



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
LABORATORIO DE HISTO-MORFOLOGÍA ORAL**

“CULTIVO Y APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE PULPARES HUMANAS EN PROCESO REPARATIVO EN MODELO *IN VIVO*. ANÁLISIS DESCRIPTIVO”.

Edgar Fuentes Pino

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

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Soledad Acuña Mendoza

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. María Angélica Torres

Prof. T.M. Cristian Peñafiel Ekdhal

Adscrito a Proyecto CONICYT PAI N.º 79160076.

Santiago - Chile

2021



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
LABORATORIO DE HISTO-MORFOLOGÍA ORAL**

“CULTIVO Y APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE PULPARES HUMANAS EN PROCESO REPARATIVO EN MODELO *IN VIVO*. ANÁLISIS DESCRIPTIVO”.

Edgar Fuentes Pino

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

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Soledad Acuña Mendoza

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. María Angélica Torres

Prof. T.M. Cristian Peñafiel Ekdhal

Adscrito a Proyecto CONICYT PAI N.º 79160076.

Santiago - Chile

2021

*A mi mamá, mi papá y mi hermana...
jamás hubiese recorrido este camino sin el
apoyo incondicional de ustedes.*

*“Lo que era, no es lo que soy.
Y lo que soy, aún no es lo que puedo llegar a ser”*

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo concluye una etapa de mi vida que espero recordar hasta el final de mis días. Una etapa llena de buenos y malos momentos, de alegrías y tristezas, de muchas risas y uno que otro llanto, y no puedo más que agradecer a todos los que me acompañaron desde el primer momento.

Agradezco a mi familia, piedra angular de mi formación personal y profesional. Por confiar en mis habilidades y ser los mejores pacientes que pude tener. Por apoyarme incondicionalmente en cada aspecto de mi vida.

A mis amigos de la U, en especial a Mauricio, Camila, Constanza, Mario, Enrique, Joel, y Laura, por apañar en momentos buenos y malos, por esas conversaciones y risas eternas después de la clínica.

A los docentes y funcionarios que fueron parte de este proceso de formación profesional. Mención especial para Patricio Muñoz y Consuelo Miranda, sin duda los mejores.

A toda la gente que conocí en mi internado. A la Dra. Alarcón y Dra. Zepeda del Hospital San José, por su gran compromiso y dedicación con sus pacientes, por confiar en mis habilidades y ser un gran ejemplo en mi formación profesional; al Dr. Van Lamoen y la Dra. Castillo del Cesfam de Catemu, por esas enseñanzas que no se aprenden en la Facultad; y, por último, a los mejores compañeros de cabaña en Llay Llay: Aylene, Yessi, Javier, Nicolás y Gustavo...Mucho éxito en todo.

Agradezco al equipo de trabajo del Laboratorio de Histo-Morfología Oral. Al Prof. Cristian Peñafiel, a la Dra. María Angelica Torres y a la Dra. Soledad Acuña, por su gran apoyo y compromiso en la realización de este proyecto, por sus enseñanzas en técnicas histológicas y manejo de laboratorio, por confiar en mi desempeño en el cultivo celular y por entregarme habilidades y conocimientos que van más allá de la clínica.

GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN -----	- 6 -
INTRODUCCIÓN -----	- 7 -
MARCO TEÓRICO -----	- 9 -
INGENIERÍA TISULAR -----	10 -
CÉLULAS MADRE-----	12 -
<i>Células madre mesenquimales</i> -----	13 -
<i>Células madre asociadas a tejidos dentarios</i> -----	14 -
CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTARIA -----	16 -
<i>Protocolos de obtención y evaluación del potencial regenerativo de hDPSC</i> -----	18 -
MECANISMOS DE REGENERACIÓN ÓSEA-----	20 -
<i>Osificación intramembranosa</i> -----	20 -
<i>Osificación endocondral</i> -----	21 -
<i>Reparación ósea</i> -----	22 -
MODELOS DE ESTUDIO DE REGENERACIÓN ÓSEA -----	25 -
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS -----	27 -
HIPÓTESIS -----	27 -
OBJETIVO GENERAL -----	27 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	27 -
MATERIALES Y MÉTODOS -----	28 -
DISEÑO DEL ESTUDIO-----	28 -
PROTOCOLO DE OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTARIA HUMANA -----	28 -
<i>Recuperación de terceros molares.</i> -----	28 -
<i>Extracción de pulpa dentaria y obtención de cultivo primario</i> -----	28 -
<i>Evaluación de protocolo de cultivo</i> -----	30 -
CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES-----	32 -
<i>Caracterización mediante citometría de flujo</i> -----	32 -
<i>Caracterización mediante evaluación del potencial de diferenciación in vitro</i> -----	33 -
ELABORACION DE CONSTRUCTOS -----	36 -
PROTOCOLO DE IMPLANTACIÓN DE CONSTRUCTO CON HDPSC EN DC DE CALOTA DE RATÓN. -----	37 -
<i>Animales</i> -----	37 -
<i>Protocolo quirúrgico defectos óseos de tamaño crítico e implantación de hDPSC.</i> -	38 -
<i>Cuidados postoperatorios</i> -----	40 -
RECUPERACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS HISTOMORFOLÓGICO-----	40 -

