CD10. Aunque, el grupo OM fue capaz de disminuir la expresión de ambos marcadores, las células tratadas con EGF mostraron el efecto inhibitor más fuerte. En contraste, las células tratadas con bFGF mantuvieron los niveles de expresión en relación con las cultivadas en α -MEM (Figuras 27, 28).

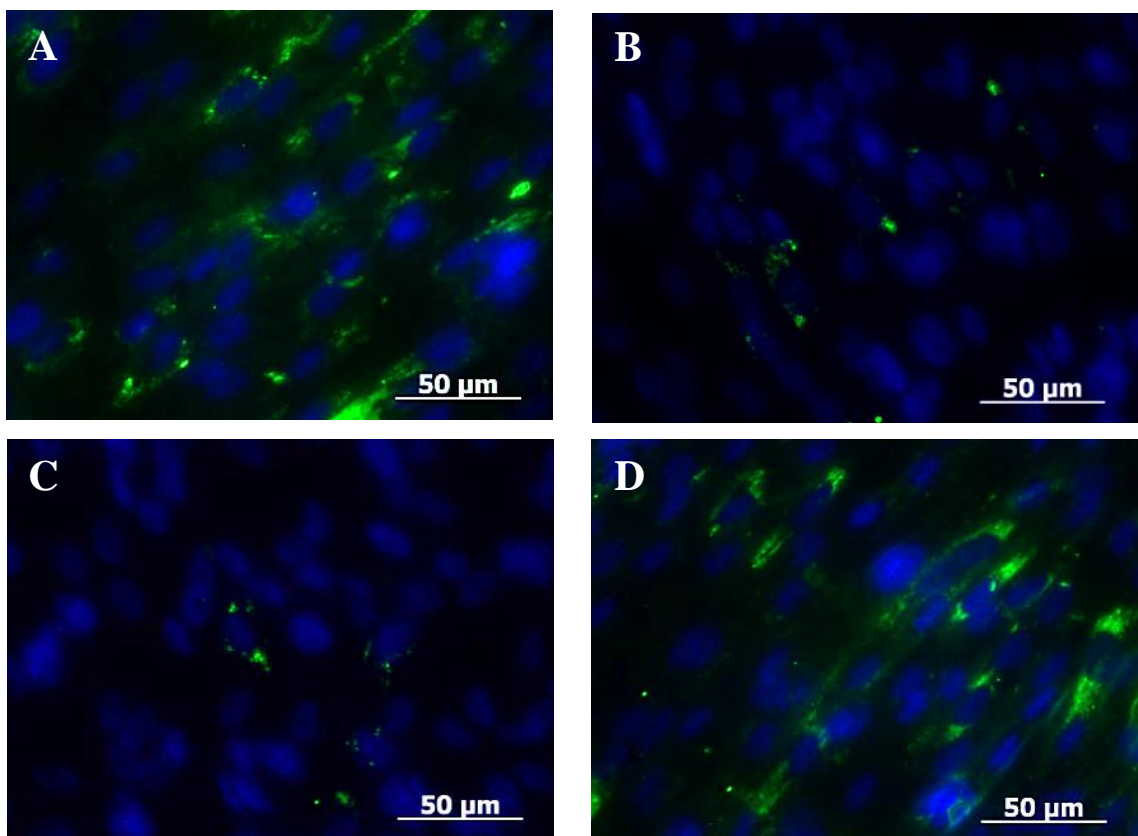


Figura 27. Expresión de CD146 por inmunocitoquímica. (A) Imagen de inmunofluorescencia muestra la expresión de CD146 en DPSCs después de 7 días en α -MEM. (B) Expresión de CD146 en DPSCs en OM. (C) Expresión de CD146 en DPSCs en OM + EGF. (D) Expresión de CD146 en DPSCs en OM + bFGF.

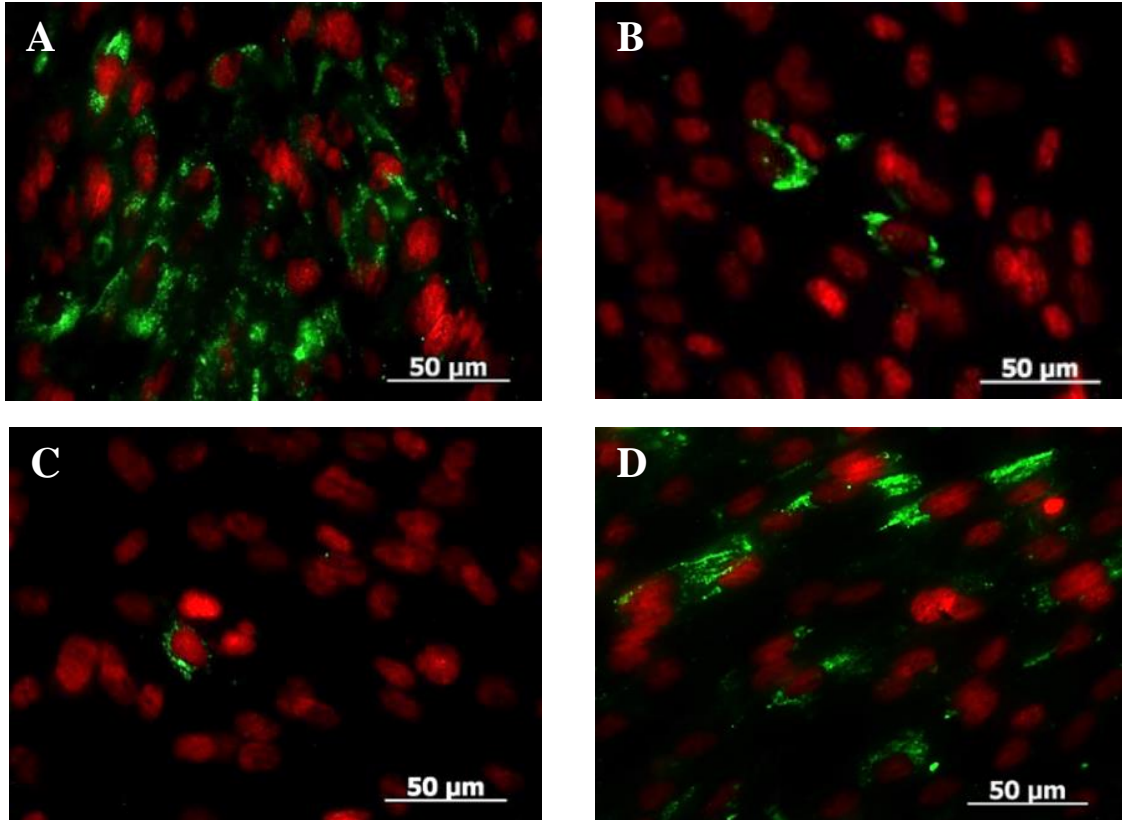


Figura 28. Expresión de CD10 por inmunocitoquímica. (A) Imagen de inmunofluorescencia muestra la expresión de CD10 en DPSCs después de 7 días en α -MEM. (B) Expresión de CD10 en DPSCs en OM. (C) Expresión de CD10 en DPSCs en OM + EGF. (D) Expresión de CD10 en DPSCs en OM + bFGF.

