



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS**

"Aislamiento de células madre a partir de tejidos dentales y su capacidad de diferenciación osteogénica"

Consuelo Balanda Maluenda

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Cristian Covarrubias G.

TUTORES ASOCIADOS

**Dr. Juan Pablo Rodríguez
(INTA, U. de Chile)**

Adscrito a Proyecto Fondecyt 1130342 / 1130045

Santiago – Chile

2013



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS**

"Aislamiento de células madre a partir de tejidos dentales y su capacidad de diferenciación osteogénica"

Consuelo Balanda Maluenda

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Cristian Covarrubias G.

TUTORES ASOCIADOS

**Dr. Juan Pablo Rodríguez
(INTA, U. de Chile).**

Adscrito a Proyecto Fondecyt 1130342 / 1130045

Santiago – Chile

2013

Agradecimiento

A mis papás, Jaime y Marcela por su apoyo y cariño incondicional a lo largo de mi vida especialmente durante estos 6 años de carrera. A mis hermanos, por estar siempre conmigo. Por ser la mejor familia, que me dio la fuerza para salir adelante.

A mis amigos, por todos los buenos momentos que vivimos y por haber logrado formar un grupo unido que siempre me brindo apoyo cuando lo necesite.

A mi pololo, Andrés por ser un pilar fundamental durante todo el tiempo que llevamos juntos. Por todos los momentos que hemos superado y por el cariño que me has entregado.

A mis tutores de Tesis, Dr. Cristian Covarrubias por toda la paciencia y tiempo invertido para lograr elaborar este trabajo. Al Dr. Juan Pablo Rodriguez y a la gente del INTA, especialmente a la Carla, Nico y Naty por toda su ayuda brindada durante este proceso. A Nancy y Marta por las imágenes de Microscopia SEM.

A los docentes y funcionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por la formación, entrega y compromiso hacia los alumnos. Gracias a la Verito por todas las alegrías vividas, por todas las horas de conversación y por ser una persona especial llena de vida que me cuida y me quiso durante todo este tiempo.

Índice

1. Resumen	1-2
2. Marco teórico	
- Regeneración ósea en odontología.....	3-6
- Sustitutos óseos utilizados.....	7-8
- Ingeniería tisular.....	9-10
- Células Madre.....	11-13
- Fuentes de obtención de células madre.....	14-16
- MSCs de la pulpa dental.....	17-18
- MSCs de ligamento periodontal.....	19-21
3. Hipótesis y objetivos.....	22
4. Materiales y Métodos.....	23-37
5. Resultados.....	38-56
6. Discusión.....	57-64
7. Conclusiones	65
8. Referencias Bibliográficas.....	66-73
9. Anexos	
- Carta de aprobación del comité de ética.....	75-77
- Consentimientos informados.....	78-86
- Estadística.....	87-92

1. Resumen

Introducción:

La regeneración ósea es un procedimiento requerido en odontología en técnicas quirúrgicas reconstructivas, implantología y en periodoncia. En los últimos años la Ingeniería Tisular (IT) se encuentra centrada en el desarrollo de terapias más eficiente para la regeneración de tejido óseo. La IT es una disciplina que se basa en tres elementos principales; a) señales bioactivas, (b) Andamio (scaffold) y (c) Células madre. Un requerimiento fundamental de la IT es el de disponer de fuentes apropiadas de células madres para el desarrollo de nuevas terapias, así como el de conocer las propiedades de estas células para cada aplicación específica. Las células madre son células no diferenciadas que tienen la capacidad de auto renovarse, diferenciarse a multilíneas de células individuales y regenerar in vivo diferentes tejidos. Últimamente se ha generado el interés de aislar células madre de origen dental, donde se han identificadas MSCs en pulpa dental (DPSCs), dientes deciduos exfoliados (SHED), folículo dental, papila apical radicular (SCAP) y ligamento periodontal (PDLSCs). Sin embargo, hasta el momento no se conocen estudios que comparen y demuestren diferencias en la habilidad de estas células de distinto origen, para diferenciarse hacia el linaje óseo; ni tampoco que indiquen qué técnica de aislamiento podría ser más apropiada para este propósito.

El objetivo del presente estudio consiste en aislar y comparar la capacidad de diferenciación osteogénica de las DPSCs y PDLSCs, utilizando para ello dos técnicas de aislamiento, explante y digestión enzimática.

Materiales y Métodos: Se recolectaron terceros molares impactados de pacientes sanos, previa firma de consentimiento informado y se les extrajo el ligamento periodontal y pulpa dental. Ambos tejidos fueron cultivados y aislados mediante el método de digestión enzimática y explante. Se analizó la viabilidad mediante la técnica exclusión azul de tripán y ensayo MTS. La capacidad de diferenciación osteogénica se evaluó a través de la medición de la actividad de fosfatasa alcalina, depósitos de matriz mineralizada y expresión de genes tempranos. Adicionalmente las células fueron sometidas a un periodo de criopreservación donde posteriormente se evaluó su viabilidad.

Resultados

Para DPSCs y PDLSCs se obtuvieron valores de viabilidad cercanos al 90%, sin diferencia significativas entre ellas. Al evaluar la viabilidad celular a tiempos determinados, las DPSCs- digestión obtiene los mayores valores en cuanto a la cantidad de células al finalizar el cultivo. Los resultados en relación a la diferenciación osteogénica muestran mayores niveles de actividad de ALP y mayores depósitos de matriz mineralizada para las DPSCs, analizados con rojo alizarín y microscopía SEM. Ambos tejidos son capaces de mantener una viabilidad adecuada luego de un proceso de criopreservación.

Conclusiones

Células osteoprogenitoras aisladas de pulpa dental, presentan mejores propiedades de diferenciación al linaje óseo, comparado con las células madre obtenidas de ligamento periodontal. Las DPSCS-digestión aparecen como una alternativa promisoría para aplicaciones en ingeniería de tejidos orientada a la regeneración ósea en odontología.

1. Marco Teórico

Regeneración Ósea en Odontología.

El esqueleto humano en su mayoría está formado por tejido óseo. Éste presenta múltiples funciones entre las cuales se encuentra permitir nuestros movimientos y convertirse en el armazón que soporta nuestro cuerpo y protege nuestros órganos.

El hueso es un tejido vascular y dinámico que se encuentra en constante cambio durante toda la vida de los individuos producto de los procesos de formación y reabsorción ósea. Estos procesos permiten el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo del fósforo y el calcio. Se calcula que anualmente el 5-10% del volumen óseo total es renovado (Davies y cols., 2000; Davies 2005; Fernández y cols. a, 2006).

El hueso alveolar corresponde a una parte especializada del esqueleto craneomaxilofacial, el cual constituye el principal soporte del diente. El tejido óseo tiene la capacidad de restituirse totalmente ante una lesión. El fenómeno de Regeneración Tisular, a diferencia del proceso de reparación en el que el tejido que se forma es un tejido de cicatrización distinto del original, consigue la restitución íntegra del tejido tras una injuria (Fernández y cols. b, 2006). La regeneración es un fenómeno mediado por células, vasos sanguíneos y matriz extracelular, regido a su vez por una compleja serie de interacciones de factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (Fernández y cols. b, 2006).

En el ámbito de la odontología los defectos y deformidades que afectan al tejido óseo se producen como resultado de malformaciones congénitas, trauma, enfermedad periodontal o procedimientos quirúrgicos en el caso de resecciones de tumores (Sándor y cols., 2003). La pérdida de hueso también se luego de la extracción dental a través de un fenómeno de reabsorción y remodelación llamado reabsorción del reborde residual (Marei y cols., 2005). La magnitud estimada de esta pérdida ósea es de un 60% dentro de los 3 primeros años luego de la extracción, seguido por una pérdida de 0,25% en los años siguientes (Sándor y cols., 2003).

La enfermedad periodontal es la principal patología que afecta la integridad de los tejidos de soporte periodontal (fibras del ligamento periodontal, hueso alveolar, cemento radicular) generando la destrucción de dichos tejidos y en casos más severos hasta la pérdida del diente (Bottino y cols, 2012; Razzouk y Schoor, 2012). El tratamiento de la periodontitis inducida por placa consiste en la eliminación de la biopelícula bacteriana de la superficie radicular de los dientes periodontalmente afectados, para lograr de esta forma reducir el número de microorganismos, eliminar los depósitos calcificados y desorganizar la ecología bacteriana (Adriaens P y Adriaens T, 2005). En algunos casos, luego de haber realizado el tratamiento periodontal convencional, es necesaria la realización de tratamiento periodontal quirúrgico. Las técnicas utilizadas para la regeneración del aparato de inserción periodontal, incluyen el uso de técnicas quirúrgicas como: injertos óseos de reemplazo, técnicas de regeneración guiada o técnicas regenerativas combinadas (Cruz y Bascones, 2011; Razzouk y Schoor, 2012).

Según la Encuesta Nacional de Salud de Chile (2003), los pacientes odontológicos en Chile presentan un alto número de piezas dentales perdidas, siendo los pacientes entre 35 a 44 años los que presentan un promedio de 6,5 dientes perdidos, mientras que este promedio aumenta en personas de 65 a 74 años a 15,8 piezas dentarias perdidas (Minsal, 2003). La implantología permite responder ante esta gran cantidad de pacientes que necesitan recuperar la función y la estética perdida. Sin embargo, existe una serie de condiciones locales de la cresta ósea alveolar, desencadenadas por el proceso de atrofia, enfermedad periodontal y/o trauma, que pueden proporcionar insuficiente volumen de hueso necesario para poder rehabilitar con implantes al paciente parcial o totalmente desdentado (Chiapasco y cols., 2006; Olate y cols. a, 2007; Pagni y cols., 2012).

El éxito en la colocación del implante depende en gran medida de la oseointegración, siendo parámetros cruciales en este proceso; la cantidad y calidad de hueso remanente junto con la interacción entre las superficies del implante y del tejido óseo (Sujesh y cols., 2012). La literatura refiere que las dimensiones óseas mínimas requeridas para la colocación de implantes son: un ancho de 5 mm (vestíbulo – palatino/lingual) y altura de entre 7 y 10 mm. Si estas condiciones no se cumplen, la rehabilitación con implantes pasa a ser un

procedimiento imposible de realizar desde un punto de vista funcional (Olate y cols. a, 2007; Carrillo y cols., 2009).

Para cumplir con las demandas de aumento de volumen óseo se recurre a tratamientos adicionales como: **regeneración ósea guiada (ROG), plasma rico en plaquetas y el uso de materiales de injerto óseo y membranas** (Kubo y cols., 2011).

La ROG consiste en la utilización de membranas de barrera reabsorbibles o no reabsorbibles para proteger los defectos óseos de la invasión de tejido provocado por el crecimiento excesivo de células del tejido blando, lo que impide la osteogénesis en el sitio a regenerar. Esta técnica permite una ganancia de 2 a 8 mm de tejido óseo vertical. Las complicaciones más frecuentes reportadas son: la exposición de membranas de barrera o del injerto y dehiscencias o infección de la mucosa adyacente a la zona intervenida (Nappe y Baltodano, 2013).

El plasma rico en plaqueta (PRP) es una fracción de plasma obtenido de sangre autóloga que contiene una alta concentración de plaquetas, factores de crecimiento y proteínas que participan en procesos de adhesión y diferenciación celular. Su aplicación produce una disminución de la respuesta inflamatoria que ocurre en los procesos de reparación y promueve la supervivencia y diferenciación de las células mesenquimáticas sobre las que actúa. Es utilizado en los campos de cirugía oral y odontología por los efectos estimulantes sobre los fibroblastos del periodonto y mucosa oral y sobre los osteoblastos del hueso alveolar, logrando producir efectos regenerativos a nivel óseo y de tejido blando (Flores y cols., 2011). Su obtención involucra la extracción de sangre previa a la cirugía y el procesamiento mediante métodos de separación bien establecidos.

La pérdida ósea puede ocurrir antes de la colocación de los implantes, fenómeno denominado como deficiencia ósea primaria, la cual se puede solucionar de dos formas terapéuticas. La primera de ellas consiste en un procedimiento quirúrgico en un solo paso, en donde se colocan los implantes en conjunto con la membrana con o sin injerto. El segundo procedimiento consiste en dos pasos, en el cual se aumenta el volumen óseo con la ayuda de membranas e injertos y en un segundo tiempo quirúrgico se posicionan los implantes. Por otra parte, puede existir una deficiencia ósea secundaria que se produce cuando hay

pérdida ósea posterior a la colocación de un implante. En relación a esto, se ha observado en rehabilitaciones implanto-soportadas donde hay pérdida de hueso crestal una mayor acumulación de placa bacteriana, que de no ser controlada en el tiempo, resulta en una peri-implantitis, patología que a su vez va a generar sobrecarga oclusal y mayor pérdida de hueso, que en última instancia resulta en el fracaso del implante (Prasad y cols., 2011).

Por todo lo indicado anteriormente, la regeneración ósea se convierte en un procedimiento indispensable previo a la rehabilitación mediante implantes dentales, así como en un importante desafío en el tratamiento avanzado de la enfermedad periodontal. El fin último de la **regeneración tisular ósea** es el de producir un nuevo hueso en donde se ha perdido, manteniendo las características estructurales y funcionales similares a las del tejido óseo original (Ueda, 2011; Pagni y cols., 2012).

Sustitutos óseos utilizados

Existen diferentes técnicas reparativas para la regeneración de hueso a nivel oral que combinan tres mecanismos esenciales, la osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Giannoudis y cols., 2005; Sanguino, 2011; Razzouk y Schoor, 2012). La osteogénesis consiste en la formación de hueso por osteoblastos, que derivan de células osteoprogenitoras, la osteoinducción se refiere a la capacidad de un material para estimular y activar las células osteoprogenitoras del tejido circundante, y la osteoconducción describe la facilitación y orientación de los vasos sanguíneos por parte de un andamiaje para la formación de nuevos sistemas de Havers en el hueso (Giannoudis y cols., 2005). Otro concepto importante corresponde al de osteointegración, que se refiere a la unión final entre el hueso del hospedero y material de injerto, y que se aplica principalmente a los implantes. Todos estos mecanismos en su conjunto permiten explicar el complejo proceso de regeneración ósea (Sanguino, 2011).

Las opciones de reconstrucción ósea del esqueleto cráneo maxilofacial incluyen injerto óseo autólogo de fuentes locales o distantes, trasplante alogénico, hueso xenogénico y sustitutos aloplásticos; dentro de los cuales se encuentran los materiales cerámicos como hidroxiapatita (HA), fosfatos de calcio, y vidrio bioactivo (Sándor y cols., 2003; Kubo y cols., 2011).

Los injertos de tejidos autólogos son considerados el “gold estándar” en la reparación de defectos óseos debido a sus propiedades osteoconductoras y osteoinductivas (Sándor y cols., 2003; Kubo y cols., 2011; Ueda, 2011; Zhang, 2011; Pagni y cols., 2012). Se ha visto que aproximadamente el 8% de injertos iliacos provocan complicaciones mayores como infecciones, hemorragias, lesiones nerviosas, dolores a corto o largo plazo y alteraciones funcionales. Además, la cantidad de hueso requerida es limitada y puede ser inadecuada en algunos casos clínicos (Sándor y cols., 2003; Kubo y cols., 2011; Ueda, 2011; Zhang, 2011).

Por su parte, los injertos alogénico o aloinjertos son tejidos óseos no vitales tomados de un individuo y transferido a otro de la misma especie (Sándor y cols., 2003). Este tipo de injertos evitan los problemas del sitio donante y conservan la

estructura ósea, además de contener los factores de crecimiento necesarios para la osteoinducción. El defecto que presentan estos injertos es un mayor riesgo de presentar rechazo inmune y transmisión de infecciones como hepatitis y VIH (Valdivia, 2009; Kubo y cols., 2011). Dentro de las complicaciones, los aloinjertos son los que presentan mayor cantidad de infecciones locales (12-15%), fracturas (10-16%) y no consolidaciones como pseudoartrosis (9-23%) (Becerra y cols., 2001; Reynolds y cols., 2009).

Los xenoinjertos son injertos quirúrgicos trasplantados entre diferentes especies, los que pueden provenir de un donante de mamífero o exoesqueletos de coral (Sándor y cols., 2003; Reynolds y cols., 2009). En sus inicios estos injertos presentaban problemas al generar enfermedades de origen autoinmunes, lo que se fue solucionando en el tiempo a través de métodos de eliminación de materia orgánica aplicados a las partículas del injerto óseo que permitieron una mayor tolerancia inmunológica. En la práctica clínica los más comercializados son los provenientes de hueso bovino y coral natural. Su ventaja es que reduce la morbilidad, pero existe una gran controversia por la posibilidad de presentar a futuro enfermedades de origen bovino virales de lento potencial de expresión (Becerra y cols., 2001; Sándor y cols., 2003).

Por último, están los sustitutos óseos aloplásticos, sustancias inorgánicas sintéticas biocompatibles, procesadas para el uso clínico de la regeneración ósea. Actualmente existen dos tipos; las cerámicas y los polímeros. (Sándor y cols., 2003; Reynolds y cols., 2009). Estos materiales tienen propiedades osteoconductoras que van a depender de la composición, morfología y topografía de superficie. (Olate y cols., 2007; Reynolds y cols., 2009).

Para que los materiales de injerto expuestos anteriormente sean capaces de integrarse biológicamente al tejido del huésped, deben ser colocados en un entorno óseo vivo, bien vascularizado y en circunstancias biomecánicas favorables. Estas condiciones no siempre se cumplen totalmente ocurriendo el fracaso y rechazo del injerto (Becerra y cols., 2001). Además, estos materiales presentan una habilidad relativamente limitada para producir una *regeneración* estructural y funcional del tejido, ya que permiten obtener generalmente un soporte mineralizado con características cercanas al hueso, más que un tejido óseo como el existente previo a su destrucción.

Ingeniería Tisular

En los últimos años, específicamente partir de la década de 1990, se ha desarrollado dentro de la investigación médica y odontológica una disciplina altamente promisorio conocida con el nombre de **Ingeniería Tisular (IT)**.

Langer y Vacanti (1987) proponen el uso de la IT para lograr la regeneración de tejidos perdidos y restablecer diversas funciones de órganos y tejidos humanos dañados. La IT fue definida por dichos autores como “aquél campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos u órganos completos” (Peng y cols., 2009).

Los principios de la IT asociados a la medicina regenerativa involucran e interrelacionan tres grandes elementos a saber; **(a) Señales morfogénicas, (b) Andamio (scaffold) y (c) Células madre indiferenciadas** (Bottino y cols., 2012; Sedgley y Botero, 2012; Suchánek y cols., 2012). El objetivo final de la IT a partir de estos 3 pilares es el desarrollo de un **constructo bioactivo**. Este elemento consiste en el uso del biomaterial andamio que puede o no tener moléculas o partículas bioactivas en combinación con células madre. El constructo puede ser injertado ya sea inmediatamente luego de ser cargado con las células o después de un tiempo de incubación, en donde el constructo es inducido *ex vivo*, para una producción previa de matriz extracelular y/o tejido en formación.

Su importancia radica en que este nuevo campo de investigación contribuiría a la regeneración, reparación o reemplazo bioartificial de tejidos u órganos propios del cuerpo humano que han sido dañados por diversos factores como trauma, quemaduras o enfermedades como el cáncer o patologías congénitas (Rosales y cols., 2012).

El primer elemento son la **señales morfogénicas o biomoléculas** o inductores o factores de crecimiento y de diferenciación, que juegan un rol importante en la multiplicación y diferenciación de células madre a tipos celulares específicos. Últimamente, gracias a los avances de la nanotecnología, estos elementos pueden ser también nanomateriales bioactivos con la capacidad de

producir estímulos a nivel celular. Las células son capaces de responder al medio extracelular ya que detectan señales químicas o estímulos físicos que permiten la activación de distintos mecanismos moleculares y biológicos a este nivel. La participación de estas sustancias es fundamental ya que contribuye al crecimiento y desarrollo tisular, permitiendo los procesos de división celular, migración, diferenciación y destrucción vía apoptótica. La incorporación de estos factores a los biomateriales (andamios) ha permitido que la liberación y exposición sea más prolongada, ya que estos presentan una vida media muy corta por si sola y al estar incorporados a un material su permanencia en los tejidos aumenta. La vida media de las señales morfogénicas de esta forma, será dependiente de la tasa de difusión o de degradación que tenga el biomaterial utilizado (Singh y cols., 2012).

El **andamio** en relación a la IT son materiales que deben favorecer la función mecánica y biológica de las células actuando como una matriz extracelular porosa. Debe ser un material biocompatible o biológicamente aceptado y debe tener la capacidad de reabsorberse pero, ser capaz a su vez de mantener sus propiedades durante el tiempo que tenga que desempeñar su función. De esta manera, estos biomateriales otorgan un espacio a las células madre en tres dimensiones para formar los nuevos tejidos con una estructura y función adecuada. Además de esta propiedad permiten promover el crecimiento, diferenciación celular, el depósito de matriz mineralizada y permiten ofrecer sitios específicos de adhesión celular en el cuerpo con una eficiencia de carga, favoreciendo de esta forma también la adhesión celular (Rezwan y cols., 2006; Bairo y Vitale, 2011; Rosales y cols., 2012).

Por otro lado, las **células madre** son células no diferenciadas que tienen la capacidad de auto renovarse, diferenciarse a multilíneas de células individuales y regenerar *in vivo* diferentes tejidos o tipos celulares funcionales. La capacidad de diferenciarse permite que la célula madre pierda sus características originales para luego adquirir propiedades nuevas condicionadas por el medio ambiente en el que se encuentren. Se le han asociado, en los últimos años, las características de plasticidad y dediferenciación. El primer concepto es definido como la capacidad de una célula madre en dar origen a células de linajes distintos al de su origen pero de la misma capa embrionaria, a diferencia de la dediferenciación, que permitiría que las células madre se diferenciaron a células de capas embrionarias

distintas a las de su origen (Perez y Lorenti, 2006; Zhang, 2011; Rosales y cols., 2012; Sujesh y cols., 2012).

Células Madre.

Las células madre se pueden clasificar bajo dos criterios: plasticidad y origen. Según su plasticidad pueden ser células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Mientras que por su origen pueden ser células madre embrionarias (ESCs) o adultas (ASC) (Perez y Lorenti, 2006; Zhang, 2011; Rosales y cols., 2012; Singh y cols., 2012; Sujesh y cols., 2012).

Según su plasticidad se distinguen en primer lugar las **células madre totipotenciales** (del latín *totus*, que significa completa) hace referencia al potencial de regenerar un embrión completo, tanto tejido extraembrionarios como embrionarios, **pluripotente** (“pluri” del latín *plures* que significa muchos o varios) son aquellas células capaces de dar origen a progenitores especializados de cualquiera de las tres capas embrionarias demostrando funcionalidad tanto *in vitro* como *in vivo*, además de ser capaz de producir un asentamiento claro y persistente en el tejido blanco. Las **células multipotentes** son aquellas que dan origen solo a las células que están relacionadas a una de los tres líneas embrionarias y finalmente las **unipotentes** (del latín *unas*; uno) que originan células hijas pertenecientes a una única línea celular (Munevar y cols., 2005; Perez y Lorenti, 2006).

En base de la segunda clasificación se encuentran las **ESCs**, que son células obtenidas de la masa celular interna del blastocito durante el desarrollo del embrión (7-14 días), estructura que posteriormente dará origen a las tres capas embrionarias endodermo, mesodermo y ectodermo (Figura 1). Son células pluripotentes capaces de dividirse ilimitadamente y diferenciarse en todas las células somáticas del organismo, excluyendo la formación de tejidos extraembrionarios. Esta misma capacidad se convierte en su desventaja ya que si no están bajo control se diferencian y proliferan sin límites, presentando de esta forma un alto potencial neoplásico (Pérez y Lorenti, 2006; Chao y cols., 2012; Sujesh y cols., 2012; Ulmer y cols., 2010). Ética y políticamente el uso de células embrionarias es un tema controversial porque supone la destrucción de embriones humanos en desarrollo (Ulmer y cols., 2010; Rodríguez y cols., 2011).