RESULTADOS	42
RESULTADO 1: OBTENCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DE PULPA DENTARIA HUMANA	42
RESULTADO 2: LAS POBLACIONES CELULARES OBTENIDAS PRESENTAN CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS DE MSC	44
<i>Resultado 2.1. Las células obtenidas en P3 presentan la mayor expresión de marcadores de MSC</i>	44
Resultado 2.2. Las poblaciones celulares obtenidas presentan potencial de diferenciación osteogénico y neuronal	51
RESULTADO 3. REGENERACIÓN DEL DEFECTO CRITICO MEDIANTE IMPLANTACIÓN DE CONSTRUCTO CON HDPSCs A 30 DÍAS.	55
DISCUSIÓN	61
EXPECTATIVAS	72
CONCLUSIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS:	89
ANEXO 1: APROBACIÓN DE PROYECTO CONICYT PAI N° 79160076	89
ANEXO 2: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.	90
ANEXO 3: AUTORIZACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR PARTE DE COMITÉ DE ÉTICA CIENTÍFICO.	93
ANEXO 4: PROTOCOLO DE TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA EVALUAR DIFERENCIACION OSTEOGENICA EN FOUCH.	94
ANEXO 5: PROTOCOLO DE TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA EVALUAR DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN FOUCH.	95
ANEXO 6: AUTORIZACIÓN DE COMITÉ INSTITUCIONAL DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CICUA)	96
ANEXO 7: CERTIFICADO DE APROBACIÓN DE COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOSEGURIDAD (CIB)	97
ANEXO 8: PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN PARA ROEDORES MODIFICADO DEL PROTOCOLO PROPUESTO POR MORTON Y GRIFFITHS (MORTON & GRIFFITHS, 1985)	98
ANEXO 9: PROTOCOLO DE TINCIÓN DE HEMATOXILINA/EOSINA DE LABORATORIO DE HISTO-MORFOLOGIA ORAL DE LA FOUCH.	100
ANEXO 10: PROTOCOLO DE TINCIÓN TRICRÓMICO DE MASSON-GOLDNER DE LABORATORIO DE HISTO-MORFOLOGIA ORAL DE LA FOUCH.	101

RESUMEN

Introducción: El hueso puede regenerarse a sí mismo después de pequeñas lesiones, pero esta capacidad es limitada en caso de lesiones extensas. La medicina regenerativa e ingeniería tisular disponen de células madre como estrategia para recuperar aquellos tejidos muy dañados o perdidos. Una alternativa son las células madre de pulpa dentaria humana (hDPSC), sin embargo, la literatura existente es amplia, y diversos métodos de obtención, cultivo y aplicación, plantean la necesidad de desarrollar procedimientos estandarizados y protocolizados. La Odontología y Medicina basada en la Evidencia plantea que la evidencia científica logra su objetivo final cuando los protocolos descritos son adaptados e implementados a la realidad local, con resultados equivalentes a los reportados en la literatura. **El objetivo** de este trabajo fue implementar un protocolo de obtención y cultivo de hDPSC en la FOUC y evaluar sus potencialidades regenerativas en un modelo *in vivo* de defecto crítico. **Materiales y métodos:** Se recuperó tejido pulpar de terceros molares humanos y mediante protocolo desarrollado, implementado y evaluado en Laboratorio de Histo-Morfología Oral FOUC se obtuvo un cultivo primario de células pulpares. Las células fueron caracterizadas por citometría de flujo y ensayos de diferenciación *in vitro*. Para evaluar el potencial de regeneración ósea *in vivo*, las células pulpares fueron implantadas en defectos críticos de calota de ratón. Se recolectaron muestras a 30 días post-implantación para su análisis histomorfológico. **Resultados:** Se obtuvo una población celular con morfología fibroblástica, expresión de marcadores de superficie compatible con hDPSC y potencial de diferenciación *in vitro* a linaje osteoblástico y neuronal. El análisis histomorfológico de las muestras obtenidas mostró regeneración del defecto crítico en comparación a grupo control. Se observó formación de tejido óseo, cartilaginoso y vascular, en grados variables de maduración. **Conclusiones:** El desarrollo de un protocolo de obtención y aislamiento de hDPSC en la FOUC, permitió obtener una población celular competente en los procesos *in vivo* de regeneración de un defecto crítico de calota de ratón, sin embargo, futuros ensayos son necesarios para establecer la contribución específica de las hDPSC en la regeneración del tejido.

INTRODUCCIÓN

En el campo de la medicina regenerativa, la ingeniería tisular emerge como un área multidisciplinaria, con un potencial prometedor para la regeneración de tejidos y órganos (Akter, 2016a). Este enfoque requiere la participación de tres componentes esenciales: identificación de células madres, desarrollo de andamios tridimensionales, y señales morfogénicas inductivas para regenerar tejidos y restaurar la función normal de los órganos (Akter, 2016b).

En el dominio odontológico, también se ha impulsado este enfoque para el tratamiento de patologías que clásicamente han sido tratadas de modo paliativo. Es así como en el año 2000, Gronthos y colaboradores publican por primera vez la existencia de las células madre de la pulpa dental (DPSC, dental pulp stem cells) aisladas a partir de terceros molares (Gronthos y cols., 2000). Desde entonces, ha habido un crecimiento exponencial en investigación y desarrollo de técnicas para la ingeniería tisular a partir del territorio maxilofacial.

En la actualidad, a nivel global existe una gran cantidad de líneas de investigación relacionadas al tema, y consiguientemente, múltiples procedimientos de aislamiento, cultivo y expansión de células madre pulpares. Sin embargo, según los principios de la Odontología y Medicina basada en la Evidencia, la evidencia científica logra su objetivo final, cuando los protocolos descritos son adaptados e implementados a la realidad local, tomando en cuenta las necesidades y preferencias del paciente para la toma de decisiones clínicas (Durr-E-Sadaf, 2019), dando resultados equivalentes a los reportados en la literatura (Akobeng, 2005). Entonces, la implementación de protocolos que nos permitan obtener poblaciones celulares con características de células madre al interior de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FOUCh), es una necesidad imperativa para que, en un futuro, se desarrollen estrategias terapéuticas basadas en odontología regenerativa.

Frente a esto, se ha implementado en la FOUCh, un modelo animal representativo de procesos reparativos óseos del territorio maxilofacial: el modelo de defecto de tamaño crítico en la calota de ratón (Fernández, 2019). El paso

siguiente para concretar dicho objetivo sería implantar células madre pulpares en condiciones que les permitan desplegar sus potencialidades regenerativas/reparativas y así generar material para estudio e investigación en el dominio de la regeneración tisular y eventualmente ingeniería tisular.