7.4 Deposición de calcio extracelular mediante el ensayo de alizarina roja

Después de 21 días de inducción osteogénica, se observó una confluencia celular completa en todos los tratamientos. El grupo α -MEM fue negativo a la tinción de alizarina roja (18.81 $\mu\text{g/ml}$); Sin embargo, en los tratamientos OM, OM + EGF y OM + bFGF, se observó deposición de calcio (Figura 29). El análisis microscópico confirmó la ausencia de nódulos mineralizados en el grupo α -MEM (Figuras 30, 34). Las DPSCs tratadas con OM mostraron altos niveles de alizarina roja (792.64 $\mu\text{g/ml}$) y nódulos de mineralización prominentes (Figuras 31, 34). De manera importante, OM suplementado con EGF indujo un claro aumento en abundancia y tamaño de los depósitos de calcio, además de un incremento significativo en los niveles de mineralización evaluado por el ensayo de alizarina roja (1686.31 $\mu\text{g/ml}$), en comparación con el grupo de OM (Figuras 32, 34). En contraste, la suplementación con bFGF mostró una diferencia estadística

significativa en los niveles de alizarina roja (174.87 $\mu\text{g/ml}$) con respecto a OM y OM + EGF, pero el número de nódulos mineralizados fue menor en comparación con OM, lo que sugiere un efecto inhibitor (Figuras 33, 34).

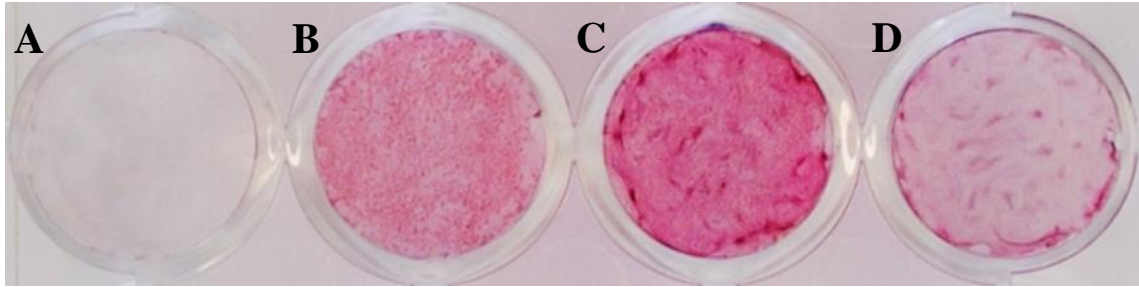


Figura 29. Mineralización osteogénica. (A) Pozo donde se observa el calcio extracelular después de 21 días en α -MEM. (B) Calcio extracelular en OM. (C) Calcio extracelular en OM + EGF. (D) Calcio extracelular en OM + bFGF.

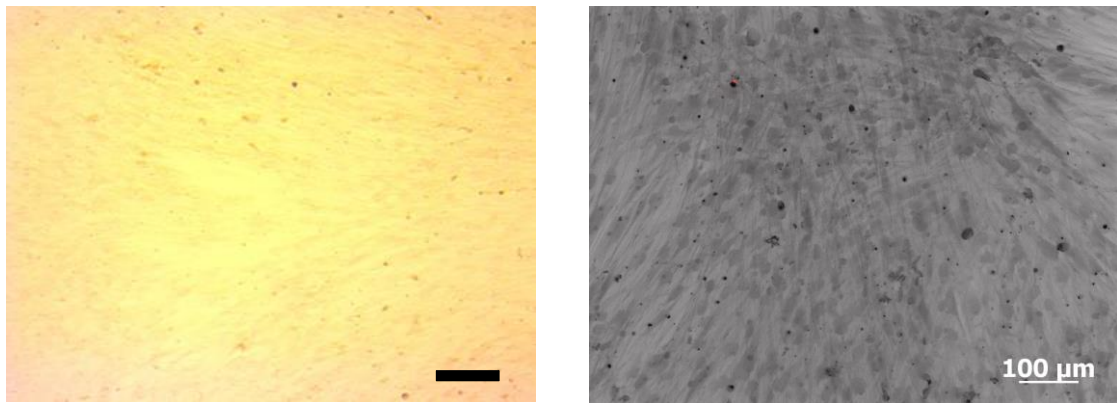


Figura 30. Mineralización osteogénica en α -MEM. Micrografías donde se observa el calcio extracelular formado después de 21 días en α -MEM. Magnificación 10x, escala = 100 μm .

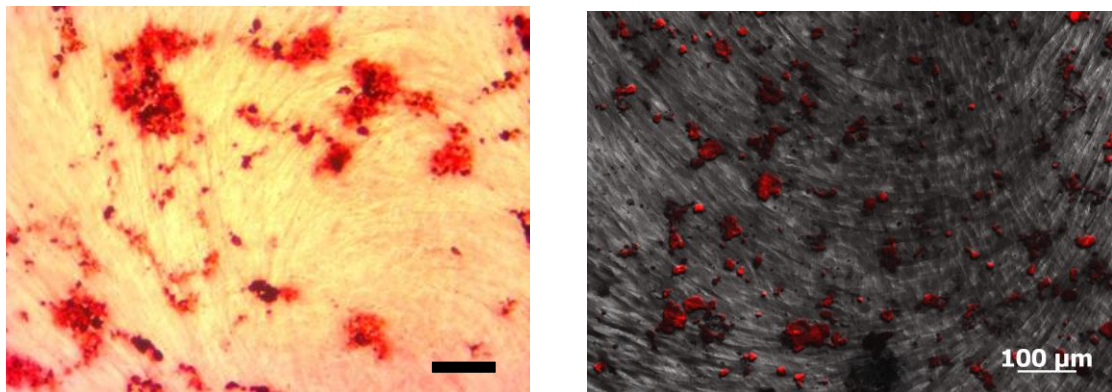


Figura 31. Mineralización osteogénica en OM. Micrografías donde se observa el calcio extracelular formado después de 21 días en OM. Magnificación 10x, escala = 100 μm .

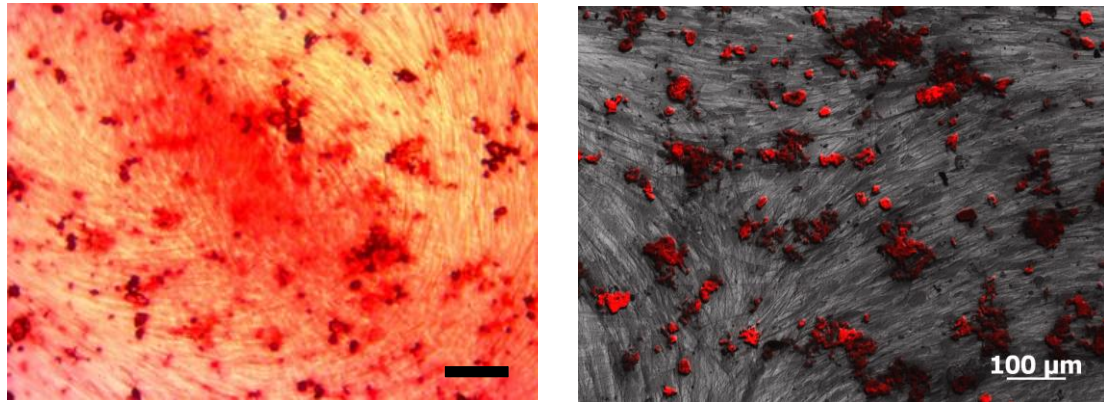


Figura 32. Mineralización osteogénica en OM + EGF. Micrografías donde se observa el calcio extracelular formado después de 21 días en OM + EGF. Magnificación 10x, escala = 100 µm.