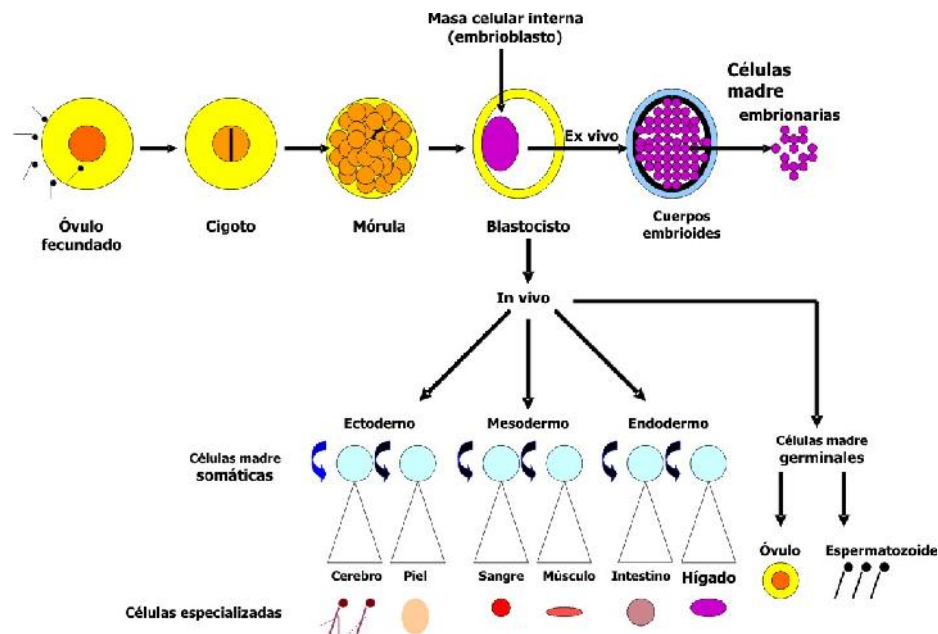


Figura 1. Desarrollo del embrión humano y tejidos fundamentales. Las ESCs (morado) provenientes de la masa interna del blastocisto. Luego los diferentes tejidos estructurales; ectodermo, mesodermo y endodermo. (Hernández P y Dorticós E, 2004)

Las **ASC** son células indiferenciadas que están presentes en tejidos diferenciados, normalmente se dividen y producen células progenitoras que se diferencian a células con características especializadas idénticas a las del tejido de origen. Actualmente, estudios han demostrado que presentan la capacidad de generar tipos celulares de tejidos diferentes (Munevar y cols., 2005; Rodríguez y cols., 2011). Se encuentran en áreas específicas de estos tejidos en un estado latente donde son activadas por diferentes estímulos como factores genéticos o ambientales, fuerzas mecánicas, enfermedades o trauma. Adicionalmente, en estos nichos específicos ocurre la regulación de los procesos de supervivencia, migración y envejecimiento de las células. La principal función de las ASC es la regeneración de múltiples tejidos que han sido dañados o tejidos que necesitan funciones de reparación o regeneración (Sedgley y Botero, 2012; Sujesh y cols., 2012).

Las células ASC, a diferencia de las ESC, son **células multipotentes** por lo que presentan una limitada capacidad de diferenciación y pueden proliferar un

número limitado de veces (Valdivia, 2009; Ulmer y cols., 2010; Sedgley y Botero, 2012). Hay 3 tipos de células multipotentes las ectodérmicas, mesodérmicas o mesenquimáticas y las endodérmicas (Sujesh y cols., 2012).

Las **células Mesenquimáticas (MSCs)** son células madre multipotentes no hematopoyéticas capaces de diferenciarse en tipos celulares mesenquimáticos y no mesenquimáticos (Akiyama y cols., 2012). Fueron descubiertas por primera vez en el estroma de la médula ósea por lo que también reciben el nombre de células madre estromales. Se caracterizan por presentar aspecto de fibroblastos fusiformes en cultivos no estimulados, mostrar adherencia al plástico y una serie de marcadores específicos como SH2, SH3 y SH4, además de algunos antígenos de superficie como son CD29, CD44, CD73, CD90, CD106, CD 271 y STRO-1 utilizados para su caracterización e identificación como MSC (Hernandez y Dorticós, 2004; Chao y cols., 2012; Kawashima, 2012).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the international Society for Cellular Therapy) (Dominici y cols., 2006) define poblaciones in-vitro de MSCs en base a 3 criterios: 1) Adhesión a superficies plásticas, 2) Expresión de un conjunto específico de marcadores de superficie de membrana 3) y capacidad de diferenciarse a los diferentes linajes de células mesenquimáticas; osteoblasto, condroblasto, fibroblasto y adipocito entre otros (Figura 2). Al ser cultivados en un medio de cultivo específico deben ser capaces de diferenciarse en al menos 3 de estos tipos de tejidos (Valdivia, 2009; Razzouk y Schoor, 2012).

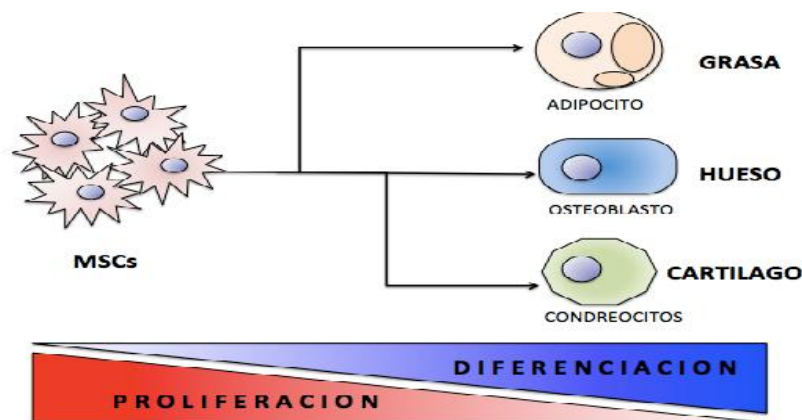


Figura 2. Diferenciación de MSCs adultas a tres linajes celulares distintos. (Pittenger y cols., 1999).

Fuentes de obtención de las células madre

Las MSCs se encuentran en diferentes tejidos del cuerpo humano como la médula ósea, cordón umbilical, tejido adiposo, músculos, cerebro y tejidos dentales entre otros (Razzouk y Schoor, 2012; Sedgley y Botero, 2012).

La médula ósea es considerada la fuente tradicional de MSCs, está formada por una población celular heterogénea consistente en fibroblastos, osteoblastos, progenitores adiposos y células madre. La población de células madre presente en este tejido es variada existiendo las células madre hematopoyética, población lateral, células progenitoras adultas multipotentes y las Mesenquimáticas que corresponde a un 0.001% a 0.01% del total celular. Estudios señalan la amplia capacidad de las células madre de médula ósea (BMSCs) para diferenciarse en diferentes tejidos que incluye hueso, cartílago, tendón, musculo, tejido adiposo y tejido de soporte para el estroma hematopoyético (Baksh y cols., 2004; Peng y cols., 2009). Su aplicación clínica presenta una serie de limitaciones ya que su recolección mediante aspiración implica la realización de un procedimiento quirúrgico invasivo que puede causar infección, hemorragia y dolor crónico. Además, se ha estudiado que las células de este tejido presentan un acelerado envejecimiento con la edad y la cantidad de células obtenidas después de la extracción es relativamente baja (Huang y cols., 2009; Chao y cols., 2012; Razzouk y Schoor, 2012).

La obtención de células del cordón umbilical, es un procedimiento más ventajoso ya que es un tejido que es desechado, no involucra un proceso invasivo y es indoloro e inocuo tanto para la madre como para el hijo (Chao y cols., 2012). Presentan un alto potencial de multiplicación, en un estudio reciente se comparó la capacidad de división celular y las células del cordón umbilical fueron capaces de expandirse 20 veces en contraste con las células de la médula que lo hicieron 5 veces y el tejido adiposo 8 veces (Flores y cols., 2011). La gran desventaja descrita es que la única oportunidad para obtener fuentes de células madre de cordón umbilical es al momento del nacimiento del bebé (Sujesh y cols., 2012).

Las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSCs) son consideradas

un grupo de células mesenquimáticas pluripotente que presentan una alta capacidad para diferenciarse a un multilínea de tejidos entre los que están; cartílago, hueso, tejido adiposo, músculo y tejido neuronal. Presenta la ventaja de que el tejido adiposo se obtiene a través de un procedimiento quirúrgico aspirativo menos invasivo (liposucción) que el de la médula ósea, además de que el acceso es sencillo y el procesamiento del tejido es fácil de realizar. La liposucción es uno de los procedimientos estéticos más realizados en el mundo y es bien aceptado por los pacientes que en su mayoría tienen un mala percepción del exceso de grasa. La cantidad de ADSCs obtenidas es mayor ya que es posible extraer varios mililitros de grasa de cada paciente considerando que es uno de los tejidos más abundantes en el cuerpo (Peng y cols., 2009; Pineda y Londoño, 2009). Las desventajas que presenta esta fuente de extracción es que se necesita realizar un procedimiento quirúrgico que aunque, como se mencionó anteriormente es poco invasivo es necesario el uso de anestesia general y como toda operación tiene riesgos en cuanto a infecciones posteriores. Se describe que el tejido adiposo presenta altas concentraciones de monocitos/macrófagos, células productoras de citoquinas que podrían ser contraindicadas en ciertas situaciones clínicas por su potencial impacto inmunológico (Madriz, 2010).

Últimamente se ha generado también el interés de aislar células madre de origen dental. Esto debido a que los dientes son considerados un material de desecho cuando son perdidos por diferentes motivos (trauma, enfermedad periodontal) o extraídos por indicación ortodóntica y/o protésica (Peng y cols., 2009; Estrela y cols., 2011; Sedgley y Botero, 2012). Además, existe la posibilidad de obtener piezas dentales en diferentes momentos de la vida, considerando que los dientes temporales se pierden a los 6 años y que por diversos motivos jóvenes-adultos deben extraerse los terceros molares entre los 15-28 años, aproximadamente. Se considera que una de las cirugías orales más frecuente en el mundo es la extracción de terceros molares. Existe una serie de condiciones clínica para que la indicación de su remoción sea una práctica frecuente, la mayoría de ellas relacionadas con la posibilidad de que su permanencia a futuro genere patologías en la región oral como caries, enfermedad periodontal, pericoronaritis, quistes (paradental o radicular), queratoquistes, ameloblastomas, ulceraciones de la mucosa adyacente y complicaciones nerviosa por compresión

del paquete vasculonervioso, entre otras (Olate y cols., 2007). El procedimiento de extracción de terceros molares es relativamente sencillo ya que involucra una cirugía ambulatoria, solo bajo anestesia local. Adicionalmente, los terceros molares son las últimas piezas dentarias permanentes en erupcionar por lo que se encuentran en un estado más temprano del desarrollo si lo comparamos con la médula ósea (Mori G y cols., 2009).

En comparación a los otros tejidos donde existen “nichos o locus” de células madre, el diente presenta la ventaja de que el acceso a estos sitios es fácil y la extracción celular de estas estructuras es altamente eficiente (Chen y cols., 2012). Estas células presentan una gran capacidad y facilidad de multiplicarse una vez extraídas del organismo, lo que permite considerarlas como una fuente abundante de células.

Los tejidos dentales son tejidos especializados de origen ectomesenquimático, debido a la interacción que hay entre las células mesenquimáticas y las células de la cresta neural durante la formación del diente. El tejido dentario no presenta una tasa de recambio a través de la vida (a diferencia del tejido óseo) pero si posee un limitado potencial de reparación postnatal, al parecer mantenida por un grupo de células madre pulpaes que tienen el potencial de diferenciarse en odontoblastos permitiendo el depósito de dentina terciaria frente a agresiones físicas, químicas y/o biológicas.

En los tejidos dentales hay diferentes fuentes de MSCs identificadas como son la **pulpa dental (DPSCs)**, dientes deciduos exfoliados (SHED), folículo dental, papila apical radicular (SCAP) y **ligamento periodontal (PDLSCs)** (Honda y cols., 2010; Sedgley y Botero, 2012).

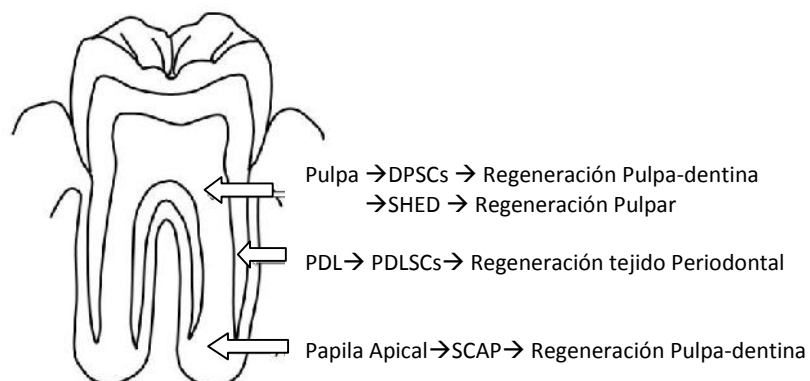


Figura 3. Fuentes de células madre en una pieza dentaria. Imagen muestra 4 zonas de

obtención de células madre en la pieza dentaria; pulpa dental (DPSCs), dientes temporal exfoliados (SHED), papila apical radicular (SCAP) y ligamento periodontal (PDLSCs). (Ranganathan K y Lakshminarayanan V, 2012)

MSCs de la Pulpa Dental

La pulpa dental es un tejido conjuntivo laxo de origen mesenquimático altamente especializado que se encuentra rodeado por un tejido rígido mineralizado y que está ricamente vascularizado e innervado. Histológicamente está compuesto por una matriz extracelular (sustancia fundamental y fibras) y por células, dentro de las cuales encontramos odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y células madre mesenquimáticas indiferenciadas (DPSCs) (Navarro, 2009; Rodríguez y cols., 2011).

Las DPSCs fueron aisladas por primera vez en el año 2000, siendo la primera fuente de células madre aisladas a partir de un diente (Gronthos y cols., 2002). Se caracterizan por presentar una alta proliferación y un gran número de unidades formadoras de colonia productoras de nódulos mineralizados (Demarco y col., 2011; Estrela y cols., 2011).

Esta fuente de células tiene la ventaja de presentar un fácil acceso, baja morbilidad y ser altamente eficientes una vez extraídas, además de presentar interacción con los biomateriales, característica deseable al momento de ser utilizada con los andamiajes en los procedimientos de regeneración (González y cols., 2011).

Las DPSCs tienen capacidad de diferenciarse *in vitro* a condrocitos, adipocitos, osteoblastos/osteocitos, miocitos, células neuronales y cardiomiocitos. Presentan un gran potencial osteogénico comparado con las BMMSCs y células periostales, lo que experimentalmente se ha comprobado a través de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) después de 3 semanas de incubación con medio osteogénico (Chen y cols., 2012). Se ha visto que la diferenciación osteogénica *in vitro* genera células progenitoras osteoblásticas y osteoblastos maduros con producción de LAB (living autologous fibrous bone tissues), e *in vivo* a diferencia de lo anterior, se forma tejido óseo calcificado con sus respectivos canales de Havers y osteocitos (Huang y cols., 2009).

Una característica importante de las DPSCs es su potencial de diferenciación osteoblástica. Estudios señalan que estas células al ser inducidas *in*

vitro se diferencian en células con fenotipo osteoblástico adoptando una morfología polarizada y caracterizada por el depósito de nódulos mineralizantes. En el 2009 se llevó a cabo el primer estudio clínico de reconstrucción de hueso alveolar a partir de DPSCs, confirmando su capacidad para regenerar tejido óseo *in vivo* (D'Aquino R y cols., 2009).

Por otra parte, se han realizado trasplantes *ex vivo* de DPSCs en conjunto con hidroxiapatita/fosfato tricálcico, logrando la formación ectópica de complejos tipo pulpa-dentina en ratones inmunocomprometidos (Huang y cols., 2009). Los complejos tipo pulpa-dentina involucran la formación de una matriz mineralizada tubular rodeada de una línea de odontoblastos, tejido colágeno perpendicular a la superficie mineralizada y tejido fibroso con vasos sanguíneos, con una disposición muy similar al encontrado en complejos pulpo-dentinario humanos (Gronthos y cols., 2002).

Experimentos en animales sugieren que las DPSCs pueden proporcionar una fuente de células para la reparación y/o regeneración de corazón, músculo, cerebro y dientes (Chen y cols., 2012).

MSCs del Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado localizado entre el diente y el hueso alveolar, caracterizado por presentar una alta capacidad de renovación, remodelación y reparación. Está formado por una población heterogénea de células que incluye fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, células endoteliales, células epiteliales y células madre mesenquimáticas (Nomura y cols., 2012). Las MSCs han sido aisladas de ligamento periodontal adulto, en nichos cercanos o incluso en contacto a vasos sanguíneos sugiriendo un posible origen en los pericitos (Martínez, 2010).

Una investigación reciente de Seos y cols., 2004 demostró que células PDLSCs humanas tienen la capacidad de diferenciación *in vitro* a linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico y de regeneración tisular periodontal *in vivo*. Presentan morfología tipo fibroblasto y expresan antígenos que han sido identificados en precursores del estroma de medula ósea (CD90 CD29 CD44 CD166 CD105 CD13). Cuando estas células son diferenciadas a fenotipo osteogénico/odontogénico se caracterizan por presentar cuerpos celulares polarizados y acumulación de nódulos mineralizados (Kadar y col., 2009; Kawanabe y cols., 2010).

En trasplantes *in vivo* las PDLSCs incorporadas sobre andamiajes de hidroxiapatita con trifosfato de calcio (HA/TCP) son capaces de generar cemento y estructuras tipo ligamento periodontal incluyendo la formación de fibras de Sharpey que fisiológicamente son las que unen el hueso con el cemento (Ibarretxe y cols., 2012). Estudios en ratones inmunocomprometidos señalan que al trasplantar PDLSCs en zona con defectos periodontales, permite la regeneración de los tejidos tipo PDL en estrecha relación con hueso trabecular formado inmediatamente a la zona de formación de tejidos periodontales, sugiriendo que estas células estarían relacionados con la regeneración del hueso alveolar (Huang y cols., 2009).

Hasta el momento, la fuente más favorable para la obtención de células

madre de ligamento periodontal y pulpa son los terceros molares incluidos o dientes extraídos por ortodoncia (Gronthos y cols., 2000; Kawanabe y cols., 2010; Macedo y cols., 2010; Magallanes y cols., 2010; Spath y cols., 2010; Atari y cols., 2011; Mori y cols., 2011). Esto debido a que son piezas dentarias frecuentemente extraídas, sin patología pulpar y/o periodontal y desechadas por los odontólogos.

Con respecto al aislamiento de células madre desde tejido periodontal y pulpa dental, se han utilizado dos técnicas: la **digestión enzimática y el método del explante**. En la primera, las muestras biológicas son tratadas enzimáticamente para eliminar la matriz extracelular y aislar las células de interés. Para este propósito, las enzimas más utilizadas son las colagenasas, dispasas y la tripsina. El segundo método de explante consiste en la utilización de fragmentos de tejidos de tamaño macroscópico que son directamente mantenidos en cultivo y a partir de los cuales proliferan las células (Olate y cols., 2007; Rodríguez y cols., 2011).

En relación a las técnicas de aislamiento para estos dos tipos celulares, en la literatura se reportan ambas indistintamente. Se encontró una mayor cantidad de estudios de DPSCs y PDLSCs que utilizan el protocolo de aislamiento digestivo. Sin embargo, no existen estudios en relación a la técnica más ventajoso en cuanto a la capacidad de diferenciación posterior de las células al fenotipo osteoblástico (Gronthos y cols., 2000; Magallanes y cols., 2010; Atari y cols., 2011; Mori y cols., 2011).

En cuanto a las propiedades de las células provenientes de estas dos fuentes de obtención, se ha descrito según Estrela C y colaboradores, que las DPSCs y las PDLSCs en los análisis *in vitro* presentan una multipotencialidad similar ambas con capacidad para diferenciarse a células tipo osteoblasto, odontoblasto, condrocito, miocito, neurocito y adipocito. En estudios *in vivo*, las DPSCs son capaces de diferenciarse a preferentemente a linaje óseo, tejidos tipo complejos pulpo-dentinario y células tipo odontoblasto; mientras que las PDLSCs presentan preferencia hacia la formación de tejido tipo ligamento periodontal y formación de matriz de cemento. Se ha estudiado por separado la expresión de genes *in vitro* en estas células y las DPSCs presentan mayor cantidad de marcadores osteoblásticos que las PDLSCs (Huang y col., 2009). Estos antecedentes sugieren que las PDLSCs y las DPSCs podrían presentar diferentes

propiedades de diferenciación osteogénica (Huang y cols., 2009; Rodríguez y cols., 2011).

Sin embargo, no se conocen estudios que comparen y demuestren diferencias en la habilidad de estas células de distinto origen, para diferenciarse hacia el linaje óseo. De la misma forma, no se tienen referencias acerca de qué tipo de técnica de aislamiento resultaría ser más eficiente para este propósito.

El aislar células madre de origen dental con potencial osteogénico, permitiría disponer de una fuente de células que podría ser usada en el desarrollo de sistemas de ingeniería tisular para la regeneración ósea. Particularmente, en el contexto del proyecto en que se encuentra este estudio, se busca diseñar constructos de regeneración ósea combinando nanomateriales bioactivos con células madre para el tratamiento reconstructivo óseo odontológico para aplicaciones en implantología y periodoncia,

El propósito del presente estudio consiste en aislar células madre provenientes de pulpa dental y ligamento periodontal humano utilizando las técnicas de aislamiento de explante y digestión enzimática, y comparar su capacidad de diferenciación osteogénica de acuerdo a la fuente de tejido y la técnica de aislamiento utilizada.

3. Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS.

Células madre aisladas desde tejido pulpar mediante la técnica de explante presentan mayor capacidad de diferenciación osteogénica que células madre aisladas de ligamento periodontal, utilizando tanto la técnica de aislamiento de digestión enzimática como la técnica por explante.

OBJETIVO GENERAL.

Aislar células madre a partir de ligamento periodontal y pulpa dental, y determinar su capacidad de diferenciación con respecto al tipo de tejido y a la técnica de aislamiento utilizada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Comparar la fuente de obtención de células madre (pulpa y ligamento) en cuanto a la viabilidad y capacidad de diferenciación osteogénica de las células aisladas.
2. Comparar los métodos de aislamiento de las células por explante y digestión enzimática con respecto a la viabilidad y capacidad de diferenciación osteogénica de las células aisladas.
3. Comprobar la viabilidad de las células aisladas luego de ser sometidas a criopreservación.

4. Materiales y Métodos.

4.1 Materiales

A continuación se describen los materiales empleados para la realización de este estudio experimental *in vitro*.

a) Reactivos Utilizados

- P-nitrofenilfosfato (Sigma).
- NBT/BCIP (Promega)
- Colagensas I (Sigma)
- Dispasa tipo II (Sigma)
- Azul de tripán (Gibco-BRL)
- MTS/PMS (Promega)
- Rojo alizarón (Sigma)
- Formaldehido 37% (Merck)
- Glutaraldehido (Merck)
- Dimetilsulfóxido (Sigma)
- Trizol (Ambion)
- Penicilina-streptomina (Hyclone)
- Anforoterecina B (Hyclone)
- B-glicerolfosfato (Sigma)
- Dexametasona (Sigma)
- Transcriptasa reversa con M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)
- NaH_2PO_4
- Bromuro de etidio
- Agua bidestilada Agar Agar (Merck)
- Etanol p.a., Oil Red O (Merck).

- Etanol al 70% (TCL).
- $MgCl_2$ (Winkler)
- KCl,(Winkler)
- NaCl,(Winkler)
- NaH_2PO_4

b) Reactivos para cultivo celular

- Medio de cultivo alfa MEM con glucosa (Gibco-BRL).
- Medio de cultivo DMEM con glucosa (Gibco-BRL).
- Suero fisiológico estéril (Hycloyne)
- Solución Dulbecco's Phosphate Buffered Saline PBS (Merck)
- Solución Tris Buffered Saline TBS (Merck)
- Tripsina (Sigma)

c) Material de Vidrio y Laboratorio

- Micropipetas 10, 20,100 y 1000 μ l.
- Mango de Bisturí N°3
- Hoja de Bisturí
- Fresas de fisura estéril
- Disco carburundum
- Gradilla.
- Cámara de Neubauer
- Balanza analítica.
- Pinzas estéril
- Espátulas.
- Microplaca Desechable para Cultivo Celular de 6,12 Y 24 pocillos

d) Equipos Utilizados.