Así, este trabajo propone estandarizar un protocolo de obtención de células pulpares humanas, luego, a partir de ellas, aislar y caracterizar una población con propiedades progenitoras, competentes para su implantación en el modelo *in vivo* de regeneración ósea de calota de ratón en la FOUCh (Fernández, 2019). Además, describir de manera general el resultado tisular generado después de la implantación de estas células en comparación a defectos controles sin ellas. De esta forma sentar las bases para implementar un protocolo para el estudio de la regeneración tisular en un defecto crítico de calota mediante la utilización de DPSC humanas desarrollado en la FOUCh.

Se espera que la implementación de este modelo de regeneración sirva como soporte para futuras investigaciones en el área de regeneración de los tejidos maxilofaciales.

Antes de continuar con los aspectos metodológicos utilizados, se presenta un marco teórico que contextualiza y detalla los temas más relevantes para el desarrollo de este trabajo.

MARCO TEÓRICO

La medicina regenerativa es una rama de la medicina que se ha desarrollado considerablemente en los últimos años, buscando ser una alternativa terapéutica válida ante la pérdida o alteración de tejidos u órganos generada como consecuencia de traumatismos, enfermedades congénitas, neoplasias, entre otros. Puede definirse como el uso de una combinación de células, ingeniería de tejidos y factores bioquímicos adecuados para mejorar o reemplazar las funciones biológicas (Hollands y cols., 2018; Murray y cols., 2007). En este contexto, uno de los tejidos que ha sido foco constante de estudio es el tejido óseo.

El **tejido óseo** es una forma especializada de tejido conectivo mineralizado, formado por células especializadas (tales como osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, entre otras), y una matriz extracelular (MEC), compuesta por fibras colágenas (principalmente de colágeno tipo I), incluidas en una sustancia fundamental, de proteínas no colágenas (proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina, osteopontina y varias otras proteínas y morfógenos) y algunos lípidos, sobre la que se depositan sales de fosfato de calcio, otorgando al hueso su dureza característica (Rodríguez y cols., 2015). Debido a la mineralización de la MEC, el hueso es uno de los tejidos más resistentes y rígidos del cuerpo humano, siendo además el principal componente del esqueleto, funcionando como sitio de inserción a diferentes músculos; o como una estructura que protege a órganos vitales (Brüel y cols., 2014).

El hueso tiene la capacidad inherente de repararse a sí mismo después de pequeñas lesiones (Lin y cols., 2020; Schindeler y cols., 2008). Sin embargo, cuando existen enfermedades óseas, fracturas relacionadas con osteoporosis, traumatismos, malformaciones óseas congénitas y/o resecciones tumorales de gran envergadura, la capacidad de regeneración ósea es limitada (Ercal y cols., 2018),

Esta capacidad limitada, hace necesaria la intervención clínica, convirtiendo así al tejido óseo en uno de los tejidos más comúnmente injertados en el mundo (Xu y cols., 2020). Los injertos óseos autógenos (utilización de hueso obtenido a partir del mismo individuo que recibe el injerto) son el *gold standard* de tratamiento actual

para tales defectos (Azi y cols., 2016), ya que son un material osteoinductor y osteoconductor natural, con bajo riesgo de rechazo inmune (Frohlich y cols., 2008; Gómez-Barrena y cols., 2015). A pesar de que aproximadamente el 90% de los injertos autógenos se consideran exitosos, su uso es limitado, debido a su disponibilidad, la integración incierta después de la implantación y el alto riesgo de morbilidad del sitio donante (Knuth y cols., 2019).

Aunque los injertos alogénicos (tejido obtenido de la misma especie al cual será injertado) y xenogénicos (tejido obtenido de otra especie) están disponibles, se han asociado con otros riesgos, incluida la transferencia de enfermedades o el rechazo inmunológico (Gómez-Barrena y cols., 2015). Las complicaciones comunes asociadas con los injertos óseos, independientemente de si son autógenos, alogénicos o xenogénicos, incluyen una **vascularización insuficiente** en el sitio del implante, lo que conduce a un suministro deficiente de nutrientes y oxígeno, muerte celular y necrosis (Dimitriou y cols., 2011). Esto pone de manifiesto una necesidad clara y actual de nuevas alternativas de tratamiento.

Para cumplir este objetivo, distintas líneas de investigación buscan comprender la respuesta regenerativa de nuestro organismo a nivel celular y tisular, y con ello, desarrollar estrategias terapéuticas para las alteraciones esqueléticas señaladas anteriormente, incluidas las del complejo craneofacial.

INGENIERÍA TISULAR

El término "ingeniería de tejidos" o "ingeniería tisular" fue acuñado oficialmente en un workshop de "National Science Foundation" en 1988. Fue creado para representar un nuevo campo científico centrado en la regeneración de tejidos a partir de células, con el apoyo de biomateriales y factores de crecimiento (Akter & Ibanez, 2016; Heineken & Skalak, 1991).

La ingeniería tisular se nutre y asienta en los conocimientos histológicos y recibe aportes de otras disciplinas fundamentales que ayudan al logro final del objetivo propuesto: la construcción de un tejido vivo y funcional capaz de sustituir con eficacia terapéutica al tejido original dañado (Akter, 2016a).

En la actualidad, la ingeniería tisular se puede llevar a cabo utilizando principalmente tres tipos de estrategias (Briquez & Hubbell, 2020; Chandra y cols., 2020; M. Gomez de Ferraris, 2009):

Ingeniería tisular por transferencia celular (terapia celular): en esta estrategia, las células son primero aisladas, mantenidas y tratadas *in vitro*, para posteriormente ser inyectadas en la circulación sanguínea o implantadas en determinadas localizaciones del organismo, supliendo la deficiencia estructural o funcional que en ese tipo de células se hubiese podido producir (Prósper y cols., 2006).