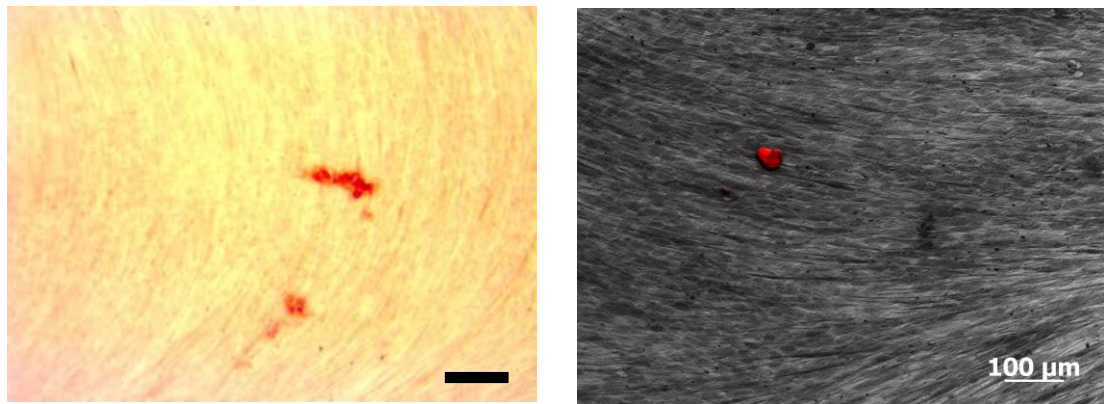


Figura 33. Mineralización osteogénica en OM + bFGF. Micrografías donde se observa el calcio extracelular formado después de 21 días en OM + bFGF. Magnificación 10x, escala = 100 µm.

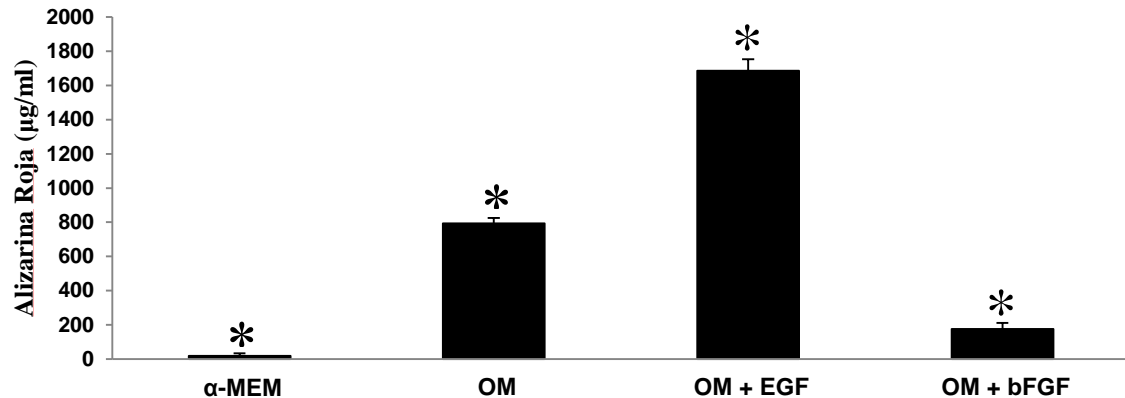


Figura 34. Cuantificación de calcio extracelular. El contenido total de calcio incrementó significativamente con el tratamiento OM + EGF en comparación con todos los grupos ($p < 0.001$). Las barras de error indican la media \pm SD ($n = 3$) y el asterisco indica significancia estadística ($p < 0.001$).

Grupos		1	2	3	4
		α -MEM	OM	OM + EGF	OM + bFGF
Alizarina Roja (μg/ml)		4.16	763.26	1611.68	148.10
		21.79	786.22	1740.62	160.09
		30.46	828.45	1706.64	216.42
	Promedio	18.81	792.64	1686.31	174.87
	Desv. Est.	13.40	33.07	66.84	36.48

Tabla 2. Resultados cuantitativos de alizarina roja (μ g/ml).

Lecturas de Absorbancia (Abs = 495nm)					
	Blanco	α -MEM	OM	OM + EGF	OM + bFGF
	0.092	0.086	0.326	0.563	0.145
	0.084	0.096	0.333	0.593	0.149
	0.086	0.1	0.346	0.585	0.167
Promedio	0.087	0.094	0.335	0.580	0.154
Desv. Est.	0.004	0.007	0.010	0.016	0.012

Tabla 3. Lecturas de absorbancia con el blanco.

Lecturas de Absorbancia (Abs = 495nm)				
	α -MEM	OM	OM + EGF	OM + bFGF
	0.000	0.239	0.476	0.058
	0.009	0.246	0.506	0.062
	0.013	0.259	0.498	0.080
Promedio	0.007	0.248	0.493	0.066
Desv. Est.	0.006	0.010	0.016	0.012

Tabla 4. Lecturas de absorbancia sin el blanco.