- Microscopio electrónico de Barrido (SEM) Digital scanning microscope DSM 940 Zeiss. Facultad de Medicina de la U. de Chile.
- Microscopio óptico Nikon Eclipse Ti-S.

- Espectrofotómetro SQ 2800 Single Beam scanning uv/visible.
- RT-PCR Esco Techne-TC-312.
- Incubador Heraeus.
- Probet 12S, Hybridization Oven
- Gabinete de Flujo laminar Nvaire, Clase II A/B3

4.2 Métodos

4.2.1 Toma de muestras dentales.

Las muestras dentales fueron recolectadas en la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile, de acuerdo a los protocolos y consentimientos informados aprobados por el Comité Ético y Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Proyecto FONDECYT 1130342) (Documento Anexo). Los terceros molares sanos fueron obtenidos a partir de pacientes adultos-jóvenes hombres y mujeres entre 18 y 25 años, los cuales fueron informados antes del procedimiento sobre el estudio y en todos los casos el consentimiento informado fue firmado previo a la recolección de las muestras.

Los terceros molares incluidos sanos recolectados debían encontrarse libres de caries, enfermedad periodontal y sin signos radiográficos de lesiones apicales.

Las extracciones fueron realizadas en pabellón, bajo anestesia local y con luxadores y/o elevadores según la condición clínica de la pieza a extraer. Un vez obtenidas las muestras se mantuvieron y fueron transportadas en medio de cultivo alfa- MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B en frío al laboratorio.

4.2.2 Cultivo de Células Mesenquimáticas de Ligamento Periodontal

Bajo campana de flujo laminar, los molares se lavaron 3 veces con 2 ml de PBS con antibióticos (100 U/ml de penicilina/estreptomina, 0,25 mg/ml de anfotericina B). Luego, se extrajo el ligamento periodontal de la zona radicular

media (3 mm del límite amelocementario y 3 mm sobre formen apical) con un bisturí N°3 hoja 15 (Figura 4 A y B).

Los fragmentos obtenidos se cultivaron mediante dos métodos:

Método del explante: Trozos de 1-2 mm de diámetro se depositaron directamente sobre placas de cultivo de 35 mm sin medio de cultivo para permitir que el tejido se adhiriera a la placa, luego de unos minutos se agregó alfa-MEM suplementado con SFB al 20% y antibióticos (Figura 4C). Los trozos de tejido se cultivaron en incubadora a 37 °C y aire con 5 % de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada tres días hasta la formación de una monocapa celular con confluencia de 90-100%, la cual se observó mediante microscopía óptica (protocolo modificado a partir de Seo y col., 2004; Seo y col., 2005).

Método de digestión enzimática: El tejido se incubó en una solución de colagenasa tipo I, con una concentración de 1 mg/ml en medio de cultivo alfa-MEM suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina) y tripsina al 0,25 %. Esta mezcla se incubó en un Roler dentro de una estufa a 37° C durante 15 minutos (Rotisserie). Una vez dissociado el tejido, las células obtenidas se separaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, para luego ser sembradas en placas de cultivo de 35 mm, adicionando medio alfa-MEM suplementado con SFB al 20%, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B (Figura 4D). Las células se incubaron a 37°C a una atmosfera de 5% de CO₂, el medio se reemplazó cada 3 días hasta la formación de una monocapa celular (protocolo modificado a partir de Seo y col., 2004; Seo y col., 2005).

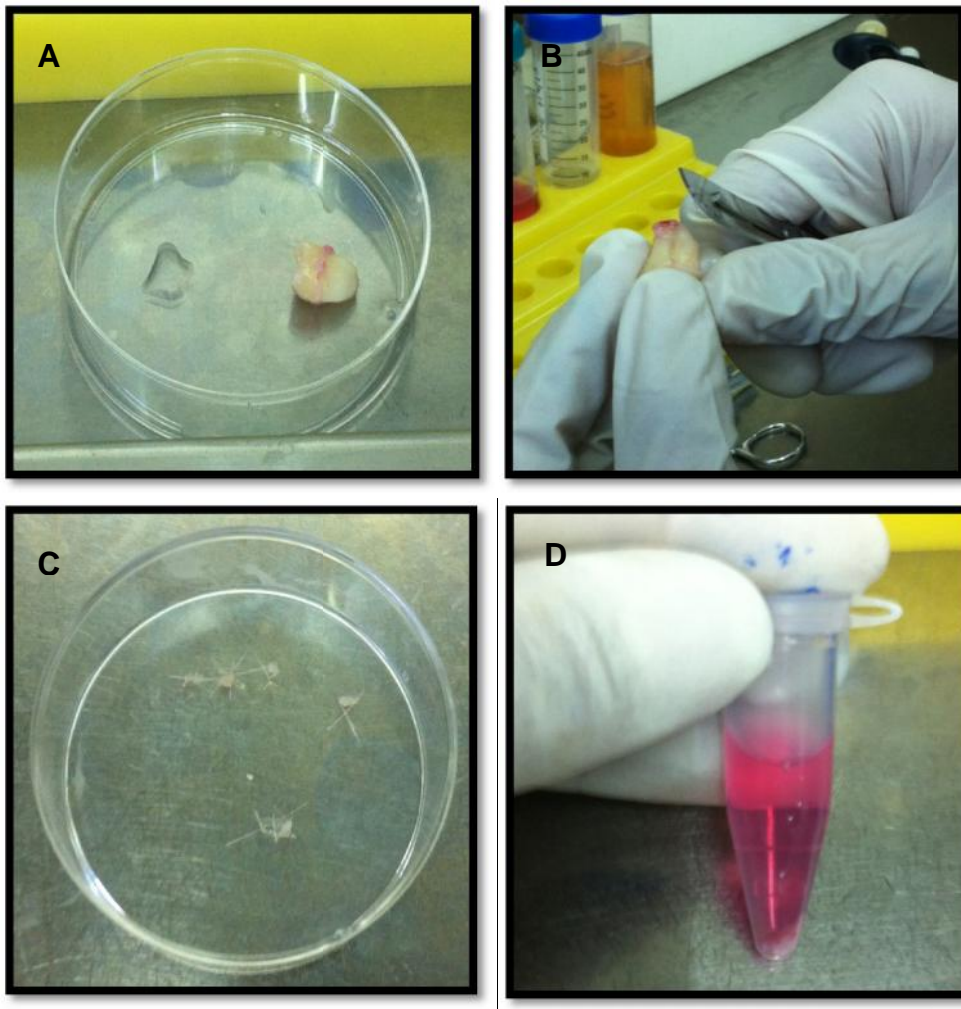


Figura 4 Procedimiento de extracción del LPD para aislamiento celular. Tercer molar incluido posterior a la extracción (A), procedimiento de extracción del ligamento periodontal de la zona radicular media (B), técnica del explante (C), técnica de digestión enzimática (D).

De acuerdo a la literatura, se espera que utilizando la técnica del explante se establezca una monocapa celular luego de 18 días; mientras que mediante la técnica de digestión enzimática, la monocapa se debiera establecer a los 12 días (Seo y cols., 2004; Seo y cols., 2005).

4.2.3 Cultivo de Células Mesenquimáticas de Pulpa Dental

La superficie del diente se limpió con alcohol y el ligamento periodontal fue eliminado con un bisturí estéril n°3 hoja 15. Luego, el molar fue seccionado horizontalmente a nivel del límite amelodentinario con fresas de fisura estéril y disco carburundum, para proceder a extraer con una pinza estéril la pulpa desde la

cámara y el canal radicular (Figura 5 A y B). Todo el procedimiento se realizó bajo irrigación constante con suero fisiológico para evitar la generación de calor excesivo que dañase el tejido pulpar.

El tejido obtenido fue sometido a dos métodos de extracción para el aislamiento celular, al igual que el ligamento periodontal:

Método del explante: El tejido se depositó directamente sobre placas de cultivo. Si el tejido pulpa era de gran tamaño era cortado para obtener fragmentos de aproximadamente 2 mm máximo de ancho/largo y una vez que el tejido se encontró adherido a la placa se agregó medio alfa-MEM suplementado con SFB al 20 %, antibiótico y antimicóticos (Figura 5 C). Posteriormente, se dejó en incubadora 37 °C con una atmosfera 5 % de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada tres días hasta la formación de una monocapa celular o confluencia al 90-100% observado mediante microscopía óptica (protocolo modificado a partir de Seo y col., 2004; Seo y col., 2005).

Digestión enzimática: El tejido se incubó en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa tipo II en medio alfa-MEM suplementado con SFB. La mezcla se incubó en un Roler dentro de una estufa a 37°C durante 60 minutos (Rotisserie).

La reacción enzimática se detuvo agregando DMEM suplementado con 10% de SFB para inactivar las enzima y luego se centrifugó a 1200 rpm por 5 min. Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en medio alfa-MEM suplementado con suero y se centrifugó nuevamente a 1200 rpm durante 7 minutos (Figura 5D). Las células se sembraron en placas de cultivo de 35 mm en medio alfa MEM suplementado con SFB al 20%, antibióticos, antimicóticos y fueron incubadas a 37° a una atmosfera de 5 % CO₂. El medio fue cambiado cada 3 días, hasta el desarrollo de una monocapa celular (Protocolo modificado de Khanna-Jain R y col., 2012).

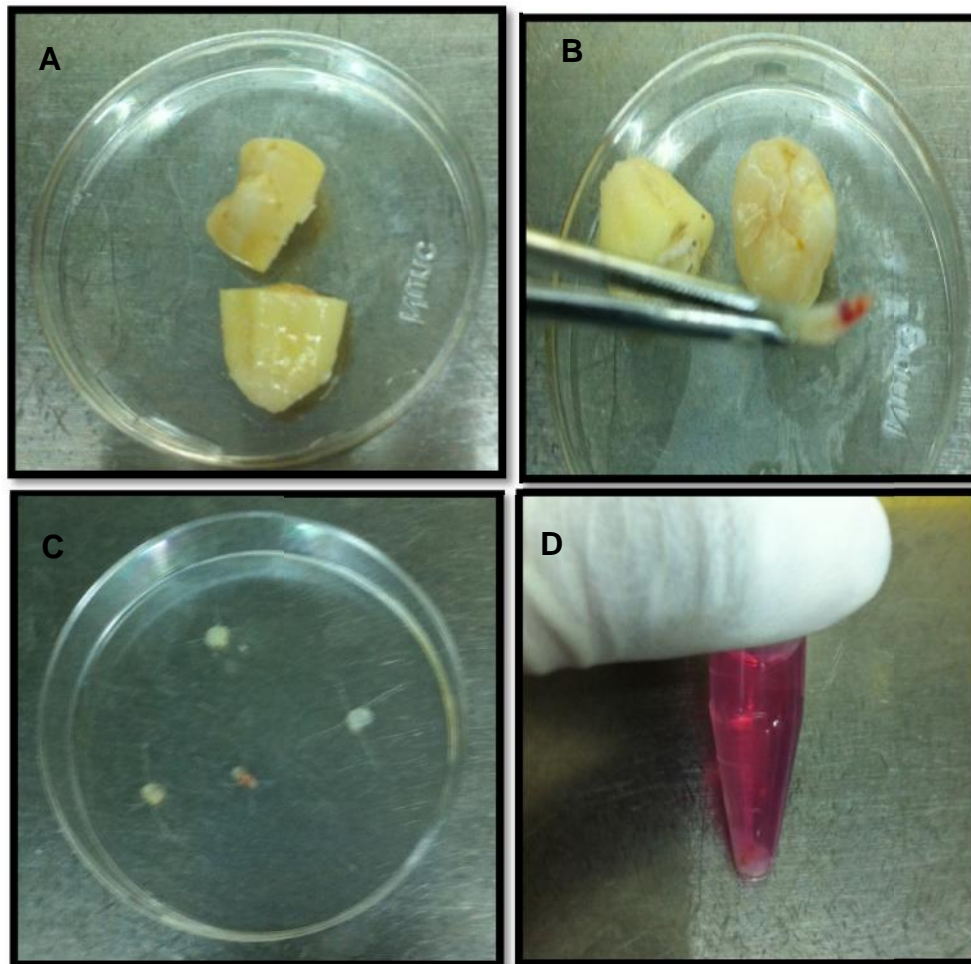


Figura 5. Procedimiento de extracción de pulpa dental para aislamiento celular. Tercer molar seccionado (A), procedimiento de extracción de la pulpa dental (B), técnica de explante (C) y técnica de digestión enzimática (D).

Tanto en los cultivos de ligamento periodontal como en los de pulpa, una vez que se formó la monocapa de cultivo primario, las células se liberaron con tripsina 0,25% y se traspasaron a placas de 60 mm (subcultivo 2) y luego a placas de 100 mm (subcultivo 3). Finalmente, una vez alcanzada la confluencia del 90-100% en subcultivo 3, las células se tripsinizaron y cuantificaron con un hematocitómetro o cámara de Neubauer previo al inicio de los experimentos.

Tanto los cultivos celulares aislados a partir de ligamento como los aislados a partir de pulpa, se evaluaron en cuanto a su **viabilidad**, a su **capacidad de diferenciación osteogénica** y **mantención de sus propiedades** luego de **criopreservación**.

4.2.4 Ensayos de Viabilidad

La viabilidad celular se evaluó mediante la utilización de la coloración vital de exclusión con azul de tripán y Ensayo Colorimétrico MTS.

- **Coloración vital de exclusión con azul de tripán**

El azul tripán es un colorante azoico utilizado para ensayos de viabilidad que permite diferenciar células vivas de células muertas. En las células viables que presentan su membrana intacta no se incorpora el azul de tripán, a diferencia de aquellas células muertas, en las cuales la tinción sí atraviesa la membrana. Al microscopio óptico las células muertas se observan de un distintivo color azul.

El número de células se determinó mediante el recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer) y un microscopio óptico utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{células} / \text{Vol. solución} = \frac{\text{N}^\circ \text{células vivas}}{\text{N}^\circ \text{de cuadrantes contados}} \times \text{factor de dilución} \times 10.000$$

Donde:

-El valor del factor de dilución es 2, debido a que se utilizó una mezcla 1:1 de suspensión celular y tinción azul de tripán.

-El valor del n° de cuadrante es 4.

-El valor de 10.000, es para obtener el número de células por ml. Debido a que el volumen de cada uno de los cuadrantes de la cámara de Neubauer contiene 0,1µl.

- **Ensayo Colorimétrico MTS**

Se utilizó la técnica de reducción de MTS para medir la viabilidad celular según el kit CellTiter 96 AQueus Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, basado en una modificación del ensayo de reducción de MTT (Mosman y col., 1983).

El MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) es bio-reducido por las células viables a través de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, en un producto coloreado llamado formazán que a su vez es soluble en el medio de cultivo y su absorbancia puede ser medida con

un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm. La absorbancia de este producto es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el medio de cultivo (Buttke y cols.,1993).

Para realizar este ensayo, las placas con células se lavaron 1 vez con PBS, luego se agregó 200µl de alfa-MEM suplementado al 10% SFB junto con una mezcla del reactivo MTS en una proporción 20/1 de acuerdo al protocolo del fabricante del kit. Luego se incubó la mezcla durante 1 hora a una temperatura 37° C a una atmósfera de 5% CO₂ y se midió la absorbancia a 492 nm en espectrofotómetro. Cada vez que se realizó la medición se hizo una muestra blanco, que consistía en un pozo sin células pero con el reactivo MTS.

Inicialmente se debió construir una curva estándar de número de MSCs para cada tejido y cada método de cultivo diferente (explante o digestión). Para la curva estándar, en una placa de 24 pozos se sembraron desde 5.000 a 50.000 células en triplicado en medio alfa-MEM suplementado al 10% con SFB, antibiótico (100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 0,25 mg/ml de anfotericina B), y luego se realizó el protocolo MTS. Una vez obtenido las absorbancias de las mismas, se construyó la curva Absorbancia v/s N° de células sembradas, curva de calibración que se utilizó para interpolar las absorbancias de las muestras.

Para evaluar la viabilidad de las células mesenquimáticas dentales aisladas, se sembraron 7.500 de estas células en cada pozo en triplicado en medio alfa-MEM suplementado con 10% de SFB y antibióticos. El medio fue cambiado cada 3 días. Se realizó el ensayo MTS a los días 0, 3, 7 y 9 de cultivo y las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la curva estándar previamente realizada según tejido y método de cultivo.

4.2.5 Diferenciación Osteogénica

Las células obtenidas se cultivaron en un medio osteogénico a base de alfa-MEM suplementado SFB al 10 %, 100 nM de dexametasona, 10 mM - glicerofosfato, 50 µg/ml ácido ascórbico, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 0,25 mg/ml de anfotericina B, con el fin de diferenciar las células al linaje óseo/cemento con producción de nódulos de mineralización *in vitro*. (Rodríguez, JP y cols., 2004; Seo y cols., 2004; Xu y cols., 2009)

La dexametasona estimula la proliferación de las MSCs y permite la diferenciación a un linaje óseo, -glicerofosfato es un fosfato orgánico que da un soporte a la osteogénesis mediante el control de la mineralización y la actividad de los osteoblastos y el ácido ascórbico desempeña un papel en el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y promueve la producción de osteocalcina.

El medio osteogénico se cambió cada 3 días, hasta completar 14 días, tiempo máximo del ensayo. El grado de diferenciación osteogénica se evaluó por medio de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, ensayo NBT/BCIP, detección de depósitos de calcio mediante tinción de rojo alizarín, RT-PCR, y por la detección de nódulos de mineralización mediante microscopía SEM-EDX.

- **Actividad de Fosfatasa Alcalina (ALP)**

La fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (p NPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato. La formación del p-Nitrofenol se determinó fotométricamente y fue proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada. Una vez producida la reacción, el producto fue medido en un espectrofotómetro a 492nm. Para esto, se sembraron 18.000 células por pozo, en placas de 24 (pozos) y una vez que se alcanzó la confluencia se agregó el medio osteogénico a 12 pozos y a los restantes se dejaban como controles en alfa-MEM, ambos suplementados con 10%SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B. Las muestras fueron lavadas con PBS 1X y el medio fue cambiado cada 3 días (Regl y cols., 2002; Rodríguez y cols., 2004).

Las mediciones de la actividad ALP se hicieron a distintos intervalos de tiempo por un período de 8 días, evaluando al día 0, 3,6 y 8.

- **Ensayo NBT/BCIP**

La combinación de NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolyphosphate sal de p-toluidina) produce un intenso precipitado insoluble, negro-púrpura cuando se hace reaccionar con fosfatasa alcalina. Este sustrato insoluble puede ser observado con microscopia óptica y la intensidad de este será proporcional a la cantidad de fosfatasa alcalina de la muestra.

Para este ensayo se sembraron 40.000 células por placas de 35 mm, considerando una muestra control y una diferenciada. Una vez alcanzada la confluencia se procedió a adicionar medio osteogénico a la muestra diferenciada y se mantuvo con alfa-MEM la muestra control, ambas muestras suplementada con 10%SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B. El medio fue cambiado cada 3 días.

El día 8 las muestras se fijaron con ETOH/formaldehído (9:1) bajo campana de flujo durante 1 minuto, luego se lavaron con TBS 3X veces y se procedió a agregar la mezcla de NBT/BCIP. Se incubó durante 1 hora a 37° de temperatura, 5% CO₂ a la oscuridad. Luego se lavaron 2 veces y se procedió a observar las placas al microscopio electrónico (Seo y cols., 2004; Kuznetsov y cols., 2009).

- **Establecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)**

El ensayo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se utilizó para evaluar la capacidad proliferativa y clonogénica de las células troncales mesenquimales en cultivo (Figura 6). Este ensayo consiste en sembrar células a densidades celulares muy bajas comparable con los ensayos de dilución clonal. Para esto, se sembraron 80 células en una superficie de 56,7 cm² en 2 placas; una control y una con medio osteogénico para las muestras de los diferentes tejidos (ligamento y pulpa) y diferentes métodos de cultivo.

Inicialmente ambas muestras fueron cultivadas en alfa-MEM suplementado con 20%SFB y antibióticos, y una vez formada las colonias en ambas placas se procedió a diferenciar con medio osteogénico. La placa control se dejó en el mismo medio en el que inicialmente se cultivó. Finalmente, después de 8 días, las células se fijaron y fueron teñidas con NBT/BCIP para evaluar el número de UFC con presencia de actividad de fosfatasa alcalina, presentes en cada placa (Seo y

cols., 2004; Kuznetsov y cols., 2009).



Figura 6. Imagen de una Unidad formadora de Colonia DPSCs teñida y visualizada al microscopio óptico. (Wang y cols., 2012).

- **Depósitos de cristales de calcio por tinción Rojo alizarín.**

La presencia de nódulos de mineralización en presencia de medio osteogénico se determinó por medio de la tinción con rojo alizarín.

El rojo alizarín o alizarina es un ensayo bioquímico utilizado para medir en forma cualitativa mediante colorimetría la presencia de depósitos de cristales de calcio de una línea osteogénica. Los cristales de hidroxapatita de calcio ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6\text{-[OH]}_2$) y otros cristales de fosfato de calcio, se disponen en cúmulos pequeños o grandes pleomórficos que llegan a medir entre 0,5–10 μm . Tienen gran avidez por el colorante rojo alizarín, el cual se une al calcio y otros cationes.

Las células de las muestras fueron cultivadas en medio osteogénico, suplementado con 10% SFB, antibióticos y antimicóticos durante 14 días. Se lavaron con PBS y el medio se cambió cada 3 días. Una vez cumplido el tiempo de cultivo, las células fueron lavadas dos veces con PBS y luego se fijaron con etanol al 70% en frío por 30 minutos. Luego se adicionó rojo de Alizarín al 0,2% previamente disuelto en NaH_2PO_4 0,01M (pH 4,3) sobre las placas y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron las placas 5 veces con agua bidestilada y luego con PBS durante 10 minutos. Los depósitos de

calcio presentes se observan de rojo intenso al microscopio óptico. (Hiruma y cols., 1998; Seo y cols., 2004).

- **Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).**

Placas de 35 mm fueron sembradas con 40.000 células. Una vez que alcanzaron la confluencia, se diferenciaron con MO como se describió anteriormente por 24 horas (placa diferenciada) y la placa control se cultivó con medio alfa-MEM, suero al 10%, antibióticos y antimicóticos. Al tiempo indicado, las placas fueron lavadas dos veces con PBS y se le agregó 1 ml del reactivo Trizol.

El RNA total se obtuvo de acuerdo al protocolo del fabricante y fue cuantificado espectrofotométricamente. El DNA complementario (cDNA) se obtuvo de acuerdo al siguiente protocolo: 1µg de RNA se sometió a una reacción de transcriptasa reversa con M-MLV Reverse Transcriptase según el siguiente programa de PCR; 5 min a 70°C, 1 hora y 30 min a 42°C y 15 min a 70°C y el cDNA obtenido de la reacción se cuantificó espectrofotométricamente. Para las reacciones de PCR se utilizó 1,5 µl de cDNA, en un volumen total de 20 µl.

Se evaluó la expresión de los siguientes genes osteogénicos Runx-2 y Osterix (Osx); se usó como control de carga la expresión del gen de la subunidad ribosomal 18S (Tabla 1).

Finalmente los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

Genes	Forward	Reverse	Tm °C
18S	5'-GGACACGGACAGGATTGACA-3'	5'-GGACATCTAAGGGCATCACAG-3'	64
OSX	5'-AACCCCCAGCTGCCACCTACC-3'	5'-GACGCTCCAGCTCATCCGAACG-3'	62
RUNX2	5'-TTGTGGGCCGGAGTGGACGA-3'	5'-AGGGAGGGCCGTGGGTTCTG-3'	57

Tabla 1. Partidores utilizados en la amplificación de RT-PCR.