Ingeniería tisular por inducción: la construcción de un nuevo tejido puede llevarse a cabo fomentando la inducción de éste en el seno de nuestro propio organismo, utilizando biomateriales y señales moleculares para inducir la construcción de algunos tejidos. En estos casos, el biomaterial actúa como soporte, creando espacio para facilitar el posterior crecimiento y desarrollo del nuevo tejido (Cheng y cols., 2018).

Ingeniería tisular por elaboración de constructos: un constructo es la estructura que resulta de la asociación de tres elementos básicos que suelen utilizarse para construir un tejido artificial: células, un biomaterial que actúe como soporte o andamiaje, y factores humorales, moléculas morfogénas y factores de crecimiento (Briquez & Hubbell, 2020). Con el fin de elaborar un constructo, es necesario obtener las células seleccionadas, ya sea mediante un cultivo primario o línea celular, y situarlas, junto con factores de crecimiento, sobre o dentro del andamiaje más adecuado en relación con el tejido u órgano que se desee construir. (Akter, 2016b). El biomaterial a utilizar debe ser biocompatible, biodegradable, con características biomecánicas adecuadas al sitio de implantación y una arquitectura que permita la difusión de nutrientes, de células y la formación de MEC (O'Brien, 2011).

La fuente celular es un tema importante para la ingeniería tisular y la medicina regenerativa. Las células autólogas son ideales, ya que evitan la necesidad de una terapia inmunosupresora (Hubbell, 2003; Li y cols., 2014). Sin embargo, esta estrategia tiene una serie de limitaciones, incluida la dificultad para obtener una

cantidad suficiente de células específicas al sitio de implantación. Es por esto, que las investigaciones actuales han centrado su atención en el uso de células madre como elemento principal en la ingeniería de tejidos (Dulak y cols., 2015; Jacques & Suuronen, 2020).

CÉLULAS MADRE

Una célula madre se define como una célula indiferenciada, capaz de autorrenovarse, de proliferar *in vitro* y de diferenciarse en varios tipos celulares (Friedenstein y cols., 1970; Pittenger y cols., 1999). Las células madres están presentes durante todos los estados del desarrollo del organismo, constituyendo la fuente de células necesarias para la generación de tejidos durante el desarrollo embrionario (células madre embrionarias); y después del nacimiento, se ocupan de la homeostasia tisular y la regeneración en caso de lesión (Gilbert, 2005).

Las células madres se pueden clasificar según su potencial de diferenciación (Tabla 1), que corresponde a la capacidad de generar diferentes tipos de células con mayor grado de diferenciación y especialización. Esos potenciales varían de acuerdo con el tejido de origen y el estado de desarrollo en que se encuentran (Thomson y cols., 1996; Verfaillie, 2002).

Tabla 1 : Clasificación de células madre según su potencial de diferenciación (Thomson y cols., 1998; Verfaillie, 2002)	
Células Totipotentes	Capaz de diferenciarse en todos los tejidos que forman el cuerpo humano y anexos embrionarios.
Células Pluripotentes (Células Madre Embrionarias, ESCs)	Presente en la masa celular interna de un blastocisto y capaz de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), con excepción de los anexos embrionarios.
Células Multipotentes (Ej. Células Madre Mesenquimáticas, MSC)	Células capaces de diferenciarse en varios tipos celulares de una sola capa germinativa. Están presentes durante el proceso de formación del feto y en el adulto .

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Corresponden a un tipo de células multipotente, identificadas en varios tejidos adultos. Son células madre indiferenciadas que derivan del mesodermo embrionario (Ullah y cols., 2015). A pesar de ser aisladas clásicamente de la médula ósea (Friedenstein y cols., 1970; Pittenger y cols., 1999), también pueden obtenerse de otros tejidos, tales como: el cordón umbilical en neonatos (Erices, Conget, & Minguell, 2000), a partir de tejido adiposo en adultos (Zuk y cols., 2002), de piel (Shih y cols., 2005;) y de la pulpa dental (Gronthos y cols., 2000). El uso de MSC (*mesenchymal stem cells*) evita muchas controversias éticas asociadas con el uso de células madre embrionarias, ya que no requieren el uso y destrucción de embriones humanos para su obtención (Olson y cols., 2011).

In vitro, las MSC son células que se adhieren al plástico, son capaces de autorrenovarse, formar colonias y diferenciarse en varios linajes después de inducción, tales como: osteogénico, condrogénico y adipogénico (Friedenstein y cols., 1970; Pittenger y cols., 1999); mientras que *in vivo*, las MSC son capaces de formar hueso (Kuznetsov y cols., 1997); cartílago en ratones irradiados (Pereira y cols., 1995); adipocitos (Dennis & Caplan, 1996); participar en la regeneración de lesiones de la médula espinal en modelos de ratón (Hofstetter y cols., 2002), entre otras funciones.

Debido a la heterogeneidad de las poblaciones celulares obtenidas de los diversos tejidos y los diferentes protocolos de aislación y cultivo celular, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) establece que las MSC deben cumplir con ciertas características mínimas para ser definidas como tal (Dominici y cols., 2006):

- 1) Morfología celular fibroblástica y adherencia al plástico.
- 2) Capacidad de diferenciación *in vitro*.

3) Expresión $\geq 95\%$ de los antígenos de superficie **CD105** (endogin: un gen de especificación de células endoteliales), **CD73** (ecto-50 nucleotidasa: una enzima que metaboliza los nucleótidos a nucleósidos) y **CD90** (glucoproteína Thy-1 anclada al glucosilfosfatidilinositol). Además, debe mostrar una **expresión menor al 2%** para antígenos de superficie hematopoyéticos, tales como CD45 (tirosina-fosfatasa presente en linfocitos), CD34 (marcador de células progenitoras hematopoyéticas,

y CD14 (comúnmente expresada en monocitos y macrófagos). Generalmente para la evaluación de la expresión de los marcadores de superficie se emplea la citometría de flujo.