Curva de calibración

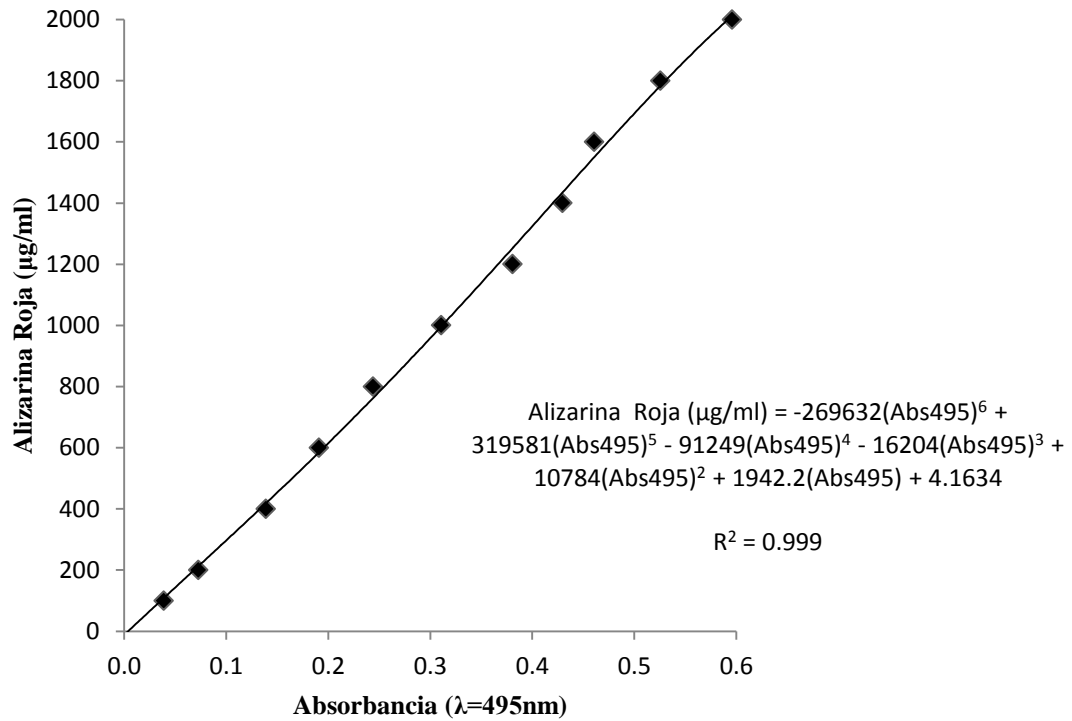


Figura 35. Curva de calibración. Gráfico donde se observa el cálculo para determinar la cantidad de alizarina roja ($\mu\text{g/ml}$) por absorbancia a 495 nm.

Alizarina Roja		
Abs ₄₉₅	Abs ₄₉₅	$\mu\text{g/ml}$
0.087	0.000	0
0.126	0.039	100
0.16	0.073	200
0.226	0.139	400
0.278	0.191	600
0.331	0.244	800
0.398	0.311	1000
0.468	0.381	1200
0.517	0.430	1400
0.548	0.461	1600
0.613	0.526	1800
0.683	0.596	2000

Tabla 5. Lecturas de absorbancia en $\mu\text{g/ml}$ de alizarina roja.

n = 3
k = 4

ANOVA de un factor					
Alizarina Roja (µg/ml)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	5151383.458	3	1717127.819	971.402	<0.001
Error	14141.445	8	1767.681		
Total	5165524.903	11			

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Estadístico: $q_{\alpha(2),gl,e,k}$

Decisión:	Rechazar H_0 si $q \geq q'$ o Rechazar H_0 si valor $p \leq \alpha$
Conclusión:	La concentración de Alizarina Roja es diferente en todos los grupos experimentales.

PRUEBA DE HIPÓTESIS:

H_0 : La concentración de Alizarina Roja es igual en todos los grupos experimentales. $\bar{\mu}_1 = \bar{\mu}_2 = \bar{\mu}_3 = \bar{\mu}_4$

H_a : La concentración de Alizarina Roja es diferente en todos los grupos experimentales.

Tabla 6. Prueba de ANOVA de un factor.

Grupos	1	4	2	3
Promedio \bar{x}_i	18.81	174.87	792.64	1686.31

Prueba de Tukey							
Hipótesis nula (H_0)	Comparación (B vs A)	Diferencia ($\bar{x}_B - \bar{x}_A$)	SE	q	Valor p	$q_{0,05(2),8,4}$	Conclusión
$\bar{\mu}_B = \bar{\mu}_A$	3 vs 1	1667.51	21.02	79.32	<0.001	4.529	Se rechaza H_0
	3 vs 4	1511.44		71.90	<0.001		Se rechaza H_0
	3 vs 2	893.67		42.51	<0.001		Se rechaza H_0
	2 vs 1	773.84		36.81	<0.001		Se rechaza H_0
	2 vs 4	617.77		29.39	<0.001		Se rechaza H_0
	4 vs 1	156.07		7.42	0.008		Se rechaza H_0

Tabla 7. Prueba estadística de Tukey.

Se encontró diferencia altamente significativa entre las medias de la concentración de alizarina roja ($F_{3,8} = 971.402, p < 0.01$) y mediante la prueba de Tukey se observó que los 4 grupos difieren en sus medias significativamente (G1: 18.81, G4: 174.87, G2: 792.64 y G3: 1686.31).

7.5 Expresión génica por RT-PCR

Después de 21 días de cultivo celular, la expresión génica de OCN fue negativa en el grupo α -MEM. Además, en el grupo OM la expresión fue positiva para este marcador fenotípico de osteoblastos; sin embargo, el nivel de expresión fue superior debido a la presencia de EGF en el medio de cultivo, lo que sugiere la importancia de este factor de

crecimiento durante la osteogénesis. Contrario a este efecto, la adición de bFGF resultó en una disminución en la expresión para BSP, OCN y OPN con respecto a las células tratadas con OM (Figura 36).

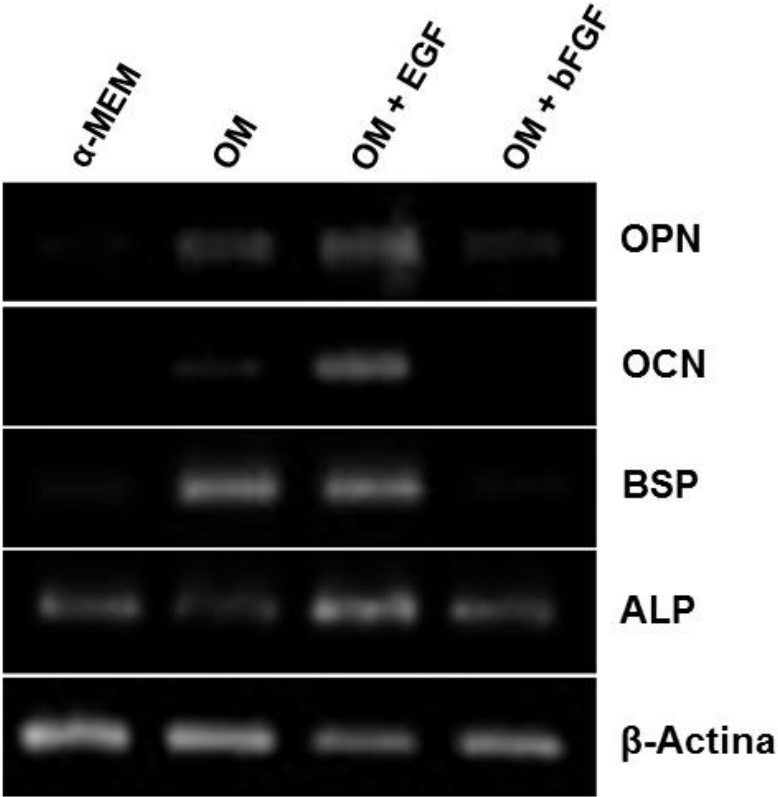


Figura 36. Análisis de la expresión génica. Comparación de la expresión génica para las principales proteínas de mineralización observadas en la diferenciación osteogénica mediante RT-PCR.