Partidores para amplificar los transcritos de los genes indicados, con las condiciones de TM correspondientes

- **Detección de nódulos de mineralización mediante microscopía SEM.**

Se sembraron 20.000 células por pozo en placas de 35 mm, considerando la presencia de una muestra control y una diferenciada. Una vez alcanzada la confluencia de 70-80% se colocó el medio osteogénico a la muestra diferenciada suplementada con 10%SFB, antibióticos y antimicóticos. La muestra control se mantuvo con medio alfa- MEM, suero al 10%, antibiótica y antimicóticos. Se lavaron con PBS y se cambió el medio cada 3 días. Luego de los 14 días que duró el ensayo, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% y deshidratadas gradualmente con etanol, para luego ser secadas en CO₂ supercrítico. Posteriormente fueron cubiertas con oro-paladio y visualizadas en el microscopio electrónico de barrido.

4.2.6 Criopreservación de las Células Obtenidas.

Las células madre mesenquimáticas que fueron obtenida a partir del ligamento periodontal humano y pulpa fueron criopreservadas utilizando SFB al 90% y dimetilsulfóxido 10%. La temperatura fue disminuida gradualmente usando un ascensor de descenso controlado (Handi-Freeze, freezing tray) adaptado al tanque de nitrógeno hasta su mantenimiento definitivo en nitrógeno líquido a una temperatura de -195°C (Freshney, 1987; Seo y cols., 2005). Posterior al período de criopreservación de 4 semanas, las células descongeladas se cultivaron con alfa-MEM, suero al 10%, antibiótica y antimicóticos durante 7 días El medio se cambió cada 3 días.

Finalmente se comprobó su viabilidad con la tinción de exclusión azul de tripán.

4.3 Análisis estadístico.

Se realizó prueba estadística de Kolmogorow- Smirnov y Shapiro Wiks (inferior a 30 casos) para comprobar la normalidad de la distribución. Asumiendo que la distribución es normal, se aplica de test de ANOVA con post-test de Bonferonni, para ver diferencias de medias entre los grupos a los diferentes días, según sea el caso. Se utiliza un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05\%$). Esto fue aplicado para los ensayos de viabilidad por tinción de exclusión azul de tripán y MTS, y para el ensayo de diferenciación osteogénica por la medición de la actividad de ALP. Se usó el programa Statistical Product and Service Solutions (SPSS)

5. Resultados

5.1 Aislamiento de células madre de tejidos dentales.

En las **Figuras 7 y 8** se muestran imágenes de microscopía óptica de las células madre aisladas desde ligamento y pulpa, respectivamente. Se puede observar que tanto en las células obtenidas de pulpa como de ligamento periodontal, la cantidad de células cultivadas aumenta a medida que aumenta el tiempo de incubación.

En ambos tejidos se observa que al utilizar la técnica de aislamiento por explante existe, inicialmente, una pequeña cantidad de células que proviene del tejido, a diferencia de la técnica de digestión donde la densidad celular inicial es mayor.

En cuanto a la morfología celular, se puede observar en las **Figuras 7 y 8** que tanto las PDLSCs como las DPSCs presentan apariencia fibroblastoide, con una leve diferencia en el tamaño celular donde las DPSCs son más pequeñas. En relación a las PDLSCs no se observan diferencias entre ambas técnicas de aislamiento. En las **Figuras 8A y 8D** se muestra que las DPSCs (cultivo primario) obtenidas por digestión son células más pequeñas, romboidales y con menos prolongaciones fibroblásticas, comparado con una morfología más alargada de las DPSCs obtenidas por digestión. Estas diferencias son casi imperceptibles en las imágenes de cultivos secundarios y terciarios.

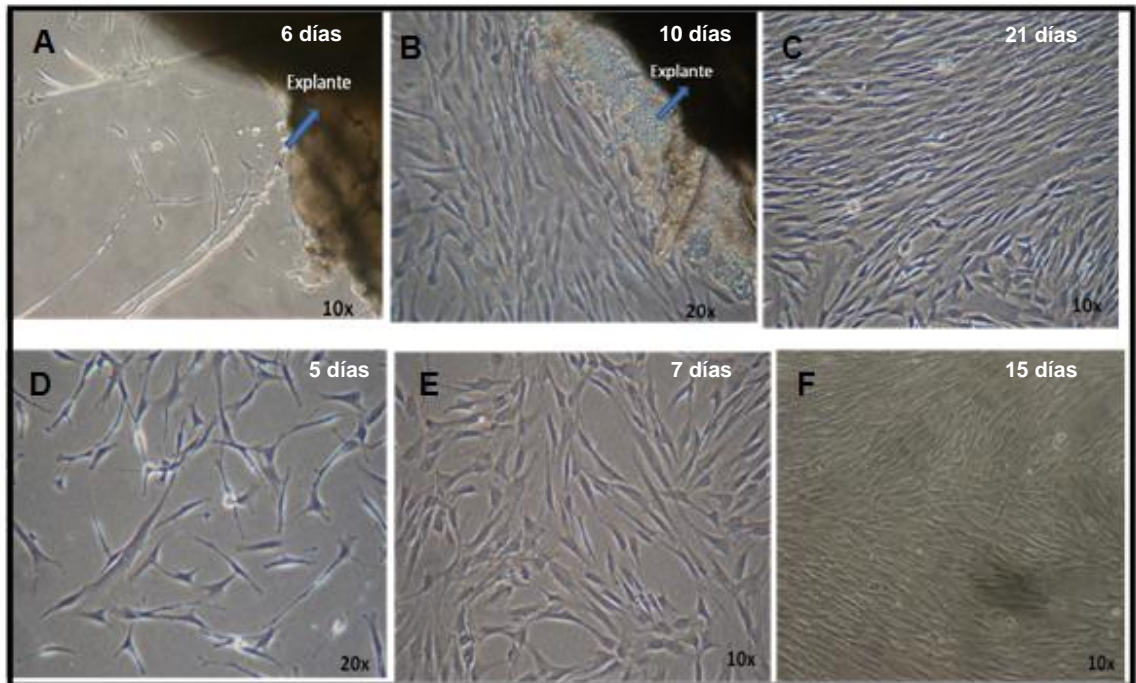


Figura 7. MSCS ligamento observadas por microscopia óptica. MSCS ligamento aisladas mediante método de explante Subcultivo 1 (A-B), Subcultivo 3 (C), PDLSCs aislada mediante método digestión enzimática subcultivo 1 (D), subcultivo 7 (E) y subcultivo 3 (F).

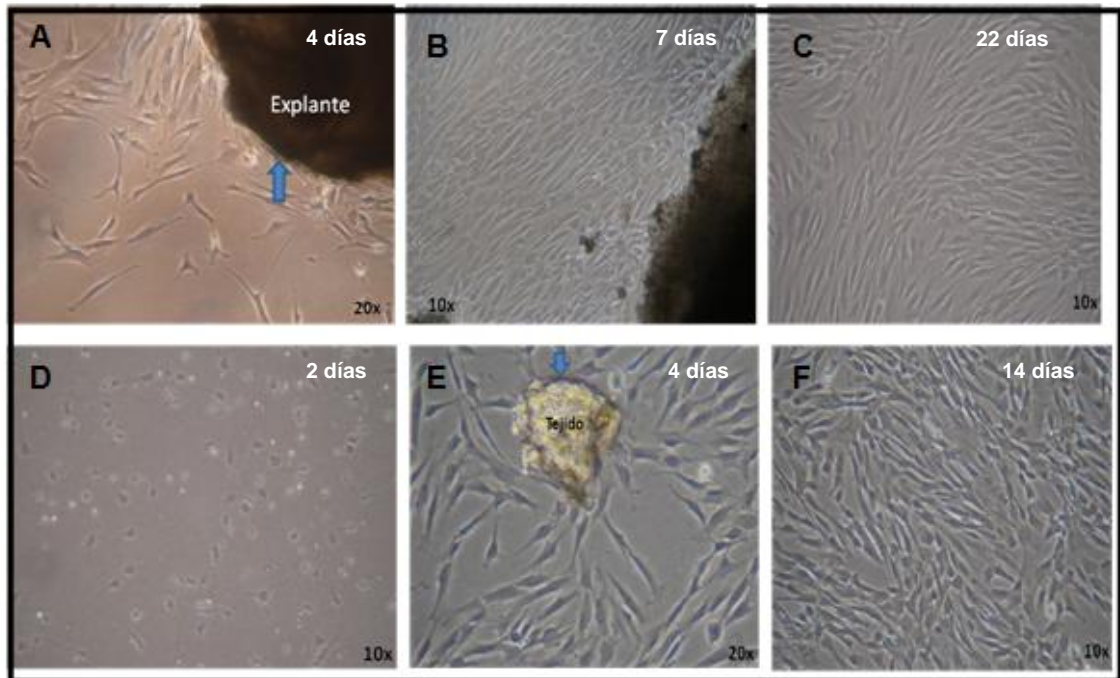


Figura 8. MSCS pulpa observadas por microscopia óptica. MSCS pulpa aisladas mediante método de explante Subcultivo 1 (A-B), Subcultivo 3 (C), DSCs aislada mediante método digestión enzimática subcultivo 1 (D-E) y subcultivo 3 (F).

5.2 Viabilidad celular

5.2.1 Tinción de exclusión Azul Tripán.

En la **Figura 9** se muestra el porcentaje de viabilidad celular de pulpa y ligamento para sus dos métodos de aislamiento, en el día 7 de cultivo con sus respectivas barras de error. Todas las muestras mostraron un porcentaje de viabilidad celular cercano al 90%, sin existir un tejido que presente diferencias significativamente mayores en relación a todos los grupos evaluados. A pesar de esto la muestra de pulpa digestión presenta mayores valores de viabilidad que las muestras de ligamento para ambos métodos de aislamiento y a su vez, la muestra de pulpa explante solo es estadísticamente mayor que ligamento digestión ($p < 0.005$).

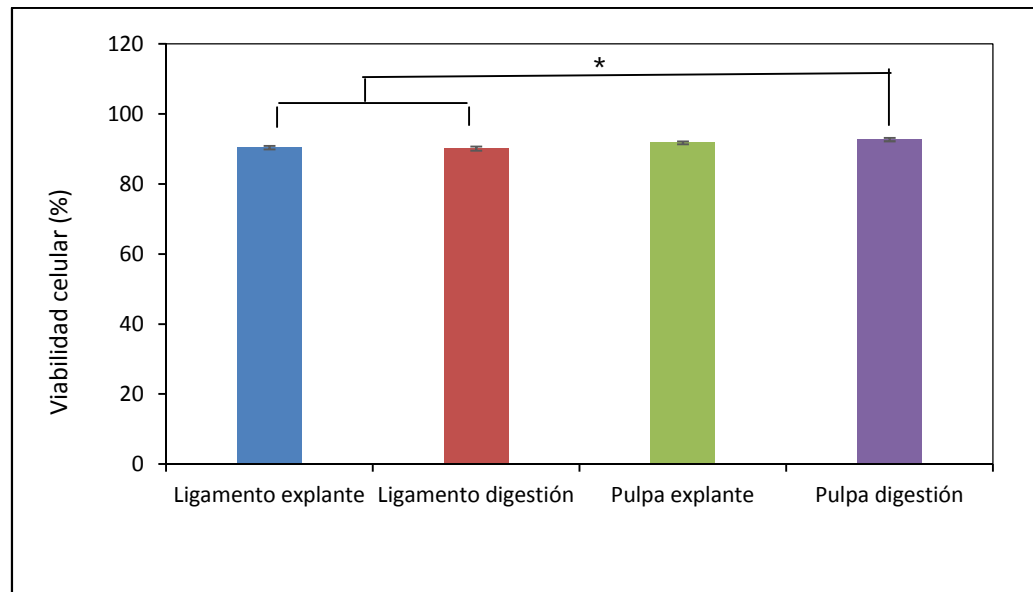


Figura 9. Viabilidad celular de PDLSCs y DPSCs mediante técnicas de explante y digestión. Las células fueron cultivadas durante 7 días con alfa-MEM, 10% SFB, antibióticos y antimicóticos. Las barras representan el promedio de 3 muestras independientes en duplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. (* $p < 0.05$)

5.2.2 Viabilidad Celular según MTS

La **Figura 10**, se grafica el número de células obtenida a los diferentes tiempos de cultivo para las PDLSCs y DPSCs para sus dos métodos de aislamiento, con sus respectivas barras de error.

Al inicio (día 0) la mayor cantidad de células es alcanzada por la muestra de ligamento explante. Para este mismo tiempo, las muestras de ligamento periodontal obtiene los máximos valores, en comparación con las células obtenidas de pulpa dental, para ambas técnicas de aislamiento ($p < 0.05$). A partir del día 3, las poblaciones celulares de las muestras de pulpa dental presenta un mayor número de células, comparado con las de ligamento para las dos técnicas ($p < 0.05$). A su vez para este mismo tiempo, la muestra de ligamento presentan diferencias significativas según el método de aislamiento utilizado ($p < 0.05$). A partir día 7, se observan diferencia en ambos tejidos en relación a la técnica de aislamiento. Las MSCs obtenida de pulpa mediante el método de digestión alcanza mayores valores, y por el contrario las MSCs provenientes pulpa explante los menores. ($p < 0.05$)

Al día 9 el método de aislamiento por digestión, tanto para ligamento como para pulpa fueron las condiciones en que alcanzaron un mayor número de células ($p < 0.05$)

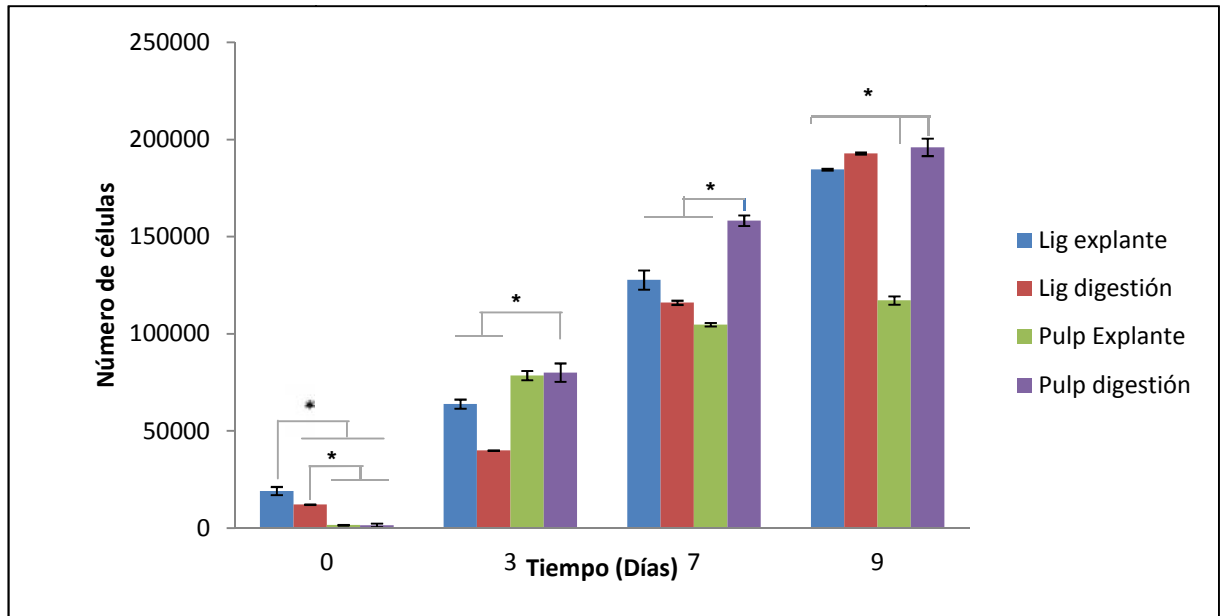


Figura 10. Viabilidad celular medida con MTS PDLSCs y DPSCs.

Las células fueron cultivadas durante 0, 3, 7 y 9 días con alfa-MEM, 10% SFB, antibióticos y antimicóticos. Las barras representan el promedio de 3 muestras independientes en triplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Se indica la estadística en relación a la muestra pulpa digestión, para cada día. (* $p < 0.05$)

5.3 Diferenciación.

5.3.1 Actividad de Fosfatasa Alcalina.

En las **Figuras 11 y 12** se observan los resultados obtenidos para cada muestra en forma independiente, de la actividad de ALP en función del tiempo con sus respectivas barras de error. En general a partir del día 3, todas las MSCs aisladas y cultivadas en medio osteogénico presentan una mayor actividad de fosfatasa alcalina comparado con los controles, a excepción de la muestra pulpa explante ($p < 0.05$).

Las PDLSCs aisladas por la técnica de explante y con medio de diferenciación presentan mayor actividad de ALP a partir del día 7 con respecto a las controles (Fig. 11A), diferencia que se mantiene hasta el final del cultivo ($p < 0.05$). Para la técnica de digestión enzimática (Fig. 11B), a todos los tiempos evaluados las muestras diferenciadas tienen una mayor actividad de fosfatasa alcalina, en comparación con las muestras controles ($p < 0.05$).

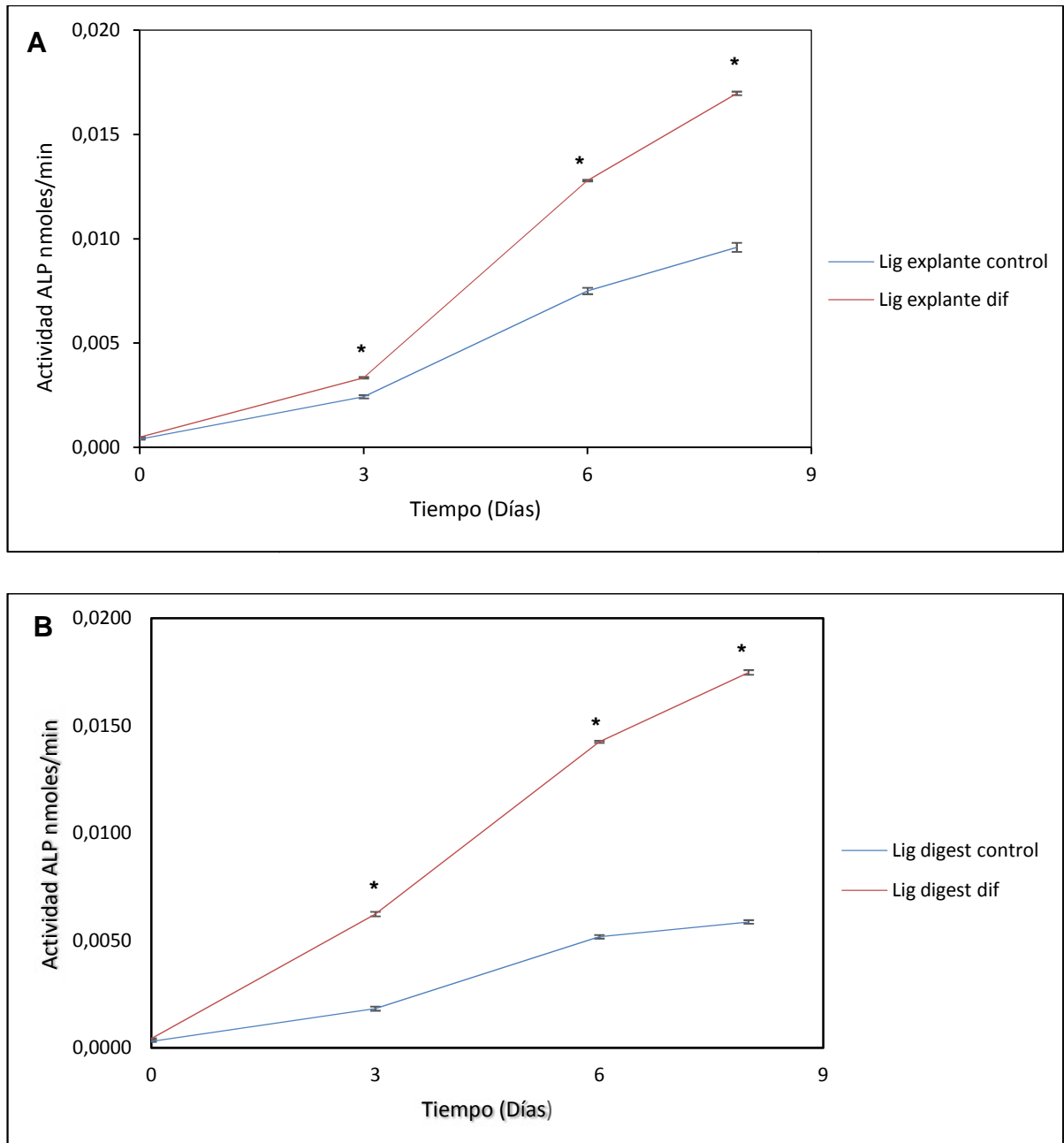


Figura 11. Actividad de Fosfatasa alcalina PDLSCs-explante (A) y PDLSCs-digestión (B). Las células fueron cultivadas durante 0, 3,6 y 8 días con medio basal o diferenciado. Las curvas representan el promedio de 3 muestras independientes en duplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Se indica la estadística entre las condiciones control y diferenciada, para cada día. (* $p < 0.05$)

En la **Figura 12**, las muestras diferenciadas de DPSCs para ambos métodos de aislamiento obtuvieron mayores valores de actividad de fosfatasa

alcalina a partir del día 4 en relación a las muestras controles (sin medio de diferenciación), manteniéndose esta diferencia hasta el día 8.

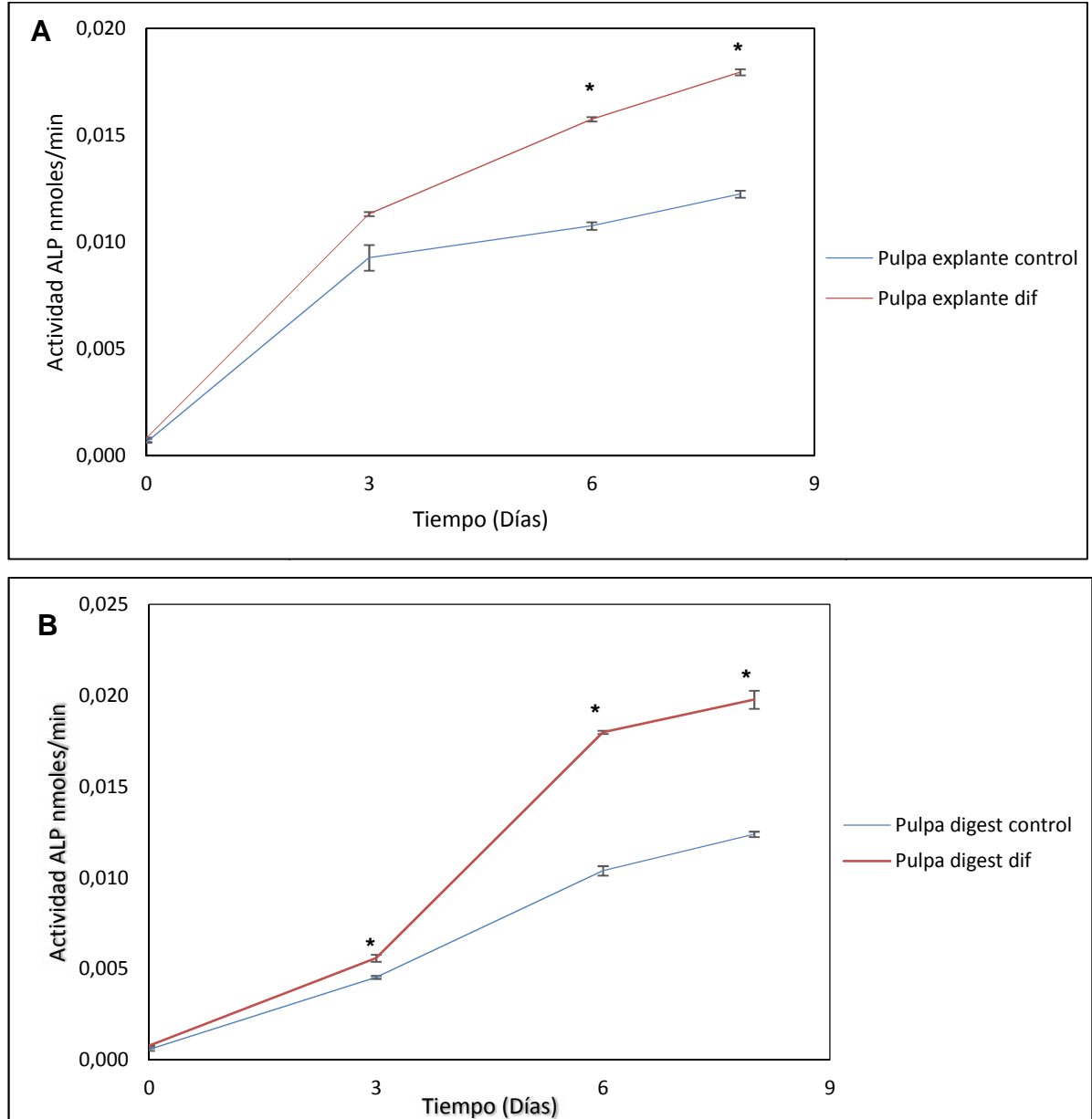


Figura 12. Actividad de Fosfatasa alcalina DPSCs-explante (A) y DPSCs-digestión (B). Las células fueron cultivadas durante 0, 3, 6 y 8 días con medio basal o diferenciado. Las curvas representan el promedio de 3 muestras independientes en duplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Se indica la estadística entre las condiciones control y diferenciada, para cada día. (* $p < 0.05$)

En la **Figura 13**, se comparan la actividad de la fosfatasa alcalina en función del tiempo de las muestras diferenciadas de los diferentes tejidos y sus

técnicas de aislamiento, con sus correspondientes barras de error. Al día 0, las muestras de pulpa presentan una actividad de ALP estadísticamente mayor que las muestras de ligamento, tanto para la técnica de explante como de digestión enzimática ($p < 0.05$). Al día 3 de diferenciación, la muestra de pulpa presentan la mayor actividad enzimática comparado con las otras muestras. A partir del día 6, la muestra de pulpa obtenida por digestión es la muestra que logra los mayores niveles de actividad manteniéndose esta diferencia hasta el final del cultivo.