La citometría de flujo es una tecnología que proporciona un análisis multiparamétrico rápido de células o partículas individuales en suspensión, empleando para ello láseres como fuentes de luz para producir señales de luz fluorescentes. Estas señales son leídas por detectores, como fotodiodos o tubos fotomultiplicadores y son convertidas en señales electrónicas, que son analizadas por un software y escritas en un archivo de datos para su posterior análisis. (Barteneva y cols., 2012; McKinnon, 2018). Las poblaciones celulares se pueden analizar y/o purificar en función de sus características de dispersión de luz o fluorescencia.

Muchos estudios se han centrado en el aislamiento de MSC de fuentes más accesibles con el objetivo de una obtención y aplicación más segura. En este contexto, las células madre de origen dental se proponen actualmente como una fuente de MSC para ingeniería de tejidos (Chen y cols., 2021). Las ventajas que representa el uso de células madre aisladas del tejido dentario están relacionadas con su accesibilidad, su gran potencial de diferenciación multilineaje y su capacidad proliferativa (Shi y cols., 2020).

CÉLULAS MADRE ASOCIADAS A LOS TEJIDOS DENTARIOS

Para comprender las características y potencial de las células madre derivadas a partir de tejidos dentales, es necesario recordar su origen y desarrollo. Desde el punto de vista embriológico, los dientes se desarrollan a partir de dos esbozos que interactúan mutuamente durante la odontogénesis: 1) la lámina dentaria, la cual dará origen al órgano del esmalte y formará el esmalte dentario; y 2) el tejido mesenquimático derivado de la migración de las células de la cresta neural (ectomesénquima), que forma la papila dentaria y el saco dental, originando posteriormente el complejo pulpo dentinario y el periodonto de inserción, respectivamente (Aydin & Şahin, 2019; Hollands y cols., 2018).

Se han aislado y caracterizado varias fuentes de células madre a partir de los tejidos dentarios (Figura 1), tales como: células madre de la pulpa dental de dientes permanentes (*dental pulp stem cells, DPSCs*) (Gronthos y cols., 2000); células madre humanas de dientes temporales exfoliados (*Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth, SHED*) (Miura y cols., 2003); Células madre del ligamento periodontal (*Periodontal Ligament Stem Cell, PDLSC*) (Seo y cols., 2004); Células progenitoras del folículo dental (*Dental Follicle Progenitor Cells, DFPCs*) (Morsczeck y cols., 2005); células madre de la papila apical (*Stem Cell from Apical Papilla, SCAP*) (Sonoyama y cols., 2006) y células madre gingivales (Gingival Mesenchymal Stem Cell, GMSC) (Zhang y cols., 2009).

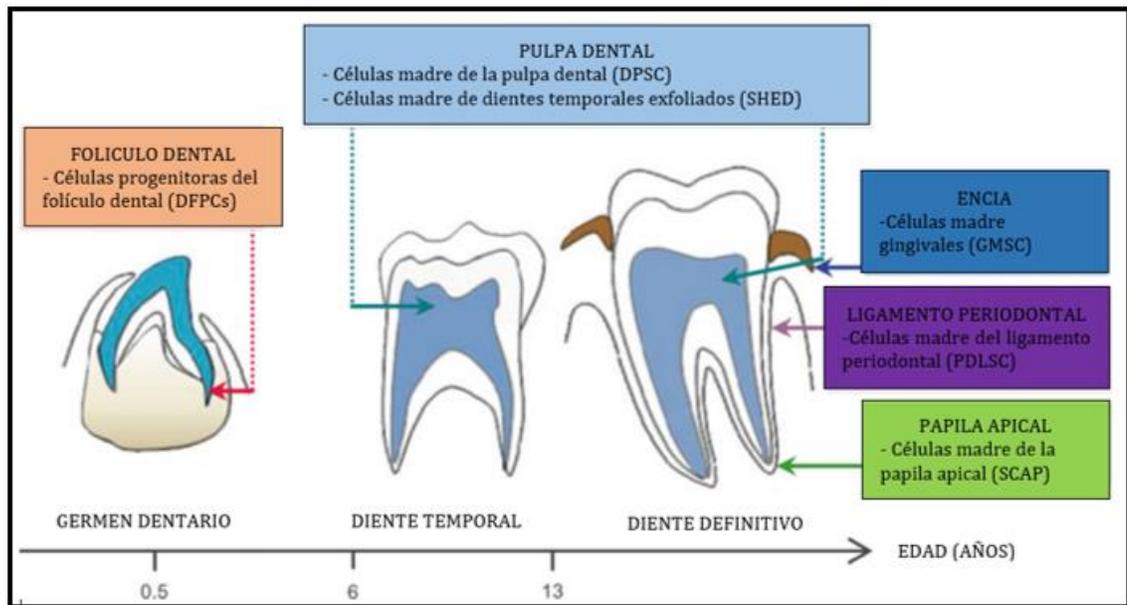


Figura 1: Etapas de desarrollo del diente que muestran la localización de las diferentes fuentes de células madre. (Imagen adaptada de Gardin y cols., 2016)

Las células más estudiadas son las DPSCs. Descritas por primera vez por Gronthos y colaboradores (Gronthos y cols., 2000), constituyen en la actualidad la principal fuente en investigación y estudios preclínicos y clínicos, incluso en dominios mucho más vastos que el territorio dentario o maxilofacial (Saito, 2015; Shi y cols., 2020).

CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTARIA

La pulpa dentaria corresponde a tejido conectivo muy particular ubicado en el centro de la estructura del diente, rodeado por tejido mineralizado (esmalte, dentina y cemento radicular). La pulpa dentaria está organizada en cuatro capas (D'Aquino y cols., 2009): **capa externa** o capa odontoblástica; **capa acelular**, rica en fibras nerviosas y capilares ; **capa celular**, zona rica en fibroblastos y células madre y **zona central**, que comprende la mayor cantidad de vasos sanguíneos y estructuras nerviosas de mayor calibre, así como fibras colágenas y células tales como macrófagos, linfocitos y fibrocitos.