8. DISCUSIÓN

Los factores de crecimiento son reconocidos por su participación activa en muchos procesos biológicos tales como la migración, proliferación y diferenciación celular (Rodrigues *et al.*, 2010; Discher *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista osteogénico, se sabe que algunos de estos factores juegan un papel esencial en la regeneración ósea, ya que son responsables de activar vías de señalización celular específicas que permiten la expresión de las BMPs, que son moléculas que participan de manera fundamental en la mineralización de la matriz extracelular y la reparación ósea ante las lesiones (Suzuki *et al.*, 2006; Luppen *et al.*, 2003; Rawadi *et al.*, 2003).

Nuestros resultados proporcionan evidencia de que la suplementación con EGF aumenta la mineralización osteogénica en las DPSCs durante la diferenciación celular, lo que sugiere su papel importante para favorecer este destino celular.

La suplementación con EGF y bFGF es utilizada comúnmente para asegurar la supervivencia y proliferación de las MSCs cultivadas en condiciones libres de FBS (Bonnamain *et al.*, 2013; Tamama *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2010); Sin embargo, estudios recientes sugieren que el EGF añadido al medio osteogénico tradicional no sólo promueve la proliferación celular sino que también aumenta la mineralización durante la diferenciación osteogénica de las MSCs derivadas de médula ósea (Kratchmarova *et al.*, 2005; Platt *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008).

Hemos encontrado que las DPSCs son una excelente alternativa para terapia celular en lugar de las extraídas de médula ósea; sin embargo, un reto a superar es la pequeña cantidad de pulpa dental obtenida; es por esta razón que en nuestro estudio las células se obtuvieron de premolares humanos extraídos con fines de ortodoncia. El tejido pulpar comúnmente presenta una gran carga bacteriana, por lo cual, para garantizar un exitoso cultivo primario de las DPSCs, es necesario indicar previamente al donador un protocolo de desinfección basado en colutorios antisépticos.

Por otra parte, se sabe que algunos factores de crecimiento tales como el IGF-1, TGF- β y TNF- α mejoran la diferenciación osteogénica de las DPSCs (Huang *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2013). Además, en un estudio reciente se demostró que 12 a 24 horas de tratamiento con EGF incrementa la expresión de IL-8 y BMP-2 en células humanas del ligamento periodontal (HPDLCs) (Teramatsu *et al.*, 2014). Las BMPs desempeñan un papel crítico en el proceso de mineralización (Devescovi *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2004), esto sugiere que el sobrenadante de cultivo celular en células tratadas con EGF podría promover la diferenciación osteogénica de una manera más eficiente.

Basado en nuestros hallazgos, EGF puede ser utilizado solo o en combinación con alguno de estos factores para lograr un efecto sinérgico. Es de destacar que estudios previos con EGF no muestran resultados similares, pero a veces las observaciones pueden ser antagónicas. En este sentido, algunos estudios reportan un efecto inhibitorio causado por EGF sobre la diferenciación osteogénica de las MSCs, aunque no derivadas de pulpa dental (Krampera *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2013).

Una posible explicación de estos resultados podría ser la variación del origen celular de las MSCs utilizadas en cada estudio. Esto refuerza la importancia de la caracterización de las MSCs derivadas de pulpa dental. Otra posible razón de esta discrepancia es la utilización de células obtenidas de tejido o inmortalizadas, así como su heterogeneidad. Para reducir esta variabilidad, nuestros experimentos se realizaron utilizando DPSCs CD105⁺, favoreciendo de este modo el fenotipo de las células primarias, lo que podría estar más cercano a una situación *in vivo* que los experimentos hechos con células inmortalizadas.

Por otra parte, también se observó que bFGF no es capaz de ejercer efectos similares a EGF y fue un factor inhibitorio significativo de la mineralización y diferenciación hacia células similares a osteoblastos. Esto confirma que no todos los factores de crecimiento relacionados con la proliferación y expansión de las DPSCs son capaces de mejorar la mineralización osteogénica. Del mismo modo, estos efectos fueron también observados por Li *et al.* (Qian *et al.*, 2014; Osathanon *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012), aunque en células SHED, sin embargo, ellos evaluaron una concentración más alta de

bFGF (100 ng/ml), que es 10 veces más concentrada que la utilizada en nuestros experimentos.

La morfología celular se ha utilizado como un indicador importante para caracterizar y evaluar la calidad de las células (Matsuoka *et al.*, 2013; Leischner *et al.*, 2010); en nuestro estudio se observó que los cambios morfológicos pueden ser también utilizados para dar seguimiento a la transición de DPSCs a osteoblastos en etapas tempranas (1 semana). Encontramos una morfología típica de osteoblastos en etapas avanzadas de la diferenciación celular (3 semanas) asociado con altos niveles de calcio extracelular.

Por otra parte, durante la diferenciación odontogénica, se sabe que hay una regulación génica odontoblasto-específica, esto incluye a la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) y la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP-1) (Nam *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014). En nuestro estudio debido al origen dental de las células, también es posible una diferenciación odontogénica; estos resultados sugieren que la morfología celular en etapas iniciales de la diferenciación puede ser un dato complementario importante para evaluar el linaje de las células; sin embargo, en un cultivo de células confluentes es técnicamente complicado medir estos cambios morfológicos.

Es de destacar que después de 1 semana en condiciones osteogénicas, las DPSCs cambiaron su distribución celular de colonias; además, se observó una mayor adherencia de las células.

Como consenso general, se incluyen algunos marcadores de superficie dentro de los criterios mínimos para la definición de las MSCs (Dominici *et al.*, 2006); Sin embargo, otros marcadores de superficie se han asociado con las MSCs, tales como CD146 y CD10, ambos expresados en las DPSCs (Gronthos *et al.*, 2001; Vishwanath *et al.*, 2013), aunque su implicación biológica al linaje de MSCs sigue siendo poco conocida.

Por otra parte, el tratamiento *in vitro* con EGF fue suficiente para reducir la expresión de ambos marcadores de superficie, lo que confirma un papel osteogénico de EGF en las DPSCs.

La diferenciación celular desencadena cambios en el inmunofenotipo de las DPSCs, una prueba que puede ser utilizada para controlar la diferenciación celular. Hemos encontrado que hay una fuerte relación entre los niveles de expresión de CD146 y CD10 en la diferenciación osteogénica de las DPSCs debido a que estos marcadores están relacionados con la troncalidad de éstas células. Después de 7 días con EGF, se observó una supresión importante en estos marcadores de superficie, pero está claro que este criterio no es suficiente para considerarlo como una diferenciación osteogénica; sin embargo, puede ser útil para dar seguimiento al proceso de transición de DPSCs hacia osteoblastos, aunque, sería necesario ampliar este tipo de ensayos para caracterizar el comportamiento de otros marcadores de superficie asociados con la troncalidad de las MSCs.

Adicionalmente, la diferenciación osteogénica *in vitro* de las MSCs es comúnmente evidenciada por la actividad temprana de ALP, mineralización de la matriz extracelular y expresión de marcadores típicos de osteoblastos (Mori *et al.*, 2011; Stucki *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2015). De acuerdo con nuestros experimentos, se observó un aumento en la expresión del mRNA para la ALP en las células cultivadas con EGF. Además, es bien sabido que la OCN es un importante marcador osteogénico que regula la formación de nódulos de mineralización, y por lo tanto, conduce a la osteogénesis (Shi *et al.*, 2009).