Para las PDLSCs en el día 8, no hay diferencias en cuanto a la actividad de ALP según el método de aislamiento que se utilice ($p < 0.05$).

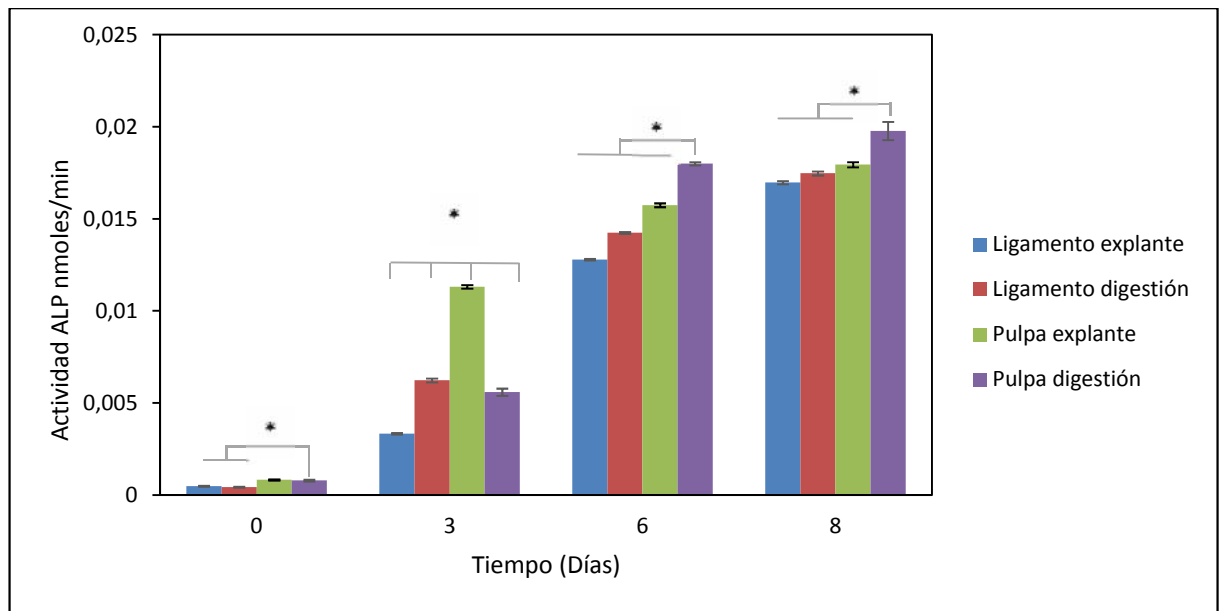


Figura 13. Actividad de fosfatasa Alcalina en presencia de medio osteogénico para PDLSCs y DPSCs. Las células fueron cultivadas durante 0, 3, 6 y 8 días con medio osteogénico. Las barras representan el promedio de 3 muestras independientes en duplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Se indica la estadística en relación a la muestra pulpa digestión, para cada día ($*p < 0.05$)

5.3.2 Tinción NBT

En la **Figura 14** se observan las imágenes, obtenidas mediante microscopía óptica, de la fosfatasa alcalina utilizando de la tinción NBT, en las muestras obtenidas bajo diferentes condiciones. Después de 7 días, todas las

muestras diferenciadas mostraron actividad de fosfatasa alcalina, evidenciada por una tinción púrpura de las células. Las muestras controles no exhiben actividad de fosfatasa alcalina. Al evaluar las técnicas de aislamiento aparentemente según lo observado, no existiría diferencias entre la técnica de explante y de digestión, para ambos tejidos.

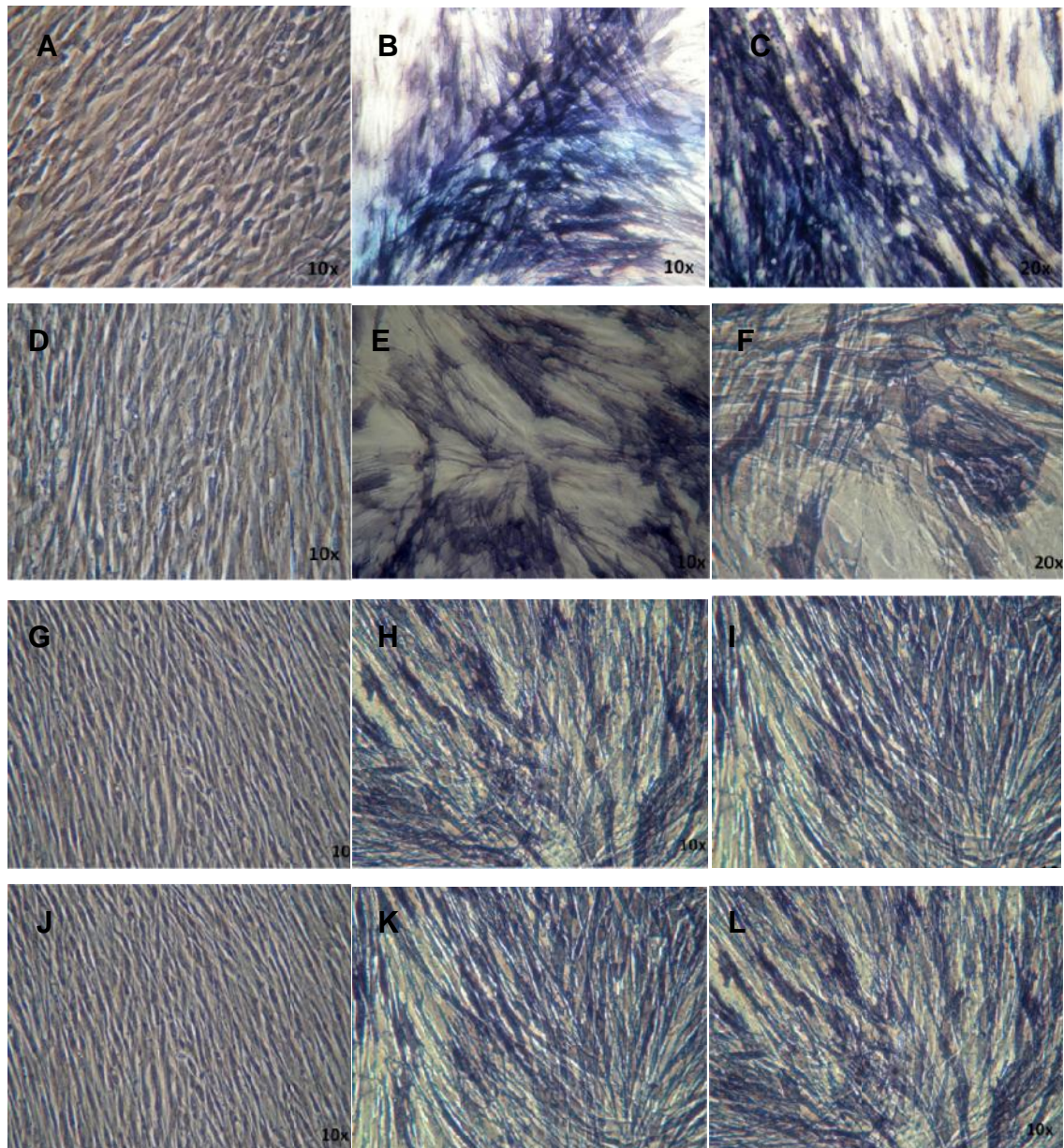


Figura 14. Imágenes de MSCS ligamento y pulpa teñidas con NBT luego de 7 días de diferenciación. Células obtenidas de ligamento periodontal por técnica de explante sin medio de diferenciación (A) y en medio osteogénico (B y C), por técnica de digestión sin medio de diferenciación (D) y en medio osteogénico (E y F). Células obtenidas de pulpa dental por técnica de explante sin medio de diferenciación (G) y en medio osteogénico (H

e I), por técnica de digestión sin medio de diferenciación (J) y en medio osteogénico (K y L).

5.3.3 Unidad formadora de colonias (UFC)

Se evaluó la cantidad de unidades formadoras de colonias (UF) de muestras obtenidas de ligamento y pulpa periodontal, para la técnica de explante y digestión enzimática. Las UFC se diferenciaron durante 7 días y luego fueron teñidas con NBT. En la **Tabla 2** se muestra la cantidad total de colonias formada por cada tejido, tanto en su variable control y diferenciada. No se observan diferencias significativas en el número total de colonias que se obtienen de ambos tipos de tejidos, independiente de la técnica de aislamiento utilizada. En las **Figuras 15 y 16** se puede observar que todas las muestras diferenciadas tienen mayor cantidad de UFC con tinción positiva para fosfatasa alcalina en comparación con las muestras controles. Al cuantificar el número de colonias fosfatasa positiva, se observa que para el caso del ligamento y, al usar la técnica de digestión enzimática, el porcentaje de colonias positivas es mayor comparada con el método de explante (Figura 15). Para el caso de la pulpa dental, al usar la técnica de digestión enzimática se obtiene un mayor porcentaje de colonias positivas en comparación del método de explante (Figura 16).

Al comparar los resultados de ambos tejidos, la mayor cantidad de colonias fosfatasa alcalina positiva la obtuvo con la muestra de pulpa dental aislada por digestión enzimática con el 95% de colonias teñidas, en comparación con la muestra de ligamento aislada por digestión enzimática que solo alcanzó un porcentaje de 83% de colonias teñidas con NBT.

Muestra	N° Total de Colonias	N° Colonias teñidas	N° Colonias No teñidas
Ligamento explante (control)	39	23	16
Ligamento explante (diferenciación)	44	30	14
Ligamento digestión (control)	50	22	28
Ligamento digestión (diferenciación)	47	39	8
Pulpa explante (control)	50	32	18
Pulpa explante (diferenciación)	57	50	7
Pulpa digestión (control)	48	21	27
Pulpa digestión (diferenciación)	66	63	3

Tabla 2. Cantidad de UFC formadas por PDLs y DPLs, para su muestra control y diferenciada. Se indica la cantidad de UFC totales formadas para cada tejido y la cantidad de colonias que fueron no teñidas/ teñidas con NBT. (n=1)

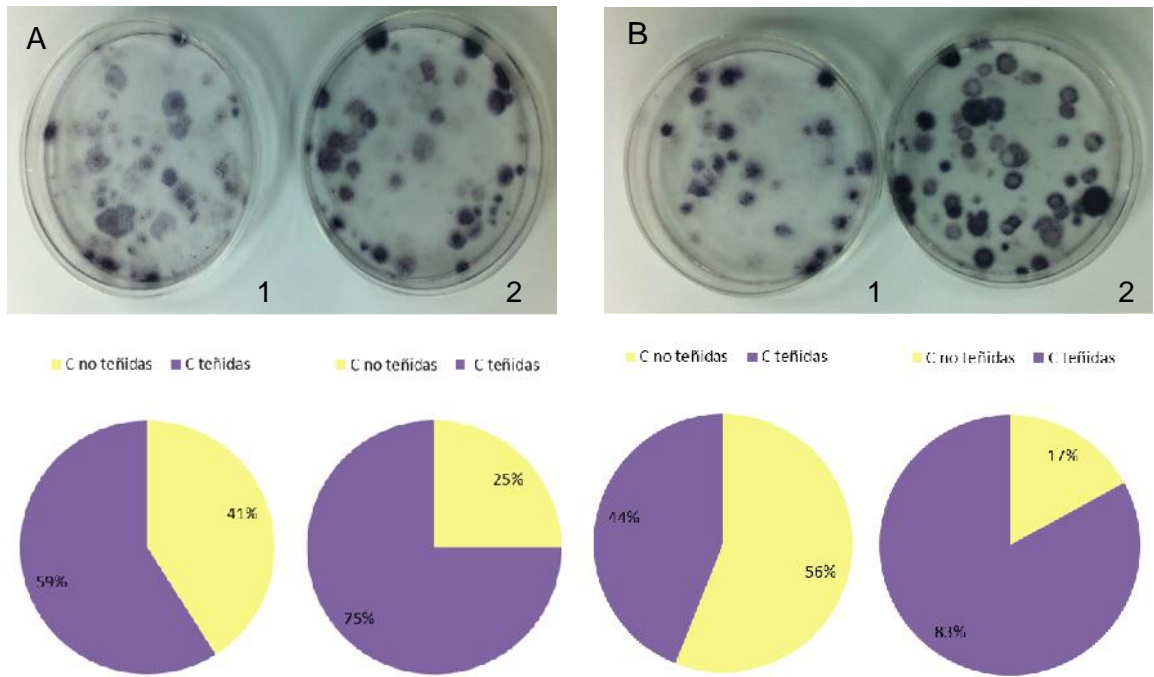


Figura 15. Imágenes de UFC MSCs ligamento y sus correspondientes gráficos.

Las células fueron cultivadas durante 7 días con medio basal o diferenciado. Imágenes UFC ligamento explante (A); muestra control (1) y muestra diferenciada (2). Imágenes UFC ligamento digestión (B); muestra control (1) y muestra diferenciada (2), luego de 7 días con MO y teñida con NBT, con sus correspondientes gráficos colonias teñidas /colonias no teñidas. (n=1)

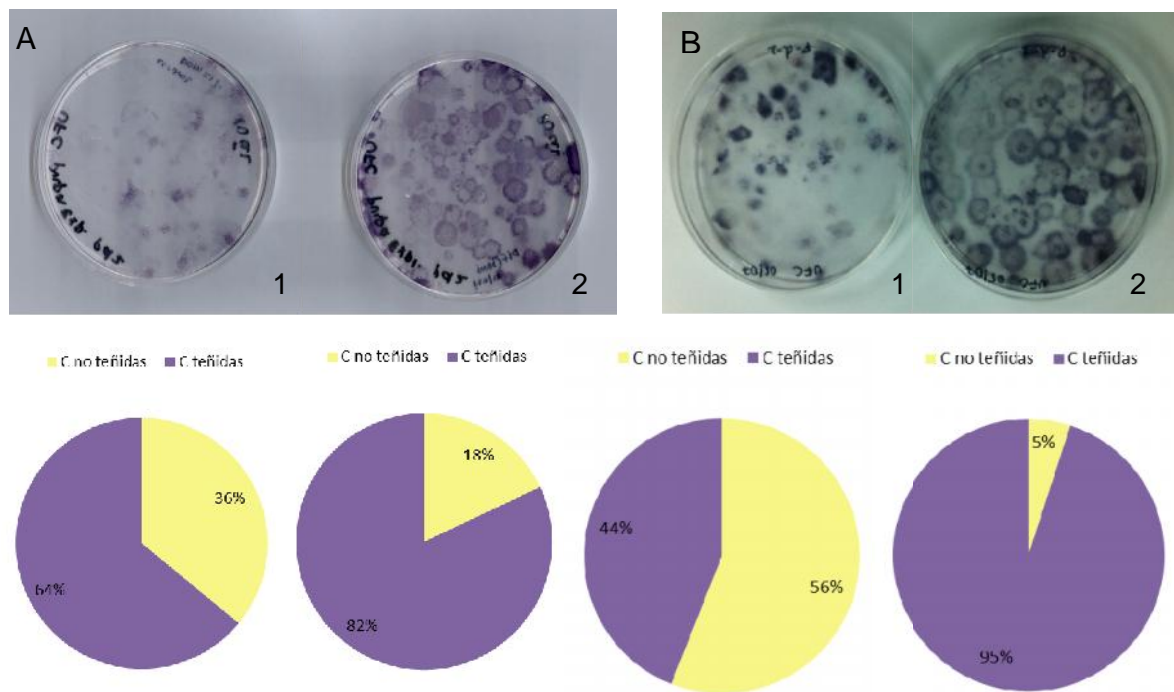


Figura 16. Imágenes de UFC MSCs pulpa y sus correspondientes gráficos.

Las células fueron cultivadas durante 7 días con medio basal o diferenciado. Imágenes UFC pulpa explante (A); muestra control (1) y muestra diferenciada (2),

Imágenes UFC pulpa digestión (B); muestra control (1) y muestra diferenciada (2), luego de 7 días con MO y teñida con NBT, con sus correspondientes gráficos colonias teñidas /colonias no teñidas. (n=1)

5.3.4 Depósito de calcio por tinción rojo alizarín

En la **Figura 17** se muestran las imágenes, obtenidas mediante microscopía óptica, del depósito de calcio por los diferentes tipos muestras, evidenciados por tinción de rojo alizarín. Después de 14 días, todas las muestras diferenciadas mostraron depósitos de cristales de calcio representados por tinciones rojas intensas, a diferencia de las muestras controles. A ese mismo tiempo, las muestras sin diferenciar no muestran depósito de cristales de calcio.

En relación a la producción de mineral, podemos observar que aparentemente no hay diferencias si comparamos las imágenes obtenidas por ligamento y pulpa. En relación a los métodos de aislamiento, la técnica de explante al parecer, muestra mayor cantidad de depósito de cristales comparado con la técnica de digestión tanto para ligamento como para pulpa dental.

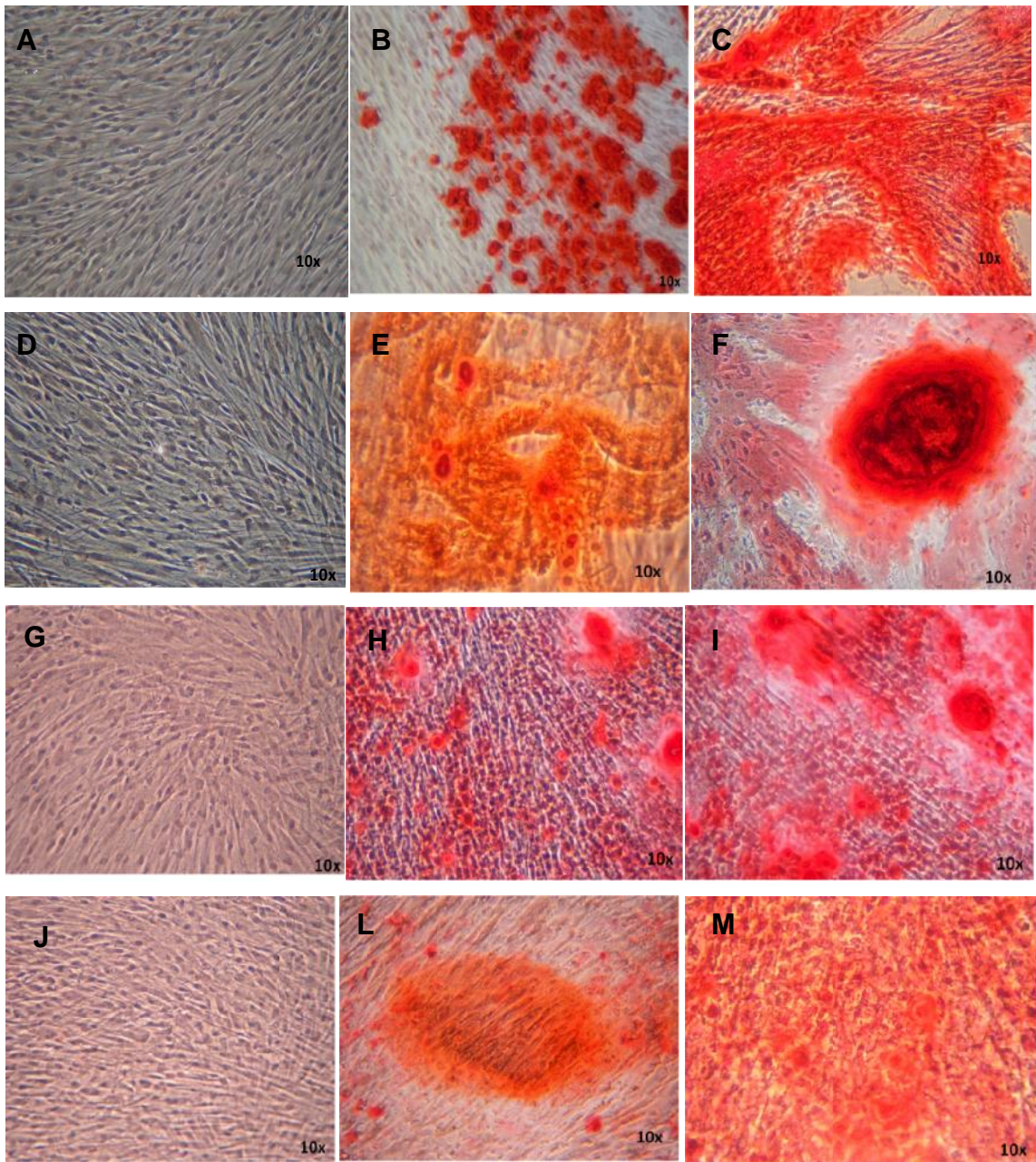


Figura 17. Imágenes de MSCs ligamento periodontal y pulpa, teñidas con rojo alizarín luego de 14 días de diferenciación. Células obtenidas de ligamento periodontal por técnica de explante sin medio de diferenciación (A) y en medio osteogénico (B y C), por técnica de digestión sin medio de diferenciación (D) y en medio osteogénico (E y F). Células obtenidas de pulpa dental por técnica de explante sin medio de diferenciación (G) y en medio osteogénico (H e I), por técnica de digestión sin medio de diferenciación (J) y en medio osteogénico (K y L).

5.3.5 Expresión de genes osteogénicos.

Se estudió la expresión temprana de dos genes relacionados con la diferenciación osteogénica Runx2 y OSX, luego de 24 horas de cultivo en medio osteogénico. Los resultados de la intensidad de los genes en estudio, se normalizaron con respecto a la intensidad del gen 18s.

En las Figuras 18 y 19 se observan los resultados obtenidos de muestras analizadas de ligamento y pulpa para la expresión de los genes mencionados. Todas las muestras diferenciadas aumentaron su expresión al ser comparado con las muestras control.

En ligamento periodontal, para los dos métodos de aislamiento utilizados, el gen que tuvo mayor expresión fue OSX y tanto en explante como en digestión la intensidad de expresión para ambos genes fue similar (Figura 18). Al analizar los resultados obtenidos de las muestras de pulpa.