Las DPSCs derivan de células neuro-ectodérmicas que se desprenden de la periferia del tubo neural durante el proceso de neurulación (células de la cresta neural). Las células de las crestas neurales de los rombómeros 1 y 2 y de la región distal del mesencéfalo migran a la región craneofacial y se diferencian en células del fenotipo mesenquimático, por lo que algunos autores las han descrito como células "ecto-mesenquimáticas" (D'Aquino y cols., 2008).

Otra característica relevante de las DPSCs es que no expresan el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) en su superficie, y tienen propiedades inmunorreguladoras, induciendo la apoptosis de linfocitos T activados (Li y cols., 2014). Varios factores solubles y citoquinas secretadas por las DPSCs presentan actividad inmunomoduladora, entre los que se incluyen prostaglandina E2, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleuquina-6, interleuquina 10, óxido nítrico y Fas-ligando (Demircan y cols., 2011). Se ha descrito además, que la mantención de su potencial de diferenciación, migración y adhesión está dada por una correcta interacción de estas células y la MEC mediante la presencia de integrinas en la superficie de las DPSCs, siendo la más identificada la sub-unidad β 1 (CD29), al igual que en otros tipos de células madre (Prowse y cols., 2011).

Debido a su origen, las DPSCs presentan propiedades similares a las MSC de la médula ósea: autorrenovación, son multipotentes y presentan alta tasa de proliferación (Kaneko y cols., 2018). Algunos estudios *in vitro* han mostrado su capacidad de diferenciarse en células de tejido mesodérmico tales como

osteoblastos (D'Aquino y cols., 2008); odontoblastos (Casagrande y cols., 2011); adipocitos y condrocitos (Gronthos y cols., 2000); pero además, en células de tejidos no mesodérmicos tales como células neuronales (Chang y cols., 2014), hepatocitos (Ishkitiev y cols., 2012), entre otras.

En estudios *in vivo*, las DPSCs pueden diferenciarse en células secretoras de dentina reaccional (células tipo-odontoblasto) con una estructura muy similar al tejido fisiológico (Cordeiro y cols., 2008). Varios son los estudios, en modelos de pollo o rata, que muestran que las DPSCs pueden responder a un contexto neurológico y adquirir una morfología neuronal, expresando marcadores neuronales y canales de sodio potasio (Arthur y cols., 2008).

Otros autores han mostrado que células derivadas de la cresta neural producen más tejido mineralizado e inducen más formación ósea que las células derivadas del mesodermo de los huesos largos (Aghaloo y cols., 2010; Reichert y cols., 2013) y las DPSCs pueden contribuir a la formación de hueso cuando son implantadas en una lesión craneana (Seo y cols., 2008).

En modelos murinos, los estudios muestran que las DPSCs mejoran la recuperación de un infarto agudo al miocardio, cuando ellas son inyectadas en la periferia del tejido afectado (Gandia y cols., 2008). Un efecto similar es observado cuando las DPSCs son inyectadas en la periferia de una lesión de médula espinal y el animal recupera sus funciones motoras (Sakai y cols., 2012).

Respecto a la realización de ensayos clínicos, algunos estudios indican que la implantación de DPSCs en defectos mandibulares, ha favorecido una mejor y rápida reparación, en comparación a defectos sin células (D'Aquino y cols., 2009). En cuanto a terapias conservadoras, se ha descrito la capacidad de neoformación de tejido pulpar altamente vascularizado, y un estudio piloto en humano ha descrito la regeneración pulpar total, en dientes con el ápice cerrado y su proceso de formación terminado (Nakashima y cols., 2017)

PROTOSCOLOS DE OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL REGENERATIVO DE DPSCs HUMANAS

En vista de las potenciales aplicaciones de las DPSCs en medicina regenerativa, el interés actual radica en optimizar y estandarizar tanto los protocolos de obtención y cultivo de DPSCs humanas (hDPSC) (fase *in vitro*), como los modelos de evaluación del potencial de regeneración ósea (fase *in vivo*). Sin embargo, son múltiples las variables a considerar:

1.- Consideraciones en la fase *in vitro*

Para la obtención de hDPSCs optimas, la edad del donante constituye un factor de gran relevancia. En el año 2015, Wu y colaboradores realizaron una investigación que comparó las hDPSCs derivadas de niños (4-8 años), adolescentes (12-20 años), adultos (30-50 años) y donantes de edad avanzada (55-67 años); reportando una asociación entre menor eficacia del aislamiento, aumento del tiempo de duplicación, mayor número de células apoptóticas, y menor capacidad de diferenciación en cultivos derivados de donantes adultos y de edad avanzada. (Wu y cols., 2015).

Respecto al aislamiento de las hDPSCs, los dos protocolos más comunes son la digestión enzimática y el método del explante. En el **método de digestión enzimática**, después de acceder al tejido pulpar, se usa un “cóctel enzimático” para degradar la MEC y obtener células aisladas en suspensión, que luego de ser filtradas y centrifugadas se siembran en placa de cultivo. Se han descrito varias formulaciones enzimáticas y enfoques para la digestión, lo que puede afectar negativamente en la sobrevivencia de los cultivos (Viña-Almunia y cols., 2016). En tanto, el **método de explante** consiste en la fragmentación del tejido pulpar en trozos de unos pocos milímetros de longitud directamente en la placa de cultivo, y las células crecen después de disociarse naturalmente de la pulpa (Spath y cols., 2010). La reducción del tamaño de los trozos de tejido mejora la difusión de gases y nutrientes hacia las células. Sin embargo, la fragmentación excesiva del tejido puede conducir a la destrucción mecánica de las células; y por el contrario, una fragmentación muy conservadora puede dificultar la migración celular (Karamzadeh y cols., 2012).