En este contexto, la sobre-regulación en la expresión de OCN como resultado del tratamiento con EGF fortalece este estudio, lo que sugiere su efecto osteogénico. OPN, otro importante marcador de etapas tardías en la diferenciación de osteoblástica (McKee *et al.*, 2005), también se sobre-expresa en células cultivadas con EGF, lo que confirma su papel osteogénico. Sin embargo, para dilucidar el mecanismo por el cual esto ocurre, así como su eficacia en modelos animales, son requeridos estudios adicionales.

9. CONCLUSIONES

- Se aisló una sub-población de DPSCs CD105⁺, la cual es positiva a los criterios establecidos para determinar el linaje de MSCs y su estado de troncalidad.
- El EGF actúa como potenciador durante la diferenciación osteogénica *in vitro* de las DPSCs CD105⁺ debido a que incrementa la mineralización de la matriz extracelular.
- Una baja concentración de EGF (10 ng/ml) es suficiente para inducir cambios morfológicos y fenotípicos característicos de células osteoblásticas.
- El bFGF actúa como inhibidor durante la diferenciación osteogénica *in vitro* de las DPSCs CD105⁺ debido a que disminuye la mineralización de la matriz extracelular.
- Una baja concentración de bFGF (10 ng/ml) no es suficiente para inducir cambios morfológicos y fenotípicos característicos de células osteoblásticas.
- La suplementación con EGF durante la diferenciación osteogénica *in vitro* de las DPSCs CD105⁺ incrementa la expresión de mRNA para ALP y OCN regulando la formación de nódulos de mineralización, esto confirma su papel durante la osteogénesis.
- Las DPSCs CD105⁺ en combinación con EGF son una alternativa para terapia celular y regeneración de tejido óseo en periodoncia e implantología oral.

10. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusión presentados en esta tesis doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan principalmente a probar el potencial osteogénico *in vitro* de las DPSCs dentro de andamios tridimensionales cargados con EGF para su posterior aplicación *in vivo*.

Primeramente, sería de gran utilidad explorar diferentes biomateriales utilizados actualmente en ingeniería tisular que puedan garantizar la proliferación y diferenciación osteogénica de las DPSCs. Para lograr lo anterior, sería necesario estandarizar las condiciones de cultivo tridimensional necesarias para promover una alta tasa de supervivencia celular durante largos periodos de tiempo.

En una segunda fase experimental, sería interesante estudiar el efecto *in vivo* de los andamios tridimensionales seleccionados. En concreto se podría estudiar la diferenciación osteogénica utilizando andamios tridimensionales con EGF sobre un modelo animal que sea capaz de mimetizar un microambiente similar al encontrado en lechos quirúrgicos de pacientes con enfermedades tales como diabetes y enfermedad periodontal las cuales alteran el metabolismo óseo.

De esta manera se podría generar una estrategia basada en terapia celular utilizando DPSCs para regeneración de tejido mineralizado con aplicación en periodoncia e implantología oral.

11. LITERATURA CITADA

1. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001;414: 118-121.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284: 143-147.
3. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97: 13625-13630.
4. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81: 531-5.
5. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 5807-12.
6. Riccio M, Resca E, Maraldi T, Pisciotta A, Ferrari A, Bruzzesi G, De Pol A. Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. *Eur J Histochem*. 2010;54:e46.
7. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:117.
8. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, Shi J, Jin Y. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biology*. 2010;11:32.
9. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol*. 2009; 57:318-323.
10. Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteroprogenitors] to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng*. 2007;13:2311-2320.

11. Rodrigues M, Griffith L, Wells A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1: 32.
12. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990;265: 7709-12.
13. Mroczkowski B, Reich M, Chen K, Bell GI, Cohen S. Recombinant human epidermal growth factor precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity. *Mol Cell Biol.* 1989; 9:2771–8.
14. Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24: 686-95.
15. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288: 413-9.
16. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T. FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359: 108-14.
17. Qian J, Jiayuan W, Wenkai J, Peina W, Ansheng Z, Shukai S, Shafei Z, Jun L, Longxing N. Basic fibroblastic growth factor affects the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in a treatment-dependent manner. *Int Endod J.* 2014 Aug 12.
18. Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLC γ signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2011;112:1807-16.
19. Li B, Qu C, Chen C, Liu Y, Akiyama K, Yang R, Chen F, Zhao Y, Shi S. Basic fibroblast growth factor inhibits osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through ERK signaling. *Oral Dis.* 2012;18: 285-92.
20. Osathanon T, Nowwarote N, Manokawinchoke J, Pavasant P. bFGF and JAGGED1 regulate alkaline phosphatase expression and mineralization in dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2013;114:2551-61.
21. Fan VH, Tamama K, Au A, Littrell R, Richardson LB, Wright JW, Wells A, Griffith LG. Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2007;25: 1241–51.

22. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res.* 2003;284: 2–13.
23. Schmidt MH, Furnari FB, Cavenee WK, Bogler O. Epidermal growth factor receptor signaling intensity determines intracellular protein interactions, ubiquitination, and internalization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100: 6505–10.
24. Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science.* 2005;308: 1472-7.
25. Platt MO, Roman AJ, Wells A, Lauffenburger DA, Griffith LG. Sustained epidermal growth factor receptor levels and activation by tethered ligand binding enhances osteogenic differentiation of multi-potent marrow stromal cells. *J Cell Physiol.* 2009;221: 306-17.
26. Danchakoff V. Origin of the blood cells: development of the haematopoietic organs and regeneration of the blood cells from the standpoint of the monophyletic school. *Anat Rec.* 1916;10: 397-413.
27. Poulson R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002; 197:441-56.
28. Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol* 2002; 197:519-26.
29. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963;197: 452-4.
30. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature.* 2006;444 (7118):481–485.
31. Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharensko V, Verlinsky Y. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(6):623–629.
32. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. *Nat Protoc.* 2007;2(8):1963–1972.
33. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A, Lanza R. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell.* 2008;2(2):113–117.

34. K. Takahashi, S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663–676.
35. Mou X, Wu Y, Cao H, Meng Q, Wang Q, Sun C, Hu S, Ma Y, Zhang H. Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with different karyotypes of Down syndrome. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3:14.
36. Liang G, Taranova O, Xia K, Zhang Y. Butyrate promotes induced pluripotent stem cell generation. *J Biol Chem*. 2010;285: 25516–25521.
37. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell G, Cook E, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinsons disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009;136: 964-77.
38. Lympieri S, Ligoudistianou C, Taraslia V, Kontakiotis E, Anastasiadou E. Dental Stem Cells and their Applications in Dental Tissue Engineering. *Open Dent J*. 2013;7: 76–81.
39. Machado Cde V, Telles PD, Nascimento IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35:62-7.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8: 315-7.
41. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
42. Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:392–401.
43. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
44. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):32-45.

45. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279: 1528–1530.
46. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH.. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-4.
47. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH, Benhaim P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res*. 2003;21(4):622-9.
48. Meruane M, Rojas M. Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo. *Int J Morphol*. 2010;28(3): 879-889.
49. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, Palotás A, Kose GT. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J*. 2010;10(2):105-13.
50. Munevar J, Gutierrez N, Jimenez N, Lafaurie G. Evaluation of two human pulp stem cell cryopreservation methods. *Acta Odontol Latinoam*. 2015;28(2):114-21.
51. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental pulp stem cells. *Methods Enzymol*. 2006;419: 99–113.
52. Asutay F, Polat S, Gül M, Subaşı C, Kahraman SA, Karaöz E. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat cavarial defect model: Micro-computed tomography and Histomorphometric analysis. *Arch Oral Biol*. 2015;60(12):1729-1735.
53. Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem Cells Int*. 2015;2015:972313.
54. Roozegar M, Mohammadi T, Havasian M, Panahi J, Hashemian A, Amrei M, Hoshmand B. In vitro osteogenic impulse effect of dexamethasone on periodontal ligament stem cells. *Bioinformation*. 2015;11(2):96-100.
55. Zheng W, Wang S, Wang J, Jin F. Periodontitis promotes the proliferation and suppresses the differentiation potential of human periodontal ligament stem cells. *Int J Mol Med*. 2015;36(4):915-22.

56. Yin L, Cheng W, Qin Z, Yu H, Yu Z, Zhong M, Sun K, Zhang W. Effects of naringin on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells Int.* 2015;2015: 758706.
57. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical Papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.
58. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Guertsen W. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol.* 2011;56(7):709-21.
59. Nikita B, Fabricio B, Caio CR, Anibal D. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod.* 2012;38(10): 1372-1375.
60. Huang G, Wataru S, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6): 645-651.
61. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(4):323-34.
62. Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2008; 87(5):414-34.
63. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008; 87(8):767-71.
64. Morszeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005; 24(2):155-65.
65. Rodriguez-Lozano F J, Bueno C, Insausti C L, Meseguer L, Ramirez M C, Blanquer M, Marin N, Martinez S, Moraleda J M. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J.* 2011; 44(9):800-6.
66. Yagyu T, Ikeda E, Ohgushi H, Tadokoro M, Hirose M, Maeda M, Inagake K, Kirita T. Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(1):68-76.

67. Honda MJ, Imaizumi M, Suzuki H, Ohshima S, Tsuchiya S, Satomura K. Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111(6):700-8.
68. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(3):191-9.
69. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res.* 2010;89(8):791-6.
70. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, Totey S, Bhonde RR, Abu Kasim NH. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod.* 2010;36(9):1504-15.
71. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455-98.
72. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):77-90.
73. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):444-51.
74. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 2013;34(5):658-90.
75. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(5):230-6.
76. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells.* 2013;5(4):136-48.
77. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89(5):747-54.
101. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep.* 2003;5(3):222-6.

78. Boivin G, Meunier PJ. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcif Tissue Int.* 2002;70(6):503-11.
79. Aszódi A, Bateman JF, Gustafsson E, Boot-Handford R, Fässler R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice??. *Cell Struct Funct.* 2000;25(2):73-84.
80. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 2006;17(3):319-36.
81. Owen M, Shetlar MR. Uptake of ³H-glucosamine by osteoclasts. *Nature.* 1968;220(5174):1335-6.
82. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell.* 1991;64: 271–280.
83. Ramirez F, Rifkin DB. Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol.* 2003;22: 101–107.
84. Cohen GB, Ren R., Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell.* 1995;80: 237–248.
85. Yarden Y, Sliwkowski M. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127–37.
86. Heck DE, Laskin DL, Gardner CR, Laskin JD. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *J Biol Chem.* 1992;267(30):21277-80.
87. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol.* 2000;28(6):707-15.
88. Canalis E, Centrella M, McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest.* 1988;81(5): 1572–1577.
89. Iwasaki M, Nakahara H, Nakata K, Nakase T, Kimura T, Ono K. Regulation of proliferation and osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells by transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(4):543-54.

90. Pfeilschifter J, Ziegler R. Differential Effects of platelet-derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform-specific receptor functions. *Endocrinology*. 1992;130:2059-2066.
91. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol*. 1989;140:530-537.
92. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8 Suppl. 1993;2:S565-72.
93. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*. 1988;122:254-260.
94. Kream BE, Smith MD, Canalis E, Raisz LG. Characterization of the effect of insulin on collagen synthesis in fetal rat bone. *Endocrinology*. 1985;116:296-302.
95. Kang W, Yun YR, Lee DS, Kim TH, Kim JH, Kim HW, Jang JH. Fluorescence-based retention assays reveals sustained release of vascular endothelial growth factor from bone grafts. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 00A: 1-8.
96. Marini M, Bertolai R, Ambrosini S, Sarchielli E, Vannelli GB, Sgambati E. Differential expression of vascular endothelial growth factor in human fetal skeletal site-specific tissues: Mandible versus femur. *Acta Histochem*. 2015;117(3):228-34.
97. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2004;56(4):549-80.
98. Berendsen AD, Olsen BR. Regulation of adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells by vascular endothelial growth factor A. *J Intern Med*. 2015;277(6):674-80.
99. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*. 2009;19:71-88.
100. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:807-21.
101. Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol*. 2007;9:1000-4.

102. Lin C-C, Metters AT, Anseth KS. Functional PEG-peptide hydrogels to modulate local inflammation induced by the pro-inflammatory cytokine TNF[alpha] Biomaterials. 2009;30(28):4907–4914.
103. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Impaired fracture healing in the absence of TNF- α signaling: The role of TNF- α in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res.* 2003;18(9):1584–1592.
104. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):179–186.
105. Gerstenfeld LC, Cho T-J, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF- α signaling: The role of TNF- α in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res.* 2003;18(9):1584–1592.
106. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004;22(4):233-41.
107. Termaat M, Boer D, Bakker, Patka P, Haarman JM. Bone Morphogenetic Proteins Development and Clinical Efficacy in the Treatment of Fractures and Bone Defects. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(6): 1367 -78.
108. Robey PG. Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue Eng Part B Rev.* 2011;17:423–430.
109. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1992;7:235–246.
110. Tada H, Nemoto E, Foster BL, Somerman MJ, Shimauchi H. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone.* 2011;48:1409–1416.
111. Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem.* 1995;270: 9420-8.
112. Sambrook J, Maccallum P, Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd edition. Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Press; 2001.
113. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 2009;324:1673-7.