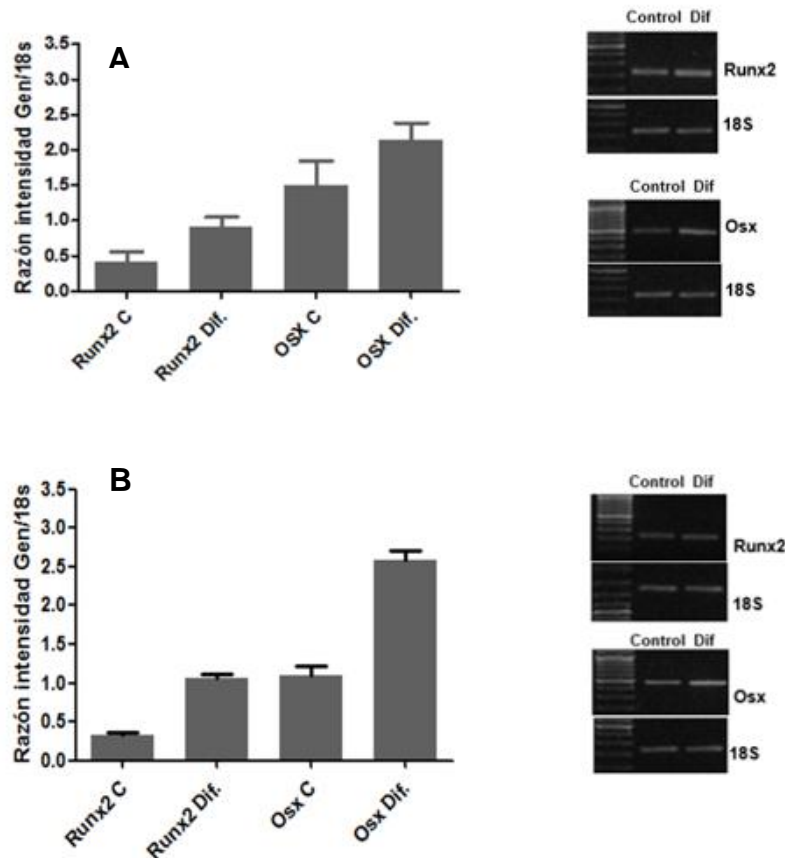


Figura 18. Expresión de genes tempranos osteogénico en PDLSCs.

Las células se cultivaron 24 horas en medio de diferenciación osteogénico. Se midió la expresión de Runx2 y OSX durante este tiempo tanto para una muestra diferenciada como para una muestra control (medio basal). Los resultados obtenidos fueron graficados a partir de la intensidad obtenida para el gen, normalizada contra el endógeno (gen 18s) para PDLSCs-explante (A) y PDLSCs- digestión (B). (n=2)

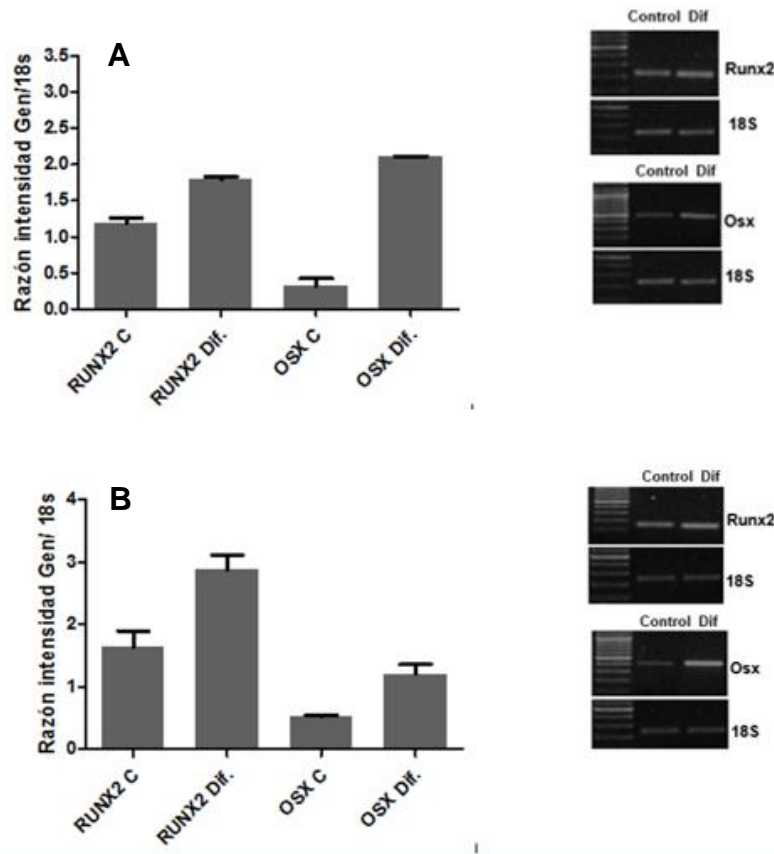


Figura 19. Expresión de genes tempranos osteogénico en DPSCs.

Las células se cultivaron 24 horas en medio de diferenciación osteogénico. Se midió la expresión de Runx2 y OSX durante este tiempo tanto para una muestra diferenciada como para una muestra control (medio basal). Los resultados obtenidos fueron graficados a partir de la intensidad obtenida para el gen, normalizada contra el endógeno (gen 18s) para DPSCs-explante (A) y DPSCs-digestión (B). (n=2)

5.3.6 Análisis por microscopía electrónica de barrido.

En las **Figuras 20 y 21** se muestran imágenes obtenidas de microscopía electrónica de barrido SEM, de muestras cultivadas en medio osteogénico durante 14 días. En todas las muestras analizadas hay presencia de nódulos de mineralización, siendo estos mayor en las muestras obtenidas de pulpa dental

(Figura 20) en comparación con las de ligamento periodontal (Figura 21). Al comparar entre los métodos de aislamiento, se puede observar que en ligamento periodontal la cantidad de cristales y tamaño de los mismos es mayor cuando las células se obtienen por el método de digestión enzimática. En el caso de la pulpa dental, la cantidad de cristales es similar para ambos métodos de aislamiento, aparentemente un poco mayor para explante.

En cuanto al tamaño de las agrupaciones de cristales, en las muestras obtenidas de pulpa se observan cristales más grandes ($8\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ / $10\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m}$), que los observados en las muestras de ligamento ($3\ \mu\text{m} \times 2.5 / 4.5\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$).

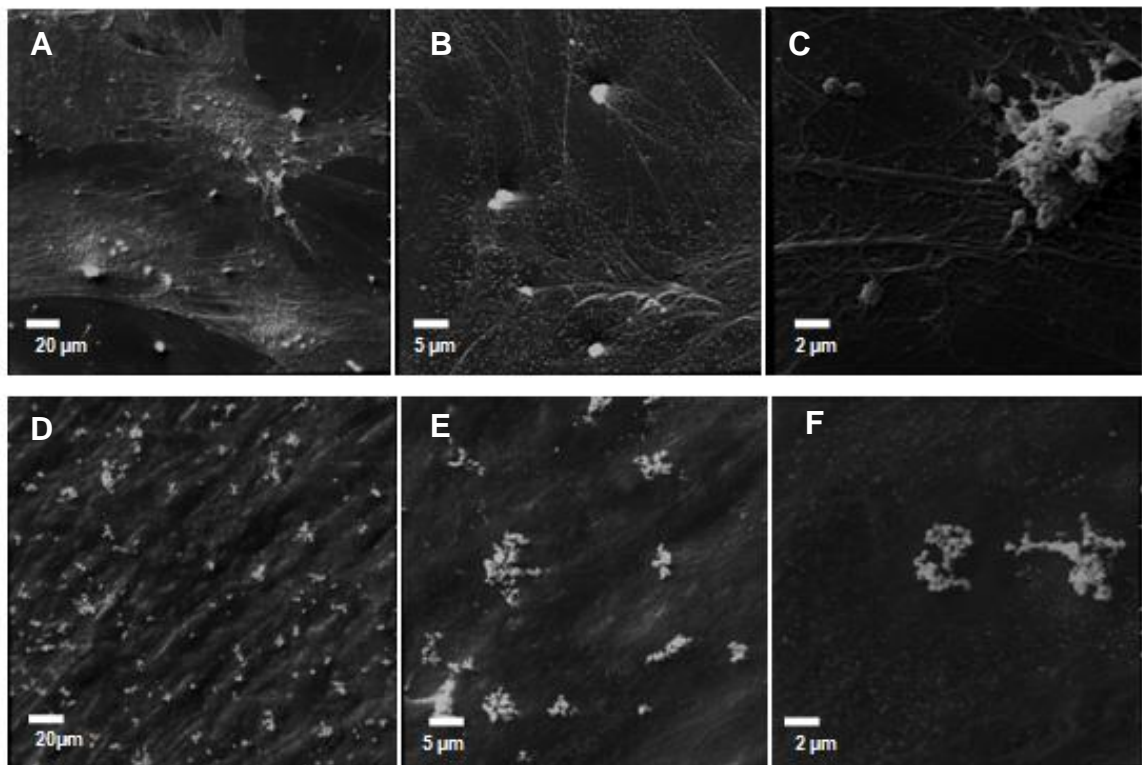


Figura 20. Microscopia SEM de PDLSCs.

Las células fueron cultivadas durante 14 días con medio basal o diferenciado. Imágenes obtenidas de PDLSCs aisladas mediante el método de explante (A-B-C), imágenes obtenidas de PDLSCs- digestión (D-E-F), después de 14 días de diferenciación con medio osteogénico. (n=2)

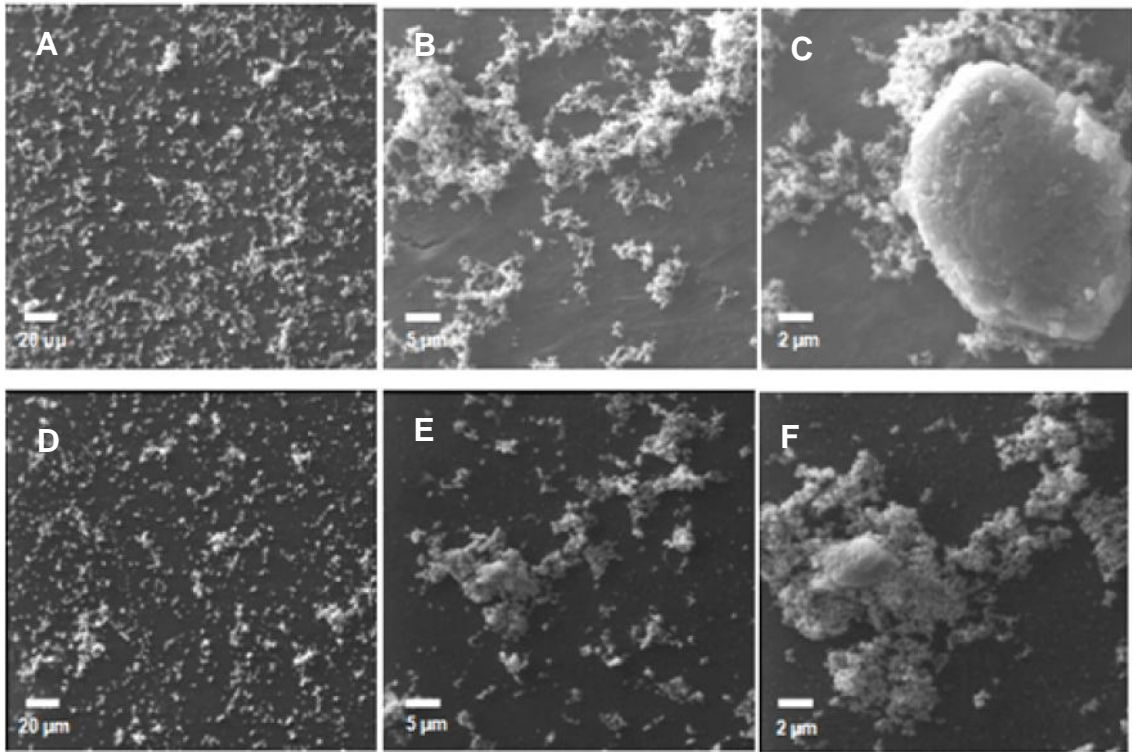


Figura 21. Microscopia SEM de DPSCs.

Las células fueron cultivadas durante 14 días con medio basal o diferenciado. Imágenes obtenidas de DPSCs aisladas mediante el método de explante (A-B-C), imágenes obtenidas de DPSCs aisladas mediante el método de digestión enzimática (D-E-F), después de 14 días de diferenciación con medio osteogénico. (n=2)

5.4 Criopreservación

En la **Figura 22** se observa la viabilidad celular de las muestras que fueron sometidas a criopreservación durante 4 semanas. Todas las muestras obtuvieron valores cercanos al 85%, siendo las de pulpa aquellas que presentan mayores porcentajes de viabilidad en relación a las muestras obtenidas de ligamento, para ambas técnicas de aislamiento ($p < 0.05$).

Adicionalmente se compara la viabilidad celular obtenida previa al proceso de criopreservación y posterior a este. Las diferencias entre los valores de viabilidad no fueron estadísticamente significativos para todos los tejidos, a excepción de la muestra de pulpa digestión ($p < 0.05$).

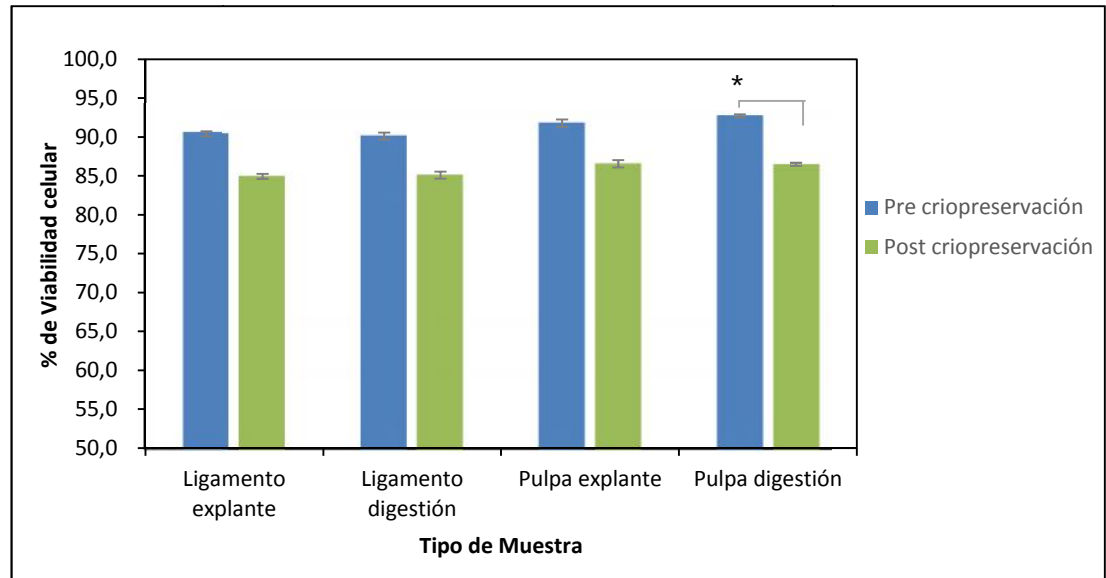


Figura 22. Viabilidad PDLSCs y DPSCs valores obtenidos antes y después de la criopreservación.

Las células fueron cultivadas 7 días previos al proceso de criopreservación y luego de 4 semanas después de la criopreservación con alfa-MEM, 10% SFB, antibióticos y antimicóticos. En ambos casos se midió la viabilidad con Tinción de exclusión azul de tripán. Las barras representan el promedio de muestras independientes en duplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar (* $p < 0.05$).

6. Discusión

El aislamiento y cultivo de células madre a partir de tejidos dentales es un pilar de gran importancia en la Ingeniería de Tejidos. Se han estudiado diferentes fuentes de obtención de células madre a partir de tejidos dentales, entre los que se encuentra pulpa dental de dientes permanentes y dientes temporales, folículo dental, ligamento periodontal y papila apical radicular. Sin embargo, pocos estudios han comparado y definido qué tejido presenta mejores características para ser utilizado en terapias regenerativas. Con este fin en este trabajo se evaluaron y compararon las características de viabilidad y capacidad de diferenciación osteogénica de PDLSCs y DPSCs de terceros molares incluidos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el aislamiento por digestión enzimática y explante, aplicado tanto a tejido de pulpa dental como también de ligamento periodontal resultan en valores de viabilidad cercanos al 90% por lo que representan una forma efectiva de obtención de células para cultivo (Figura 9). Sin embargo, al momento de su extracción una de las ventajas que presenta la obtención de tejido pulpar por sobre la obtención de ligamento periodontal, es la mayor cantidad de tejido que es posible obtener a partir del primero. El ligamento periodontal recolectado desde los terceros molares extraídos es de una menor masa y volumen que la pulpa, y su cantidad es variable entre los pacientes llegando incluso a ser mínimo en algunas muestras. Esto se puede atribuir a que el ligamento periodontal alcanza su maduración y el mayor engrosamiento de sus fibras una vez alcanzada la oclusión funcional. La cantidad de este tejido de soporte en los molares incluidos es dependiente de la actividad proliferativa de los fibroblastos presentes al momento de la extracción, sin alcanzar los valores fisiológicos de 0,2 mm máximos en las piezas erupcionada (Infante C, 2009).

En cuanto a la morfología celular, ambas poblaciones celulares adoptan una morfología fibroblastoide con prolongaciones citoplasmáticas alargadas alineadas y organizadas en monocapas, tal como se ha reportado en la literatura. (Macedo L y cols., 2010). Entre ambos tejidos hay una leve diferencia en el tamaño celular que podría explicar la mayor cantidad de DPSCs obtenidas en las pruebas de viabilidad. Se han reportado en la literatura diferencias morfológicas según el método de aislamiento para DPSCs, en donde se describe una

morfología variada en los cultivos primarios la que no se mantiene en los subcultivos posteriores (Macedo L y cols., 2010). Esta observación fue corroborada en este estudio, ya que las DPSCs de cultivo primario presentaron diferencias en la morfología celular dependiendo si se tratara del método por explante o digestión enzimática. Esto se debe probablemente a que las células obtenidas por el método de explante emergen del tejido adherido a la placa a través de un proceso de migración celular, en contraste con la digestión enzimática que logra la obtención celular producto de la degradación del tejido. Estas diferencias no se observaron en ligamento, donde los protocolos de digestión enzimática aplicados fueron menos agresivos; utilizando menor cantidad de enzima y durante menor tiempo de incubación. Se utiliza este protocolo para digestión enzimática en pulpa dental, debido a que es un tejido obtenido en mayor cantidad, que presenta mayor dureza y por lo tanto su degradación es más difícil de alcanzar en un tiempo determinado al ser comparado con el ligamento periodontal. Lo indicado anteriormente podría explicar una menor digestión enzimática para ligamento, que no provocó tales diferencias morfológicas.

Al analizar el tiempo de proliferación celular del cultivo primario, era esperable por lo descrito en la literatura que la técnica de explante tuviese una velocidad de proliferación inicial menor que la técnica de digestión enzimática (Xu S y cols., 2009). Ratificando lo anterior, las muestras obtenidas por explante de ligamento y pulpa formaron la monocapa inicial en un período de 3 semanas a diferencias de los tejidos que fueron tratados con digestión enzimática en que la monocapa alcanzó igual confluencia a las 2 semanas, tal como ha sido reportado en otro trabajo (Martínez C, 2010). Al analizar la viabilidad celular en periodos de tiempos mayores (9 días) el método por aislamiento mediante digestión enzimática sigue presentando mayor cantidad de células que el método de explante (Figura 12). Otros estudios presentan resultados similares aun comparando ambos métodos luego de un periodo de cultivo de 2 semanas (Huang y cols., 2006). Destaca en los resultados que la muestra de pulpa explante es aquella que obtiene menor cantidad de células al finalizar el cultivo. Esto podría ser atribuido a un mayor tamaño de estas células que permitiría que se alcanzara la confluencia en menor tiempo y con un menor número de células. La existencia de un contacto íntimo celular genera inhibición de la proliferación y/o crecimiento. De esta forma,

las células entran en una fase estacionaria del crecimiento de forma más temprana comparada con las otras células analizadas, generada por un valor constante del número de células a medida que la tasa de crecimiento de las células se iguala con la tasa de muerte celular.

Una de las características de las células madre es su potencial de renovación, habilidad que permite la generación de copias idénticas de sí misma a través de divisiones mitóticas (Bash D y cols., 2004; Mori G y cols., 2009; Zhang Z. 2011). Las poblaciones de PDLSCs y DPSCs demostraron tener esta capacidad de renovación, analizada por la propagación *in vitro* a través de las unidades formadoras de colonias (Tabla 2). Todas las muestras obtenidas de DPSCs, principalmente por la técnica de digestión presentan un mayor perfil de expansión y por lo tanto una mayor capacidad de renovación.

Se investigó el potencial de diferenciación osteogénica en el subcultivo 3 de PDLSCs y DPSCs, a través del cultivo con medio suplementado con dexametasona, fosfatos inorgánicos y ácido ascórbico con el fin de inducir la mineralización *in vitro* (Gronthos y cols., 2000). La fosfatasa alcalina es ampliamente utilizada como marcador osteogénico, ya que se encuentra de forma abundante en los osteoblastos y se eleva durante la formación temprana de hueso. La presencia de esta enzima por lo tanto, es indicativa de diferenciación osteoblástica (Molina C, 2003). Se ha estudiado la importancia de esta enzima en ratones *knock out*, donde los osteoblastos son capaces de diferenciarse normalmente pero no son capaces de iniciar la mineralización *in vitro* (Orimo H, 2010). Al analizar la población de células fosfatasa alcalina positivas presentes en ambos cultivos diferenciados, se observó la presencia de un grupo celular heterogéneo en cuanto al grado de actividad de este marcador. Las muestras de digestión, principalmente la DPSCs, presentan mayor actividad enzimática explicada por la presencia de células osteoprogenitoras secretoras de matriz mineralizada aún desorganizada e inmadura. En los tiempos iniciales de cultivo, las muestras controles de ambos tejidos también presentan una actividad de fosfatasa alcalina positiva. Esto indicaría que las MSCs de origen dental no solo presentan células multipotentes, sino que además, distintas subpoblaciones con diferente potencial de diferenciación. Característica que ya ha sido descritas para las células mesenquimáticas y hematopoyéticas obtenidas de médula ósea (Bask

D y cols., 2004).

Adicionalmente, la tinción NBT muestra de forma cualitativa la actividad de esta enzima después de 7 días de diferenciación, que como era de esperar, por los resultados anteriores, todas las muestras diferenciadas fueron tinción positiva. Mediante el ensayo de UFC se demostró que para la población obtenida de pulpa-digestión, existe una mayor cantidad de colonias capaces de generar precursores osteoblásticos positivos a la tinción NBT (Figura 16). Los resultados en el ensayo de UFC muestran diferencias significativas en la actividad de la ALP entre los tejidos y técnicas de aislamiento, que no fueron observadas al medir esta misma actividad de la ALP mediante su absorbancia.

Tanto las PDLSCs y las DPSCs mostraron nódulos positivos a la tinción rojo alizarín indicativo de la acumulación de cristales de calcio *in vitro* después de 14 días de diferenciación (Figura 17). Aunque en un estudio anterior (Seo B y cols., 2004), con esta misma técnica reportan diferencias en el depósito de matriz mineralizada entre PDLSCs y DPSCs, en el presente trabajo ambas muestras no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, mediante el análisis de la presencia de nódulos de matriz mineralizada mediante imágenes SEM se comprobaron diferencias importantes (Figuras 20 y 21). En concordancia con los resultados obtenidos en la actividad de ALP, las muestras de DPSCs presentan mayor cantidad de nódulos de mineralización y por conclusión mayor cantidad de osteoblastos maduros. Los primeros nódulos de mineralización ocurre cuando los osteoblastos concentran calcio y fósforo en su interior, que posteriormente, eliminan a través de vesículas para precipitar sales de fosfato de calcio y así iniciar la formación de cristales de hidroxiapatita (Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología, 2009). En relación al tamaño de estos grupos de estructuras mineralizadas las DPSCs forman depósitos minerales de mayor tamaño en comparación a los obtenidos por las PDLSCs. Se sabe que los osteoblastos sintetizan la matriz osteoblástica o sustancia osteoide a un ritmo de 1-2 μm por día (Fernández I y cols., 2006). Por lo tanto, la existencia de nódulos cristalinos más pequeños en las PDLSCs se podría atribuir a una secreción más tardía de matriz mineralizada en comparación DPSCs. La menor cantidad de sustancia mineral, nos indica la existencia de una mayor diferenciación de las células osteoprogenitoras hacia células del linaje osteoblásticos.