En cuanto al método de cultivo, se han probado diferentes formulaciones de medios de cultivo que incluyen varios medios basales y suplementos. Hasta ahora, el suero fetal bovino (FBS) se ha utilizado como el *gold standard* para el cultivo celular (van der Valk y cols., 2018). Sin embargo, se ha reportado que la concentración de suero utilizada puede condicionar la expresión proteica de las células madre, su potencial de diferenciación (Niehage y cols., 2016), y puede contribuir a acelerar el proceso de senescencia celular (Morsczeck, 2019).

2.- Consideraciones respecto a la fase *in vivo*

Para la evaluación del potencial de regeneración ósea de las hDPSCs, el andamio seleccionado y el modelo experimental a utilizar representan variables importantes en la ingeniería de tejidos.

Un andamio ideal busca simular la MEC nativa, que regule las funciones celulares y la comunicación intracelular (Akter & Ibanez, 2016). Los andamios deben ser específicos para cada tejido, ya que existe una amplia variedad según su composición. Los biomateriales más utilizados como andamio en modelos de regeneración ósea son en base a polímeros, tanto naturales como sintéticos (Anitua y cols., 2018; Roseti y cols., 2017). Los polímeros naturales, tales como colágeno, chitosán, elastina, fibrina, alginatos, ácido hialurónico y membranas amnióticas, son biológicamente activos y presentan buenas propiedades de biocompatibilidad. Sin embargo, estos compuestos suelen mostrar pobres propiedades mecánicas y su tasa de degradación es difícil de controlar; mientras que polímeros sintéticos, tal como el ácido poliláctico (PLA, *poly-lactic acid*) o sus derivados, (ácido poliglicólico, el polietilenglicol o la policaprolactona) son más versátiles, más controlables y predecibles y con una bioactividad variable (Galler y cols., 2018).

Los modelos de experimentación en animales han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación. La necesidad de implementar modelos *in vivo* responde a las limitaciones inherentes de los sistemas *in vitro* por su desvinculación con el contexto fisiológico del tejido y del individuo (Tannenbaum & Bennett, 2015). Existen técnicas alternativas tales como los modelos matemáticos

de simulación y los cultivos celulares, sin embargo, estos procedimientos sólo contribuyen a disminuir el número de animales de experimentación.

En el caso de evaluar las competencias regenerativas de poblaciones celulares, es necesario comprender los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos de formación y reparación ósea, para luego poder extrapolar los procesos desarrollados en los distintos modelos animales, y así seleccionar el más adecuado al contexto fisiológico humano.

MECANISMOS DE REGENERACIÓN ÓSEA

Los complejos procesos que impulsan y regulan la capacidad regenerativa del hueso, en el contexto específico de ingeniería tisular y medicina regenerativa, aún no se han dilucidado por completo, por ello la comprensión de los mecanismos de osteogénesis, o el proceso fisiológico de reparación de una fractura, son una parte fundamental, ya que se ha establecido que muchos de los procesos se replican a nivel de regeneración ósea (Reddi & Iwasa, 2019).

La osteogénesis es el proceso de formación ósea. Este proceso comienza entre la sexta y séptima semana de desarrollo embrionario y continúa hasta aproximadamente los veinticinco años, aunque esto varía según el individuo (Gilbert, 2005). Hay dos formas fundamentales de osificación: intramembranosa y endocondral (Gilbert, 2005; Kanczler y cols., 2020). Cada uno de estos procesos comienza con un precursor de tejido mesenquimático, pero la forma en que se transforma en hueso es diferente. Estos procesos están regulados por varias señales que incluyen factores de crecimiento y de diferenciación solubles, así como las interacciones célula - célula y MEC - célula (Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil y cols., 2006b; Rambhia & Ma, 2019).

OSIFICACIÓN INTRAMEMBRANOSA

Este proceso implica la diferenciación de células osteoprogenitoras directamente desde células mesenquimáticas, sin el pasaje intermedio por una placa cartilaginosa. De este modo se forma la clavícula y la mayoría de los huesos craneales (Brüel y cols., 2014). Comienza cuando las células mesenquimales

derivadas de la cresta neural se diferencian en células especializadas formadoras de hueso llamadas osteoblastos, las cuales se reúnen en grupos y forman centros de osificación (Breeland y cols., 2020). Los osteoblastos comienzan a secretar tejido osteoide, que corresponde a una matriz no mineralizada de colágeno-proteoglicano, rica en proteínas asociadas a hueso, la cual madura en el tiempo, algunas señales cambian la polaridad de secreción del osteoblasto y queda inmerso en su propio tejido osteoide dando origen a los osteocitos. La formación de cristales de hidroxiapatita en la matriz osteoide da como resultado trabéculas de un hueso primario con el colágeno desordenado. A medida que los osteoblastos continúan secretando matriz osteoide, se rodea de vasos sanguíneos y medula ósea formando un hueso esponjoso (Brüel y cols., 2014; Reddi & Iwasa, 2019). Estos vasos contribuirán eventualmente a formar la médula ósea roja. Las células mesenquimales en la superficie del hueso forman una membrana llamada periostio. Las células en la superficie interna del periostio se diferencian en osteoblastos y secretan matriz osteoide paralelos a los de la matriz existente, formando capas. Estas capas se denominan colectivamente hueso compacto o cortical (Reddi & Iwasa, 2019).