114. Suzuki A, Ghayor C, Guicheux J, Magne D, Quillard S, Kakita A, Ono Y, Miura Y, Oiso Y, Itoh M, Caverzasio J. Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 2006;21:674-83.
115. Luppen CA, Smith E, Spevak L, Boskey AL, Frenkel B. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J Bone Miner Res.* 2003;18:1186-97.
116. Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res.* 2003;18:1842-53.
117. Bonnamain V, Thinard R, Sergent-Tanguy S, Huet P, Bienvenu G, Naveilhan P, Farges JC, Alliot-Licht B. Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. *Front Physiol.* 2013;4:357.
118. Tamama K, Kawasaki H, Wells A. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:795385.
119. Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. *J Endod.* 2010; 36:1963-6.
120. Kim SM, Jung JU, Ryu JS, Jin JW, Yang HJ, Ko K, You HK, Jung KY, Choo YK. Effects of gangliosides on the differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts by modulating epidermal growth factor receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;371: 866–71.
121. Huang CH, Tseng WY, Yao CC, Jeng JH, Young TH, Chen YJ. Glucosamine promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells through modulating the level of the transforming growth factor-beta type I receptor. *J Cell Physiol.* 2010; 225:140-51.
122. Feng X, Huang D, Lu X, Feng G, Xing J, Lu J, Xu K, Xia W, Meng Y, Tao T, Li L, Gu Z. Insulin-like growth factor 1 can promote proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via mTOR pathway. *Dev Growth Differ.* 2014;56:615-24.

123. Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Li L, Tan W, Xu Y, Liu S, Liu H, Jiang J, Wu H, Tao T, Gu Z. TNF- α triggers osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the NF- κ B signalling pathway. *Cell Biol Int*. 2013; 37:1267-75.
124. Teramatsu Y, Maeda H, Sugii H, Tomokiyo A, Hamano S, Wada N, Yuda A, Yamamoto N, Koori K, Akamine A. Expression and effects of epidermal growth factor on human periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res*. 2014;357:633-43.
125. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov*. 2008;92:161-8
126. Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G, Scarpa A, Dazzi F, Pizzolo G, Vinante F. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood*. 2005; 106:59-66.
127. Hu F, Wang X, Liang G, Lv L, Zhu Y, Sun B, Xiao Z. Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and osteogenic and neural differentiation of adipose-derived stem cells. *Cell Reprogram*. 2013;15: 224-32.
128. Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *PloS one*. 2013;8: e55082.
129. Leischner U, Schierloh A, Zieglgansberger W, Dodt HU. Formalin-induced fluorescence reveals cell shape and morphology in biological tissue samples. *PLoS One*. 2010; 5:e10391.
130. Nam S, Won JE, Kim CH, Kim HW. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells stimulated by the calcium phosphate porous granules. *J Tissue Eng*. 2011; 2011:812547.
131. Sun HL, Wu YR, Huang C, Wang JW, Fu DJ, Liu YC. The effect of SIRT6 on the odontoblastic potential of human dental pulp cells. *J Endod*. 2014 Mar; 40:393-8.
132. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001;189: 54-63.
133. Vishwanath VR, Nadig RR, Nadig R, Prasanna JS, Karthik J, Pai VS. Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem

cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2013;16: 423–428.

134. Mori G, Brunetti G, Oranger A, Carbone C, Ballini A, Lo Muzio L, Colucci S, Mori C, Grassi FR, Grano M. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1237: 47-52.

135. Stucki U, Schmid J, Hämmerle CF, Lang NP. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. A descriptive histochemical study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2001;12: 121-7.

136. Ling LE, Feng L, Liu HC, Wang DS, Shi ZP, Wang JC, Luo W, Lv Y. The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2015; 103:1732-45.

137. Shi X, Wang Y, Varshney RR, Ren L, Zhang F, Wang DA. In-vitro osteogenesis of synovium stem cells induced by controlled release of bisphosphate additives from microspherical mesoporous silica composite. *Biomaterials.* 2009;30: 3996–4005.

138. McKee MD, Addison WN, Kaartinen MT. Hierarchies of extracellular matrix and mineral organization in bone of the craniofacial complex and skeleton. *Cells Tissues Organs.* 2005;181: 176-88.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

CD, MOA. Casiano Del Angel Mosqueda

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL HUMANA Y SU DIFERENCIACIÓN A LINAJE OSTEOGÉNICO *IN VITRO* UTILIZANDO FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México el 21 de agosto de 1979, hijo de Casiano Del Angel Hernández y María Magdalena Mosqueda Chávez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).
Grados obtenidos: Cirujano Dentista y Maestro en Odontología Avanzada.

Experiencia profesional: Profesor de Pregrado y Posgrado en la Facultad de Odontología de la UANL.

RESEARCH

Open Access

Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells *in vitro*



Casiano Del Angel-Mosqueda^{1,2,4}, Yolanda Gutiérrez-Puente^{2,3}, Ada Pricila López-Lozano^{1,2,4}, Ricardo Emmanuel Romero-Zavaleta¹, Andrés Mendiola-Jiménez⁵, Carlos Eduardo Medina-De la Garza^{1,5}, Marcela Márquez-M^{5,6} and Myriam Angélica De la Garza-Ramos^{1,4*}

Abstract

Introduction: Epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) play an important role in extracellular matrix mineralization, a complex process required for proper bone regeneration, one of the biggest challenges in dentistry. The purpose of this study was to evaluate the osteogenic potential of EGF and bFGF on dental pulp stem cells (DPSCs).

Material and methods: Human DPSCs were isolated using CD105 magnetic microbeads and characterized by flow cytometry. To induce osteoblast differentiation, the cells were cultured in osteogenic medium supplemented with EGF or bFGF at a low concentration. Cell morphology and expression of CD146 and CD10 surface markers were analyzed using fluorescence microscopy. To measure mineralization, an alizarin red S assay was performed and typical markers of osteoblastic phenotype were evaluated by RT-PCR.

Results: EGF treatment induced morphological changes and suppression of CD146 and CD10 markers. Additionally, the cells were capable of producing calcium deposits and increasing the mRNA expression to alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) in relation to control groups ($p < 0.001$). However, bFGF treatment showed an inhibitory effect.

Conclusion: These data suggests that DPSCs in combination with EGF could be an effective stem cell-based therapy for bone tissue engineering applications in periodontics and oral implantology.

Keywords: Dental pulp stem cells, Epidermal growth factor, Basic fibroblast growth factor, Osteogenic differentiation, Bone mineralization, Bone remodelling

Introduction

The multi-lineage differentiation capacity of mesenchymal stem cells (MSCs) has been amply studied in recent years because of its implication in tissue engineering and regenerative medicine [1, 2]; however, this field is currently faced with the critical challenge of developing novel approaches to regenerate large bone defects. Some years ago, Gronthos and colleagues isolated dental pulp stem cells (DPSCs) from human third molars confirming that these cells present the ability to differentiate into

odontogenic/osteogenic cells [3–5]. Previous reports have shown that the osteogenic differentiation on DPSCs is successfully induced by chemical cues such as dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate [6–8]. Although these compounds have proven efficacy, analysis of the role of growth factors in osteogenesis has been the aim of several studies focused on improving extracellular matrix mineralization, a physiological process characterized by high expression of alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN), followed by calcium deposition [9, 10].

Epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) are powerful mitogens for many cell types including MSCs [11–13]. Ideally, it is expected that these factors maintain the self-renewal and multipotency capacities of these cells [14] but it is known that they can also promote differentiation towards specialized

* Correspondence: myriam.garzarami@uanl.edu.mx

¹Unidad de Odontología Integral y Especialidades, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

²Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Del Angel-Mosqueda et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.