En cuanto al método de aislamiento para las DPLS no hay diferencias tan evidentes en la cantidad de nódulos. Sin embargo, aparentemente la secreción de matriz y su mineralización está ocurriendo de forma más tardía en el método de digestión ya que se observan acúmulos de minerales menos estructurados y más amorfos que por la técnica de explante.

El método de explante para PDLSCs a pesar de presentar una cantidad similar de precursores osteoblásticos, estos no se diferenciarían en su totalidad a osteoblastos maduros o en su defecto esta diferenciación sería más tardía, razón por la cual hay menor cantidad de depósitos mineralizados.

Durante la osteogénesis, las MSCs entran a un proceso de división asimétrica generando osteoprecursores, que a su vez van progresando hacia diferentes estados de diferenciación formando osteoprogenitores, osteoblastos funcionales y eventualmente osteocitos. Esta progresión hacia los diferentes estados de diferenciación es acompañado por la activación e inactivación de factores de transcripción Runx2/ Cbfa1, Osx y la expresión de diferentes genes marcadores de hueso (Figura 23) (Bash D y cols., 2004).

En este estudio se detectaron en las muestras diferenciadas la expresión temprana de genes Runx2 y Osx indicativo de que las MSCs obtenidas ambos tejidos son capaces de diferenciarse a células osteoprogenitoras. Estudios indican que la expresión de Runx2 es considerado uno de los reguladores más potentes de la diferenciación osteogénica, de tal forma que su expresión es necesaria y suficiente para que ocurra la diferenciación de células mesenquimáticas a osteoblastos (Marie P, 2008; Fernández I y cols., 2006). Por su parte, Osx es considerado un factor de transcripción altamente específico en osteoblastos *in vivo*, siendo su expresión más específica para osteoblastos que Runx2 (Nakashima K y Crombrughe B, 2003; Marie P, 2008). Los resultados basales de la expresión de Osx en las muestras controles son similares para ambos tejidos, sin embargo, para Runx2 es un poco mayor en pulpa lo que se podría explicar debido a la presencia de precursores osteoblásticos previo a la diferenciación, que como ya se ha mencionado en resultados anteriores sería indicativo de una población celular más heterogénea.

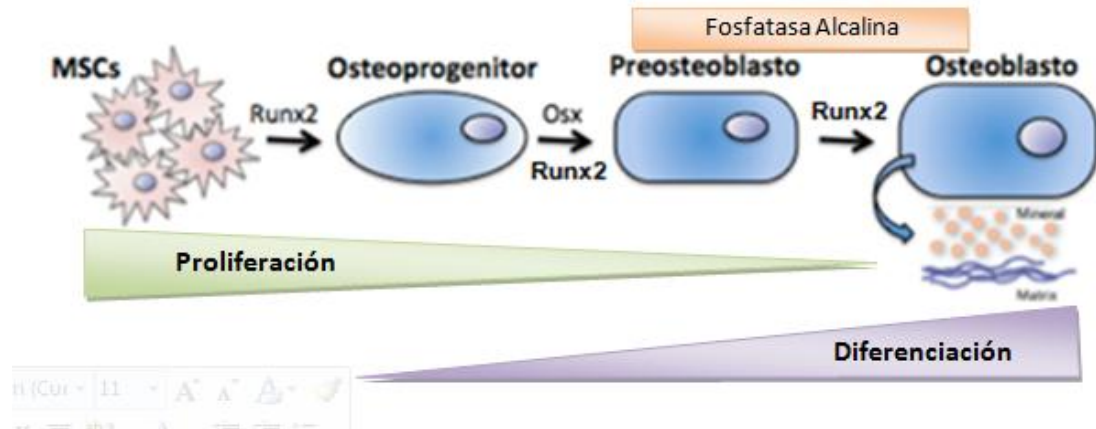


Figura 23. Marcadores de diferenciación presentes en la diferenciación osteogénica
 Imagen que muestra los momentos de expresión de los factores de transcripción Runx2 y Oxs y fosfatasa alcalina. Todos esenciales en el proceso de diferenciación osteogénica.
 (Lacouture M, 2008)

Los datos de la expresión genética obtenidos nos permiten corroborar que el proceso de diferenciación celular a partir de células madre obtenidas de ambos tejidos dentales, está ocurriendo ya en etapas tempranas. Debido a que la cantidad de muestras evaluadas es baja ($n=2$) no se pueden sacar conclusiones más específicas acerca de la diferencia en los valores de expresión encontrados para ambos genes, en los dos tejidos evaluados.

Este trabajo tesis contribuye a la caracterización biológica de las poblaciones de PDLSCs y DPSCs humanas y constituye, a nuestro mejor conocimiento, el primer trabajo que compara la viabilidad celular y diferenciación hacia linaje osteogénico. Los resultados obtenidos indican que las DPSCs representarían una población con mayor potencial de diferenciación osteogénico debido a la presencia de una mayor cantidad de osteoprogenitores capaces de generar osteoblastos maduros que las PDLSCs. Estas diferencias podrían deberse a que la pulpa dental es una población heterogénea de células a las que ya se le han atribuido características secretoras de matriz mineralizada. De ella, derivan los odontoblastos de recambio que ante estímulos cariosos son capaces de proliferar y elaborar una dentina reparadora (terciara) pobremente organizada que se mineraliza, permitiendo tener un rol protector ante estímulos bacterianos (De Marco F y cols., 2011; Didilescu y cols., 2013). Aunque en algunos trabajos se menciona que las DPSCs presentarían una tendencia intrínseca para diferenciarse

a osteoblastos (Didilescu y cols., 2013), no se conocen mecanismos específicos que puedan explicar esta tendencia. Por otro lado estudios *in vivo*, solo describen potencial para generar tejido tipo óseo para las DPSCs (Huang G y cols., 2009; Valdivia R, 2009). Otra ventaja encontrada para el tejido pulpar con respecto al ligamento periodontal, es el mayor número de células que se pueden aislar en un menor tiempo.

En cuanto a las técnicas de aislamiento, según los datos recolectados se puede concluir que la técnica de digestión es más ventajosa, debido a que existen protocolos estandarizados del tipo y cantidad de enzima, es un método más rápido que permite obtener mayor número de células en un menor tiempo y a pesar de que es un proceso más agresivo no daña el potencial de diferenciación de las células osteoprogenitoras. De esta manera los resultados obtenidos comprueban la influencia de la técnica de aislamiento utilizada, en las características de diferenciación hacia el linaje osteogénico de las MSCs aisladas.

Finalmente, la criopreservación de los tejidos es uno de los procesos fundamentales que ha sido muy estudiado por la ingeniería tisular, principalmente relacionado con la conservación en el tiempo de células madre obtenidas de diferentes orígenes. La evaluación de la viabilidad de PDLSCs y DPSCs utilizando dimetilsulfoxido (DMSO) bajo un protocolo de congelación lenta, permite concluir que estas células presentan una viabilidad del 85% posterior a un proceso criogénico y un poco menor en comparación a los resultados obtenidos previo su congelamiento (Figura 22). Está reportado en la literatura que una de las estructuras que sufre mayor daño en los proceso de congelamiento es la membrana celular, la cual durante el proceso puede sufrir la pérdida de fluidez de los componentes lípidos. Esto genera cambios en el comportamiento de la célula la cual es incapaz de rehidratarse al descongelarse, provocándose muerte celular (Ávila L y cols., 2006). Los resultados obtenidos concuerdan con estudios realizados sobre la criopreservación de células mesenquimáticas obtenidas de pulpa y ligamento por separado, que concluían que estas células eran capaces de mantenerse criopreservadas manteniendo su viabilidad y capacidad de diferenciación a diferentes linajes (Papaccio G y cols., 2006; Woods E y cols., 2009; Lee SY y cols., 2010)

Los resultados de este trabajo de tesis permiten confirmar la hipótesis

planteada con respecto al tipo de tejido, indicando que las células madre dentales particularmente aquellas aisladas de pulpa y mediante el método de digestión, presentan mejores propiedades de diferenciación osteogénica, constituyéndose de esta forma en una fuente atractiva para aplicaciones de regeneración ósea en Ingeniería de tejidos.

7. Conclusiones

- Es posible aislar y cultivar células madre mesenquimáticas con capacidad de diferenciación osteogénica de tejidos dentales, particularmente desde pulpa dental y ligamento periodontal.
- Células osteoprogenitoras aisladas de pulpa dental, presentan un mayor potencial de diferenciación al linaje óseo *in vitro*, comparado con las células madre obtenidas de ligamento periodontal, atribuido probablemente a la presencia de una población celular heterogénea más rica en células osteoprogenitoras.
- Con respecto a las técnicas de aislamiento, el protocolo de digestión enzimática parece más apropiado que el método del explante, esto debido a la mayor rapidez proliferativa inicial, mayor presencia de osteoprogenitores y mayor generación de matriz mineralizada *in vitro*.
- Las células madres aisladas de ambos tejidos dentales son capaces de resistir un proceso de criopreservación, sin afectar significativamente la viabilidad celular. Esta característica indica que ambos tipos de células podrían tener potencial para futuras aplicaciones en bancos de células madre.
- Las células madre obtenidas de pulpa dental y mediante el método de digestión aparecen como una alternativa promisorio para aplicaciones en ingeniería de tejidos orientada a la regeneración ósea en odontología.

8. Referencias Bibliográficas.

Adriaens P, Adriaens L (2005). Efectos del tratamiento periodontal no quirúrgico sobre los tejidos duros y blandos. *Periodontology (Ed Esp)* 11:121-145.

Akiyama K, Chen C, Gronthos S, Shi S (2012). Lineage Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from dental pulp, apical papilla and periodontal ligament. *Methods in Mol Biol* 887:111-121.

Atari M, Barajas M, Hernández-Alfaro F, Gil C, Fabregat M, Ferrés Padro E, Giner L, Casals N (2011). Isolation of pluripotent stem cell from human third molar dental pulp. *Histol Histopathol* 26:1057-1070.

Ávila L, Madero J, López C, León M, Acosta L, Gómez C, Delgado L, Gómez C, Lozano J, Reguero M (2006). Fundamentos de la criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57(4):291-300.

Baksh D, Song L, Tuan R (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8:301–316.

Baino F, Vitale C (2011). Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 97(4):514-535.

Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ, Janowski GM (2012). Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective. *Dent Mater* 28(7):703-21.

Buttke T, McCubrey J, Owen T (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazán assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods* 157:233-240.

Carrillo C, Cáceres A, Noriega J (2009). Aumento de volumen óseo mediante injerto en bloque de hueso autólogo. *Revista Kiru* 6(2):103-111.

Chao Y, Wu H, Chan C, Tsai C, Peng C, Wu K (2012). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells for Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J of Biomed and Biotechnol*:1-5.

Chen F, Sun H, Lu H, Yu Q (2012). Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials* 33:6320-6344.

Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M (2006). Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 17(2):136-59.

Coura G, Garcez R, de Aguilar C, Alvarez-Silva M, Magini R, Trentin A (2008). Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontol Res* 43 (5):531–536.

Cruz R, Bascones A (2011). Tratamiento periodontal quirúrgico: Revisión. Conceptos. Consideraciones. Procedimientos. Técnicas. *Av Periodon Implantol*. 23(3):155-170.

Davies JE, Hosseini MM (2000). Histodynamics of endosseous wound healing. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.:1-14.

Davies J (2005). Understanding Peri-Implant Endosseous Healing. *Journal of Dental Education* 67(8):932-949.

DeMarco F, Conde M, Cavalcanti B, Casagrande L, Sakau V, Nör J (2011). Dental Pulp Tissue Engineering. *Braz Dent J* 22(1):3-13.

Didilescu A, Rusu M, Nini G (2013). Dental pulp as a stem cell reservoir. *Rom J Morphol Embryol* 54(3):473-478.

D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, y cols (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater* 18:75-83.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K (2012). Stem cells in dentistry – Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res* 56 (4):229–248.

Estrela C, Alencar A, Kitten G, Vencio E, Gava E (2011). Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspective for Tissues Regeneration. *Braz Dent J* 22(2): 91-98.

Flores R, Palomar M, Torres J (2011). Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev Esp Cirugía oral y Maxilofacial* 55:1-10.

Fernández I, Alobera M, Del Cando M, Blanco L (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Med. oral patol. oral cir.bucal* 11(1).

Fernandez I, Alobera MA, Del Cando M, Blanco L (2006) . Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado. *Histología y fisiología del tejido óseo*.

Freshney, R (1987). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, p. 220, Alan R.Liss, Inc., New York.

Giannoudis P, Dinopoulos H , Tsiridis E (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 (3):20-27.

Gomez de ferrari M, Campos A (2009). *Histología, Embriología e ingeniería tisular Bucodental*. Editorial Médica Panamericana. 3 Edición: 24-25.

Gonzales L, Font A, de Nova J (2011). Investigación de células madre. Actualización. *Gaceta dental* 223:118-129.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron P, Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 (25):13625-30.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher L, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Gehron P, Shi S (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res* 81(8):531-535.

Hernández P, Dorticós E (2004). *Medicina Regenerativa. Célula madre embrionarias y adultas*. Revista Cubana de hematología 20(3). Hernandez y Dorticós, 2004.

Hiruma Y, Inoue A, Shioama A, Otsuka E, Hirose S, Yamaguchi A, Hagiwara H. (1998) Endothelins inhibit the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through the A-type endothelin receptor. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 275:1099-1105.

Honda M, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C(2010). Dental follicles stem cells and tissues engineering. *J Oral Sci* 52(4):541-52.

Huang G, Sonoyama W, Chen J(2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell and Tissue Research* 324(2):225-236.

Huang G, Gronthos S, Shi S (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs.Those from other Source: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res* 88(9):792-806.

Ibarretxe G, Grende O, Aurrekoetxea M, García-Murga V, Etxaniz J, Unda F (2012). Neural Crest Stem Cells from dental tissues: A new hope of dental and neural regeneration. *Stem Cells Int*:1-12.

Infante C(2009). Desarrollo dental y estructuras de soporte. In: *Fundamentos para la evaluación del crecimiento, desarrollo y función craneofacial* .Universidad

Nacional de Colombia 9:237-271.

Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz G, Blazsek J y col., (2009). Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physio Pharmacol* 60(7):167-75.

Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T (2010). Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation* 79(2): 74-82

Kawashima N.(2012). Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration?. *Archives of oral biology* :1439-1458.

Khanna-Jain R, Mannerstrom B, Vuorinen A, Sándor G, Suuronen R, Miettinen S (2012). Osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells on -tricalcium phosphate/poly (l-lactic acid/caprolactone) three-dimensional scaffolds. *J Tissues Eng*; 1-13.

Kubo T, Doi K, Hayashi K, Morita K, Matsuura A, Teixeira E, Akagawa Y (2011). Comparative evaluation of bone regeneration using spherical and irregularly shaped granules of interconnected porous hydroxylapatite. A beagle dog study. *J Prosthodont Res* 55 (2):104-9.

Kuznetsov S, Mankani M, Bianco P, Robey P. (2009) Enumeration of the colony-forming units–fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem Cell Research* 2: 83–94

Lacouture M (2008). Optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea. Trabajo de investigación para optar al título de bacterióloga. Universidad de Bogotá.

Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, Tsai SY, Jeng JH, Kawata T, Huang HM (2010). Effects of Cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod* 36(8):1336-40.

Macedo L, Duarte J, Rodrigues I, Ayrton O, Macedo M, Pocas-Fonseca M (2010). Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent teeth pulp. *Braz J Oral Sci* 9(4):427-433.

Madriz P (2010). Células madre: fuente no embrionaria accesibles. *Medicina Legal de Costa Rica* 27 (2):35-46.

Magallanes M, Carmona B, Álvarez M (2010). Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Revista Odontológica Mexicana* 14(1):15-20.

Marei MK, Nouch SR, Saad MM, Ismail NS.(2005) Preservation and Regeneration of Alveolar Bone by Tissue-Engineered Implants. *Tissue Eng* 11:751-67.

Martínez C (2010). Estudio de la función de la vía de señalización Shh/Gli en los procesos de proliferación y diferenciación de células del ligamento periodontal humano (Tesis doctorado), U de Chile Facultad De Ciencias.

Martínez C, Smith PC, Rodriguez JP, Palma V (2011). Sonic hedgehog stimulates proliferation of human periodontal ligament stem cells. *J Dent Res* 90(4); 483-8.

Minsal (2003). Resultados I Encuesta Nacional de Salud 2003. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/invest/ENS/InformeFinalENS.pdf>. Consultado en Diciembre de 2012.

Molina C (2003). Marcadores bioquímicos del remodelado óseo. *Rev Metab Óseo Min* 1(3):91-98.

Mori G, Brunetti G, Oranger A, Carbone C, Ballini, Lo Mazio L, Colucci S, Mori C, Grassi F, Grano M (2011). Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci* :0077-8923.

Mosmann T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.

Munevar J, Becerra A, Hernandez A (2005). Biología de las células stem. *Nova-Publicación Científica* 3(3):1-120.

Nappe C, Baltodano C (2013). Regeneración ósea guiada para el aumento vertical del reborde alveolar. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* 6(1):38-41.

Navarro MA (2009). Conceptos Actuales sobre el Complejo Dentino-Pulpar. *Fisiología Pulpar* 6(4).

Nomura Y, Ishikawa M, Yashiro Y, Sanggarnjanavanich S, Yamaguchi T, Arai C, Noda K, Takano Y, Nakamura Y, Hanada N (2012). Human periodontal ligament Wbroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. *Histochem Cell* 137 (6):719–732.

Olate S, De Oliveira G, Jaimes M, Barbosa J (2007). Cicatrización ósea en procedimientos de reconstrucción y colocación de implantes. *Int. J. Morphol* 25(3):649-657.

Olate S, Alister JP, Alveal R, Thomas D, Soto M, Mancilla P, Ceballos M (2007). Hallazgos clínicos y radiográficos de terceros molares con indicación de extracción. Resultados preliminares. *Int. J. Odontostomat* 1(1):29-34.

Orimo H (2010). The Mechanism of Mineralization and the role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch* 77(1);4-12.

Pagni G, Kaigler D, Rasperini G, Avila-Ortiz G, Bartel R, Giannobile WV (2012). Bone repair cells for craniofacial regeneration, *Adv Drug Deliv Rev* 64(12):1310-9.

Papaccio G, Graziano A, D'Aquino R, Graziano M, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G (2006). Long- Term Cryopreservation of Dental Pulp Stem Cells (SBP-DPSCs) and their Differentiated Osteoblast: A Cell Source for tissue Repair . *Journal of cellular physiology* 208:319-325.

Peng L, Ye L, Zhou XD (2009). Mesenchymal Stem Cells and Tooth Engineering. *Int J Oral Sci* 1(1):6–12

Perez M, Lorenti A (2006). Células troncales (stem cell) y regeneración cardiaca. *Medicina* 66 (6); 574-582.

Pineda C, Londoño C (2009). Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. *Revista Ingeniería Biomédica ISSN 1909–9762* 3(5)5; 58-65.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284:143-147.

Prasad DK, Shetty M, Bansal N, Hegde C (2011). Crestal bone preservation: a review of different approaches for successful implant therapy. *Indian J Dent Res* 22(2): 317-232.

Ranganathan K y Lakshminarayanan V (2012). Stem cell of the dental pulp. *Indian Journal of Dental Research* 23(4):558.

Razzouk S, Schoor R (2012). Mesenchymal Stem Cells and Their Challenges for Bone Regeneration and Osseointegration. *J Periodontol* 83(5):547-549.

Reynolds M, Aichelmann-Reidy M, Branch-Mays G (2009). Regeneration of Periodontal Tissue: Bone Replacement Grafts. *Dent Clin North Am* 54(1): 55-71.

Regl G, Neill G, Eichberger T, Kasper M, Ikram M, Koller J, Hinter H, Quinn A, Frischauf AM, Aberge F (2002). Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* 21:8196-8205.

Rezwan K, Chen Q, Blaker J, Boccaccini A (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomater* 27(18):3413-3431.

Rodríguez JP, González M, Ríos S, Cambiázo V. (2004) Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 93(4):721-31.

Rodríguez F, Bueno C, Insausti C, Meseguer L, Ramírez M, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda J (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Interl Endod J* 44(9):800–806.

Rosales R, Ojeda F, Alvarado K (2012). Ingeniería Tisular en Odontología. Revista ADM 19(4):164-167.

Sàndor G, Lindholm T, Clokie C (2003). Bone Regeneration of the Craniomaxillofacial and Dento-alveolar Skeletons in the Framework of Tissue Engineering. Topics in Tissue Engineering (7);2-46.

Sanguino D (2011). Regeneración de tejidos mediante células madre. Gaceta dental 231:94-114.

Sedgley CM, Botero TM (2012). Dental stems cell and their source. Dent Clin North Am 56(3):549-61.

Seo B, Masako M, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Gheon P, Yu C, DDS, Wang C (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. The Lancet 364 (9429); 149–155.

Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Gheon Robey P, Wang C, Shi S (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. The Lancet 364: 149–55.

Seo B, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S (2005). Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. Journal of Dental Research 84(10):907-912. Sharpe P, Cobourne M (2005). Sonic Hedgehog Signaling and the Developing Tooth. Current Topics in Developmental Biology 65: 255-287.

Singh M, Berkland C, Detamore M (2008). Strategies and applications for incorporating physical and chemical signal gradients in tissue engineering. Tissue Eng Part B 14(4):341-366.

Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambaro G, De Angelis, Mancini M, Mitsiadis T, Vivarelli E, Naro F, Filippini, Papacci G (2010). Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. J Cell Mol Med 14(6B):1635-1644.

Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (2009). El hueso y cartílago en crecimiento. Manual de Cirugía y Ortopedia y Traumatología. Vol 1. 2da ed. España. Panamericana:71-73.

Suchánek J, Visek B, Soukup T, El-Din S, Ivancaková R, Mokr J, Aboul-Ezz E, Omran A (2010). Stem cells from human exfoliated deciduous teeth isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. Acta Médica Hradec Kralove 53(2):93-9.

Sujesh M, Rangarajan V, Ravi Kumar C, Sunil Kumar G (2012). Stem Cell Mediated Tooth Regeneration: New Vistas in Dentistry. J Indian Prosthodont Soc 12(1):1–7.

Ulmer F, Winkel A, Kohorst P, Stiesch (2010). Stem Cells -Prospects in Dentistry. Schweiz Monatsschr Zahnmed 120(10): 860-872.

Valdivia R (2009). Obtención y desarrollo de células madre desde tejido dental humano. Rev. Soc. Chil. Odontopediatría 24(2):23-28.

Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K (2012). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. Archives of oral biology 57:1231-1240.

Woods E, Perry B, Hockema J, Larson L, Zhou D, Goebel W. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use (2009). Cryobiology 59(2):150-157.

Xu S, Fu J, Chen J, Xiao P, Lan T, Le K, Cheng F, He L, Shen X, Huang H, Liu P(2009). Development of an optimized protocol for primary culture of smooth muscle cells from rat thoracic aortas. Cytotechnology 61(1-2):65–72.

Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S (2009). Multiple Differentiation Capacity of STRO-1+/CD146+ PDL Mesenchymal Progenitor Cells. Stem Cells Dev. 18: 487–496.

Zhang Z (2011). Bone regeneration by stem cell and tissue engineering in oral and maxillofacial region. Front Med 5(4): 401–413.

9. Anexos

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2012/07

1. Acta de aprobación de protocolo de estudio N° 2012/13
2. Miembros permanentes del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Juan Cortés
Presidente del CEC

Dra. María Angélica Torres
Secretaria CEC

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Dr. Alejandro Escobar
Miembro permanente del CEC

Dra. Karin Lagos
Miembro permanente del CEC

3. **Fecha de Aprobación:** 03/09/2012
4. **Título completo del proyecto:** "Synthesis and evaluation of bioactive nanocomposites based on ceramic nanoparticles and polymers for bone tissue engineering in dentistry"
FONDECYT REGULAR N°1130342 versión 25 de Junio 2012.
5. **Investigador responsable:** Dr. Cristian Covarrubias G., académico del Departamento de Ciencias Básicas y Comunitarias. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
6. **Institución:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile y Fondecyt
7. **Documentación Revisada:**
 - Protocolo versión en inglés del Proyecto : "Synthesis and evaluation of bioactive nanocomposites based on ceramic nanoparticles and polymers for bone tissue engineering in dentistry"
FONDECYT REGULAR N°1130342 versión 25 de Junio 2012.
 - Resumen ejecutivo en español versión 28/08/2012
 - Documentos de Consentimiento informado para Pacientes adultos, para padres de adolescentes y Asentimiento informado versión 3/09/2012
 - Currículo del investigador responsable y de Coinvestigadores

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

- 8. Carácter del estudio y de la muestra:** Estudio experimental en animales y uso de células madres obtenidas a partir de muestras dentarias humanas.

9. Fundamentación de la aprobación ética

Este proyecto busca sintetizar nuevos materiales nanocompuestos con propiedades bioactivas para ayudar a la regeneración ósea. Se le incorporará además al nanomaterial, células madres provenientes del ligamento periodontal de dientes extraídos por indicaciones odontológicas y donados por los pacientes involucrados, en forma libre y voluntaria.

Los investigadores se han comprometido sólo a realizar uso de las células declaradas en el proyecto y a mantener la estricta confidencialidad sobre los datos de los implicados. Hay un procedimiento descrito para manejo y respaldo de los datos. Los donantes serán informados y se realizará un proceso de consentimiento informado, demostrando así que los investigadores están comprometidos con el respeto de la autonomía de los donantes, informando incluso a los jóvenes mayores de 14 y menores de 18 años en su decisión y donación voluntaria.

El ensayo y la efectividad de los diferentes materiales propuestos se realizará en modelo animal rata, donde el investigador principal ha presentado su protocolo al respectivo Comité Ético del Cuidado Animal en Facultad de Medicina de la U. de Chile, aprobación que participará a este Comité.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, aprueba el estudio "Synthesis and evaluation of bioactive nanocomposites based on ceramic nanoparticles and polymers for bone tissue engineering in dentistry" FONDECYT REGULAR N°1130342 versión 25 de Junio 2012.



María Angélica Torres V
DDS, MSc, PhD
Presidente (S) del CEC

C/C.
Investigador Responsable
Secretaría C.E.C.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

(Participantes adultos)

Nombre de Estudio: "SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NANOCOMPOSITOS BIOACTIVOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS CERÁMICAS Y POLÍMEROS PARA INGENIERIA TISULAR ÓSEA EN ODONTOLOGIA"

Investigador Principal: Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo.
Depto. Ciencias Básicas y Comunitarias.
Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Fono: 9781719, E-mail: ccovarru@u.uchile.cl

Nombre del Patrocinante: Facultad de Odontología, Universidad de Chile y FONDECYT

Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Presidente CEC: Sr. Prof. Juan Cortés Araya
Vicedecano Facultad de Odontología de la Universidad de Chile
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Email vicedeca@odontologia.uchile.cl

Nombre del Participante: _____

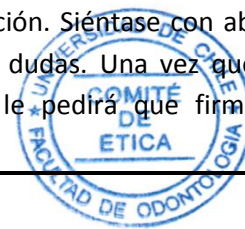
Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- **Información (proporciona información sobre el estudio para usted)**
- **Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)**

Se le dará una copia del Documento completo de Consentimiento Informado

Solicitamos a Usted su colaboración con este estudio. Antes de decidir si colabora o no, debe conocer y comprender los aspectos que se exponen a continuación. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto sobre el cual tenga dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea colaborar, entonces se le pedirá que firme este formulario.

Fecha firma / /



EXPLICACION DEL PROYECTO

El hueso es un tejido de sostén muy importante en el organismo, y en ocasiones se pierde con mucha dificultad para su recuperación, por ejemplo por enfermedades en las articulaciones, por malformaciones, por grandes accidentes y en la boca por enfermedad periodontal, por infecciones o traumatismos. Actualmente existen algunas formas de reconstruir el hueso perdido, pero con algunas limitaciones. Se usan por ejemplo injertos propios o de otros donantes, o hueso seco preparado para injerto o materiales sintéticos compatibles con el organismo humano. La ingeniería de los tejidos, particularmente del hueso, está centrada en desarrollar nuevos biomateriales que permitan regenerar el hueso perdido de manera más similar al que existía originalmente y en un menor tiempo. Esto resulta de gran utilidad cuando se requiere recuperar el hueso antes de poner un implante dental ó rehabilitar personas con enfermedad periodontal.

El objetivo del presente estudio es desarrollar nuevos biomateriales para regenerar hueso. Para esto se usarán unas “nanopartículas” que estimulan la formación de hueso, las que se combinarán con “células madres” generadoras potenciales de hueso; la efectividad de estos biomateriales se evaluará en un modelo animal. Las “células madres” serán sacadas de los restos del ligamento que afirma el diente a su lecho en el hueso, (ligamento periodontal) usando dientes recién extraídos.

Lo hemos contactado porque usted requiere la extracción de algunos dientes que cumplen con los requisitos requeridos para este estudio (la extracción del tercer molar por indicaciones quirúrgicas o protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales); **y quisiéramos solicitar a Usted, la donación de sus dientes extraídos.**

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin recién expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con el donante (con usted). Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes ni con las células madres obtenidas de ellos. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad vigentes.

La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, pero el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

No existe ningún tipo beneficio inmediato por su participación en el estudio, ya que las piezas dentales a utilizar son normalmente desechadas. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito clínico.

Aclaraciones

La colaboración con el estudio es completamente voluntaria, y usted puede dejar de participar libremente.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.

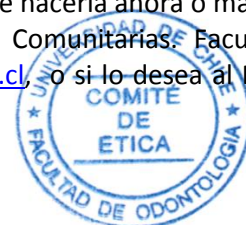
No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.

No recibirá pago por su donación.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, le solicitamos firmar el Formulario de Consentimiento Informado anexo al documento.

Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, contactando al Dr. Cristian Covarrubias (Dpto. Ciencias Básicas y Comunitarias, Facultad de Odontología, U. de Chile. Fono: 9781719, E-mail: ccovarru@u.uchile.cl, o si lo desea al Dr. Juan Cortés presidente del Comité de Ética y aclarar sus dudas.

Fecha firma / /



FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a colaborar con la investigación de creación y evaluación de nuevos materiales para la regeneración ósea. Entiendo que colaboraré donando mis dientes extraídos los que serán utilizados para la extracción de células madres y destruidos una vez tratados y observados. Sé que no existen beneficios para mi persona y que no se me recompensará por participar. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado y su dirección de correo electrónico.

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente colaborar en esta investigación donando mis dientes extraídos.

Nombre del Participante _____

Firma _____

Santiago, ____/____/____

Sección a llenar por el Investigador o su representante:

He explicado al Sr(a)..... la naturaleza de la investigación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI

Fecha

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo (PhD) .

Nombre y Firma del Investigador Principal

Fecha

Fecha firma / /



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

(Padres o Tutores)

Nombre de Estudio: "SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NANOCOMPOSITOS BIOACTIVOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS CERÁMICAS Y POLÍMEROS PARA INGENIERIA TISULAR ÓSEA EN ODONTOLOGIA"

Investigador Principal: Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo.
Depto. Ciencias Básicas y Comunitarias.
Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Fono: 9781719, E-mail: ccovarru@u.uchile.cl

Nombre del Patrocinante: Facultad de Odontología, Universidad de Chile y FONDECYT

Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Presidente CEC: Sr. Prof. Juan Cortés Araya
Vicedecano Facultad de Odontología de la Universidad de Chile
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Email vicedeca@odontologia.uchile.cl

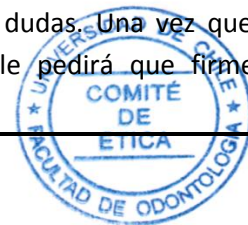
Nombre del Participante: _____

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del Documento completo de Consentimiento Informado

Solicitamos a Usted su colaboración con este estudio. Antes de decidir si colabora o no, debe conocer y comprender los aspectos que se exponen a continuación. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto sobre el cual tenga dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea colaborar, entonces se le pedirá que firme este formulario.



Fecha firma / /

EXPLICACION DEL PROYECTO

El hueso es un tejido de sostén muy importante en el organismo, y en ocasiones se pierde con mucha dificultad para su recuperación, por ejemplo por enfermedades en las articulaciones, por malformaciones, por grandes accidentes y en la boca por enfermedad periodontal, por infecciones o traumatismos. Actualmente existen algunas formas de reconstruir el hueso perdido, pero con algunas limitaciones. Se usan por ejemplo injertos propios o de otros donantes, o hueso seco preparado para injerto o materiales sintéticos compatibles con el organismo humano. La ingeniería de los tejidos, particularmente del hueso, está centrada en desarrollar nuevos biomateriales que permitan regenerar el hueso perdido de manera más similar al que existía originalmente y en un menor tiempo. Esto resulta de gran utilidad cuando se requiere recuperar el hueso antes de poner un implante dental ó rehabilitar personas con enfermedad periodontal.

El objetivo del presente estudio es desarrollar nuevos biomateriales para regenerar hueso. Para esto se usarán unas “nanopartículas” que estimulan la formación de hueso, las que se combinarán con “células madres” generadoras potenciales de hueso; la efectividad de estos biomateriales se evaluará en un modelo animal. Las “células madres” serán sacadas de los restos del ligamento que afirma el diente a su lecho en el hueso, (ligamento periodontal) usando dientes recién extraídos.

Lo hemos contactado porque su hijo o pupilo requiere la extracción de algunos dientes que cumplen con los requisitos requeridos para este estudio (la extracción del tercer molar por indicaciones quirúrgicas o protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales) ; **y quisiéramos solicitar a Usted autorizar la donación de los dientes extraídos.**

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin recién expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con el donante. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes ni con las células madres obtenidas de ellos. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad vigentes. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, pero el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

No existe ningún tipo beneficio inmediato por la participación en el estudio de su hijo o pupilo, ya que los dientes a utilizar son normalmente desechadas. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito clínico.

Aclaraciones

La colaboración con el estudio es completamente voluntaria, y su hijo o pupilo puede dejar de participar libremente.

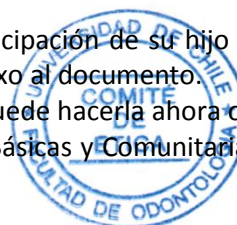
No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.

No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.

No recibirá pago por su donación.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de la participación de su hijo o pupilo, le solicitamos firmar el Formulario de Consentimiento Informado anexo al documento.

Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, contactando al Dr. Prof. Dr. Cristian Covarrubias (Dpto. Ciencias Básicas y Comunitarias. Facultad



Fecha firma / /

de Odontología, U. de Chile. Fono: 9781719, E-mail: ccovarru@u.uchile.cl, o si lo desea al Dr. Juan Cortés presidente del Comité de Etica y aclarar sus dudas.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a colaborar con la investigación de creación y evaluación de nuevos materiales para la regeneración del hueso. Entiendo que colaboraré autorizando la donación de los dientes que serán extraídos a mi hijo o pupilo, los que serán utilizados para la extracción de células madres y destruidos una vez tratados y observados. Sé que no existen beneficios para mi persona o la de mi hijo o pupilo, y que no se me recompensará por participar. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado y su dirección de correo electrónico.

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente colaborar en esta investigación donando mis dientes extraídos.

Nombre del Donante _____

Nombre del Tutor _____

Firma _____

Santiago, ____/____/____

Sección a llenar por el Investigador o su representante:

He explicado al Sr(a)..... la naturaleza de la investigación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI

Fecha

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo (PhD) .

Nombre y Firma del Investigador Principal

Fecha

Fecha firma / /



ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

(Menores de 18 y mayores de 14 años)

Nombre de Estudio: “SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NANOCOMPOSITOS BIOACTIVOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS CERÁMICAS Y POLÍMEROS PARA INGENIERIA TISULAR ÓSEA EN ODONTOLOGIA”

Investigador Principal: Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo.
Depto. Ciencias Básicas y Comunitarias.
Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Fono: 9781719, E-mail: ccovarru@u.uchile.cl

Nombre del Patrocinante: Facultad de Odontología, Universidad de Chile y FONDECYT

Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Presidente CEC: Sr. Prof. Juan Cortés Araya
Vicedecano Facultad de Odontología de la Universidad de Chile
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Email vicedeca@odontologia.uchile.cl

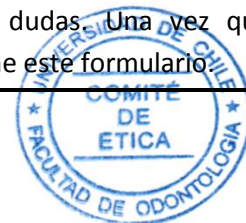
Nombre del Participante: _____

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- **Información (proporciona información sobre el estudio para usted)**
- **Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)**

Se le dará una copia del Documento completo de Asentimiento Informado

Solicitamos su colaboración con este estudio. Antes de decidir si colabora o no, debe conocer y comprender los aspectos que se exponen a continuación. Debe sentirse con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto del cual tenga dudas. Una vez que haya comprendido y si aún quiere colaborar, entonces se le pedirá que firme este formulario



Fecha firma / /

EXPLICACION DEL PROYECTO

El hueso es un tejido muy importante en el organismo, y a veces se pierde, siendo muy difícil recuperarlo, por ejemplo por enfermedades en las articulaciones, por malformaciones, por grandes accidentes y en la boca por enfermedad periodontal, por infecciones o traumatismos. Hoy en día existen algunas formas de reconstruir el hueso perdido, pero con algunas limitaciones. Se usan por ejemplo injertos propios o de otros donantes, o hueso seco preparado para injerto o materiales sintéticos compatibles con el organismo humano. La ingeniería de los tejidos, particularmente del hueso, está centrada en desarrollar nuevos biomateriales que permitan regenerar el hueso perdido de manera más similar al que existía originalmente y en un menor tiempo. Esto resulta de gran utilidad cuando se requiere recuperar el hueso antes de poner un implante dental o rehabilitar personas con enfermedad periodontal.

El objetivo del presente estudio es desarrollar nuevos biomateriales para regenerar hueso. Para esto se usarán unas “nanopartículas” que estimulan la formación de hueso, las que se combinarán con “células madres” generadoras potenciales de hueso; la efectividad de estos biomateriales se evaluará en un modelo animal. Las “células madres” serán sacadas de los restos del ligamento que afirma el diente a su lecho en el hueso, (ligamento periodontal) usando dientes recién extraídos.

Te hemos contactado porque sabemos que necesitas sacarte algunos dientes que cumplen con los requisitos requeridos para este estudio (la extracción del tercer molar por indicaciones quirúrgicas o protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales); **y quisiéramos solicitarte la donación de los dientes extraídos.**

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin recién expuesto y no se guardará ningún registro de su relación contigo. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes ni con las células madres obtenidas de ellos. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad vigentes.

La obtención de las células madres de los dientes no presenta riesgos, ni costos adicionales ni para ti ni para tu familia, pero el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será responsabilidad de tus padres o tutores.

No hay beneficio inmediato por la participación, ya que las piezas dentales a utilizar son normalmente desechadas. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito clínico.

Aclaraciones

La colaboración con el estudio es completamente voluntaria, y puedes dejar de participar libremente.

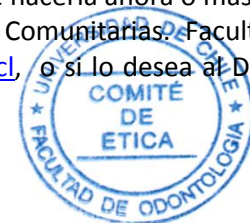
No habrá ninguna consecuencia desfavorable en caso de no aceptar la invitación.

No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.

No recibirá pago por su donación.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de la participación de su hijo o pupilo, le solicitamos firmar el Formulario de Consentimiento Informado anexo al documento.

Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, contactando al Dr. Cristian Covarrubias (Dpto. Ciencias Básicas y Comunitarias, Facultad de Odontología, U. de Chile. Fono: 9781719, E-mail: ccovarru@u.uchile.cl), o si lo desea al Dr. Juan Cortés presidente del Comité de Ética y aclarar sus dudas.



Fecha firma / /

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a colaborar con la investigación de creación y evaluación de nuevos materiales para la regeneración del hueso. Entiendo que colaboraré autorizando la donación de mis dientes que serán extraídos, los que serán utilizados para la extracción de células madres y destruidos una vez tratados y observados. Sé que no existen beneficios inmediatos para mi persona, y que no se me recompensará por participar. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado y su dirección de correo electrónico.

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente colaborar en esta investigación donando mis dientes extraídos.

Nombre del Donante _____

Firma _____

Nombre del Tutor _____

Firma _____

Santiago, ____/____/____

Sección a llenar por el Investigador o su representante:

He explicado al Sr(a)..... la naturaleza de la investigación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI

Fecha

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo (PhD) .

Nombre y Firma del Investigador Principal

Fecha



Fecha firma / /

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las categorías de id se producen con probabilidades iguales.	Prueba de chi-cuadrado de una muestra	1,000	Retener la hipótesis nula.
2	Las categorías de Tipos se producen con probabilidades iguales.	Prueba de chi-cuadrado de una muestra	1,000	Retener la hipótesis nula.
3	La distribución de dia_0 es normal con la media 8.221,583 y la desviación típica 7.369,56.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,296	Retener la hipótesis nula.
4	La distribución de dia_3 es normal con la media 65.557,208 y la desviación típica 17.008,15.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,602	Retener la hipótesis nula.
5	La distribución de dia_7 es normal con la media 126.178,875 y la desviación típica 20.982,52.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,705	Retener la hipótesis nula.
6	La distribución de dia_9 es normal con la media 172.694,500 y la desviación típica 33.811,34.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,058	Retener la hipótesis nula.
7	La distribución de PRE_CRIO es normal con la media 91,275 y la desviación típica 1,18.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,988	Retener la hipótesis nula.
8	La distribución de POST_CRIO es normal con la media 85,817 y la desviación típica 0,86.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,834	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de control dia0 es normal con la media 0,007 y la desviación típica 0,00.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,766	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de control dia3 es normal con la media 0,005 y la desviación típica 0,00.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,766	Retener la hipótesis nula.
3	La distribución de control dia7 es normal con la media 0,010 y la desviación típica 0,00.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,766	Retener la hipótesis nula.
4	La distribución de control dia9 es normal con la media 0,012 y la desviación típica 0,00.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,991	Retener la hipótesis nula.
5	La distribución de exp_dia0 es normal con la media 0,001 y la desviación típica 0,00.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,766	Retener la hipótesis nula.
6	La distribución de exp_dia3 es normal con la media 0,006 y la desviación típica 0,00.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	1,000	Retener la hipótesis nula.
7	La distribución de exp_dia7 es normal con la media 0,018 y la desviación típica 0,00.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	1,000	Retener la hipótesis nula.
8	La distribución de exp_dia9 es normal con la media 0,020 y la desviación típica 0,00.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,766	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Ensayos Viabilidad

	Tipos			
	DP	EP	DL	EL
	Media	Media	Media	Media
dia_0	1465,00	1525,00	12115,67	17780,67
dia_3	80043,33	78606,50	39941,00	63638,00
dia_7	158266,67	104763,50	116047,33	125638,00
dia_9	196072,00	117195,00	192873,00	184638,00
PRE_CRIO	92,73	91,80	90,13	90,43
POST_CRIO	86,60	86,57	85,13	84,97

Comparaciones de medias de columnas^a

	Tipos			
	DP	EP	DL	EL
	(A)	(B)	(C)	(D)
dia_0			A B	A B C
dia_3	C D	C D		C
dia_7	B C D		B	B C
dia_9	B D		B D	B
PRE_CRIO	C D	C		
POST_CRIO	C D	C D		

Los resultados se basan en pruebas bilaterales que asumen varianzas iguales con un nivel de significación ,05. Para cada par significativo, la clave de la categoría menor aparece debajo de la categoría con una media mayor.
a. Utilizando la corrección de Bonferroni, se han ajustado las pruebas para todas las comparaciones por pares dentro de una fila para cada subtabla situada más al interior.

Pulpa Digestión

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	PRE_CRIO - POST_CRIO	6,13333	,58595	,33830	4,67776	7,58891	18,130	2	,003

Pulpa Explante

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	PRE_CRIO - POST_CRIO	5,23333	,68069	,39299	3,54242	6,92425	13,317	2	,006

Ligamento Digestión

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	PRE_CRIO - POST_CRIO	5,00000	,88882	,51316	2,79205	7,20795	9,744	2	,010

Ligamento Explante

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	PRE_CRIO - POST_CRIO	5,46667	,83267	,48074	3,39821	7,53512	11,371	2	,008
SE DIFERENCIA EN CADA TEJIDO ENTRE PRE Y POST									

Ensayos ALP

Pulpa Digestión

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 2	control_dia3 - exp_dia3	-.001066667	.0003055050	.0001763834	-.0018255833	-.0003077501	-6,047	2	.026
Par 3	control_dia7 - expo_dia7	-.007633333333	.000251661148	.000145296631	-.008258494281	-.007008172385	-52,536	2	.000
Par 4	control_dia9 - expo_dia9	-.0073333333	.0005131601	.0002962731	-.0086080938	-.0060585729	-24,752	2	.002

Pulpa Explante

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	control_dia0 - exp_dia0	-.0001939553	.0000301293	.0000173952	-.0002688008	-.0001191099	-11,150	2	.008
Par 2	control_dia3 - exp_dia3	-.0020513273	.0005050919	.0002916149	-.0033060451	-.0007966096	-7,034	2	.020
Par 3	control_dia7 - expo_dia7	-.004995507333	.000213499953	.000123264255	-.005525870619	-.004465144048	-40,527	2	.001
Par 4	control_dia9 - expo_dia9	-.0057036097	.0000248194	.0000143295	-.0057652644	-.0056419550	-398,034	2	.000

Ligamento Digestión

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	control_dia0 - exp_dia0	-.0001240440	.0000406648	.0000234778	-.0002250609	-.0000230271	-5,283	2	.034
Par 2	control_dia3 - exp_dia3	-.0044023540	.0000145624	.0000084076	-.0044385291	-.0043661789	-523,614	2	.000
Par 3	control_dia7 - expo_dia7	-.009073177333	.000109820111	.000063404671	-.009345985612	-.008800369054	-143,100	2	.000
Par 4	control_dia9 - expo_dia9	-.0116110373	.0000641672	.0000370469	-.0117704375	-.0114516372	-313,414	2	.000

Ligamento Explante

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	control_dia0 - exp_dia0	-.0000953337	.0000205294	.0000118526	-.0001463315	-.0000443358	-8,043	2	.015
Par 2	control_dia3 - exp_dia3	-.0009138923	.0000398574	.0000230117	-.0010129035	-.0008148811	-39,714	2	.001
Par 3	control_dia7 - expo_dia7	-.005289399333	.000191318574	.000110457830	-.005764661017	-.004814137650	-47,886	2	.000
Par 4	control_dia9 - expo_dia9	-.0073768877	.0001719521	.0000992766	-.0078040405	-.0069497349	-74,306	2	.000

	Tipos			
	DP	EP	DL	EL
	(A)	(B)	(C)	(D)

exp_dia0	C D	C D		
exp_dia3	D	A C D	A D	
expo_dia7	B C D	C D	D	
expo_dia9	B C D	D		

Los resultados se basan en pruebas bilaterales que asumen varianzas

a. Utilizando la corrección de Bonferroni, se han ajustado las pruebas

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación tip.	Error tip. de la media	diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	control_dia0 - exp_dia0	-,0001939553	,0000301293	,0000173952	-,0002688008	-,0001191099	-11,150	2	,008
Par 2	control_dia3 - exp_dia3	-,0020513273	,0005050919	,0002916149	-,0033060451	-,0007966096	-7,034	2	,020
Par 3	control_dia7 - expo_dia7	-,004995507333	,000213499953	,000123264255	-,005525870619	-,004465144048	-40,527	2	,001
Par 4	control_dia9 - expo_dia9	-,0057036097	,0000248194	,0000143295	-,0057652644	-,0056419550	-398,034	2	,000