OSIFICACIÓN ENDOCONDRALE

Este proceso implica el reemplazo del cartílago hialino por hueso y forma el resto del esqueleto axial y los huesos largos (Brüel y cols., 2014). Comienza cuando las células mesenquimales derivadas del mesodermo se diferencian en condrocitos con diferentes linajes, los cuales proliferan rápidamente y secretan una matriz extracelular para formar un molde de cartílago para el hueso (Breeland y cols., 2020). En la vía de osificación endocondral canónica, los condrocitos cerca del centro del modelo óseo comienzan a sufrir hipertrofia y secretan colágeno X y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo que induce la calcificación de la matriz extracelular, evitando que los nutrientes normales difundan a los condrocitos, la mayoría de los cuales sufren apoptosis. La muerte celular resultante crea vacíos en la plantilla del cartílago calcificado por donde penetran los endoteliositos inducidos por VEGF y permite que se formen vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos agrandan aún más los espacios, que eventualmente se combinan y se convierten

en cavidades medulares. También transportan células osteogénicas y desencadenan la transformación del pericondrio en periostio (Breeland y cols., 2020; Dimitriou y cols., 2011). Los osteoblastos luego crean una región engrosada de hueso compacto en la región diafisaria del periostio, llamada collar periosteal, donde se forma el centro de osificación primaria. Mientras el hueso está reemplazando el cartílago en la diáfisis, el cartílago continúa proliferando en los extremos del hueso, aumentando su longitud. Estas áreas proliferativas se convierten en las placas epifisarias, que proporcionan un crecimiento longitudinal de los huesos después del nacimiento y hasta la edad adulta temprana (Brüel y cols., 2014; Gilbert, 2005).

REPARACIÓN ÓSEA

En el caso de una fractura, el proceso reparativo es similar al proceso de desarrollo óseo, pero a menor escala, enfocado en el sitio de la lesión y en el grado de movilidad interna que presente la zona a reparar (Chen y cols., 2020; Schindeler y cols., 2008). Este proceso se divide convencionalmente en cuatro etapas, cada una caracterizada por un conjunto específico de eventos celulares y moleculares, pero en términos prácticos rara vez hay una delimitación tan clara de los acontecimientos (Chen y cols., 2020; Schindeler y cols., 2008).

FASE INFLAMATORIA: Una fractura se asocia típicamente con la interrupción de la integridad local del tejido blando, la interrupción de la función vascular normal y una distorsión de la arquitectura ósea (Schindeler y cols., 2008). Este daño conduce a la activación de vías de reparación no específicas que acompañan a las lesiones no esqueléticas. La extravasación (sangrado) dentro del sitio de la fractura está contenida por el tejido circundante y se convierte en un hematoma. Las plaquetas, los macrófagos y otras células inflamatorias (granulocitos, linfocitos y monocitos) se infiltran en el hematoma entre los fragmentos fracturados y combaten la infección, secretando citocinas y factores de crecimiento y avanzan la coagulación hacia un trombo fibrino-plaquetario (Lin y cols., 2020). Con el tiempo, los capilares crecen en el coágulo, que se reorganiza en tejido de granulación. Los macrófagos, las células gigantes y otras células fagocíticas eliminan las células degeneradas y otros desechos.

Esta respuesta celular está coordinada por la secreción de una variedad de citocinas y factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), VEGF, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleuquinas-1 y -6 (IL-1 y -6), proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Chen y cols., 2020; Reddi & Iwasa, 2019). Estos factores facilitan el reclutamiento de células inflamatorias adicionales en un circuito de retroalimentación positiva, y también la migración e invasión de células osteoprogenitoras.

FORMACIÓN DE FIBROCARTÍLAGO: La mayoría de las fracturas poseen cierto nivel de inestabilidad mecánica lo que induce una curación mediante un proceso de osificación endocondral, ya que la formación de callos óseos está precedida por una plantilla cartilaginosa (Gómez-Barrena y cols., 2015; Schindeler y cols., 2008). Esta etapa está dominada a nivel celular por los condrocitos y los fibroblastos, aunque las proporciones relativas de los diferentes tipos de células pueden variar entre fracturas. Estas células producen un callo blando semirrígido que puede proporcionar soporte mecánico a la fractura, además de actuar como plantilla para el callo óseo que más tarde lo reemplazará (Chen y cols., 2020).

El callo cartilaginoso es principalmente avascular, aunque su reemplazo posterior con hueso inmaduro implica invasión vascular. Los condrocitos proliferan y sintetizan la matriz cartilaginosa hasta que todo el tejido de granulación es reemplazado por cartílago. (Rambhia & Ma, 2019; Schindeler y cols., 2008). Las regiones cartilaginosas crecen y se fusionan progresivamente entre los fragmentos fracturados entablillando la fractura. En las etapas finales de la producción de callos blandos, los condrocitos sufren hipertrofia y mineralizan la matriz cartilaginosa antes de sufrir apoptosis. (Fernandez-Tresguerres y cols., 2006a).

FORMACIÓN DE CALLO ÓSEO: También conocida como formación ósea primaria (Brüel y cols., 2014), se caracteriza por altos niveles de actividad osteoblástica y la formación de matriz ósea mineralizada. Para formar un nuevo callo duro, el callo blando se elimina gradualmente, concomitantemente con la revascularización. El nuevo hueso recién formado es inmaduro, donde la

disposición del colágeno y de los osteocitos es azarosa en la matriz calcificada, constituyendo el **hueso no laminillar** (Figura 2, A) (Jiang y cols., 2020; Pawlina, 2016). Se sabe que la irrigación es crítica para la regeneración del tejido óseo, con un aumento de la tensión de oxígeno en la región local necesaria para la diferenciación de los osteoblastos (Paino y cols., 2017).

REMODELADO ÓSEO: La etapa final de la reparación de la fractura abarca la remodelación del callo óseo en la configuración original del hueso cortical y / o trabecular (Brüel y cols., 2014). El proceso de remodelación es impulsado por un proceso acoplado de resorción ósea ordenada, seguido de la formación de **hueso laminillar**, donde las fibras colágenas son paralelas o concéntricas, ordenadas y en huesos compactos, con osteocitos dispuestos alrededor de vasos sanguíneos, cada estructura de capas múltiples que se forma al agregarse laminillas (capas) consecutivas de hueso recibe el nombre de sistema de Havers u osteona (Figura 2, B) (Pawlina, 2015)

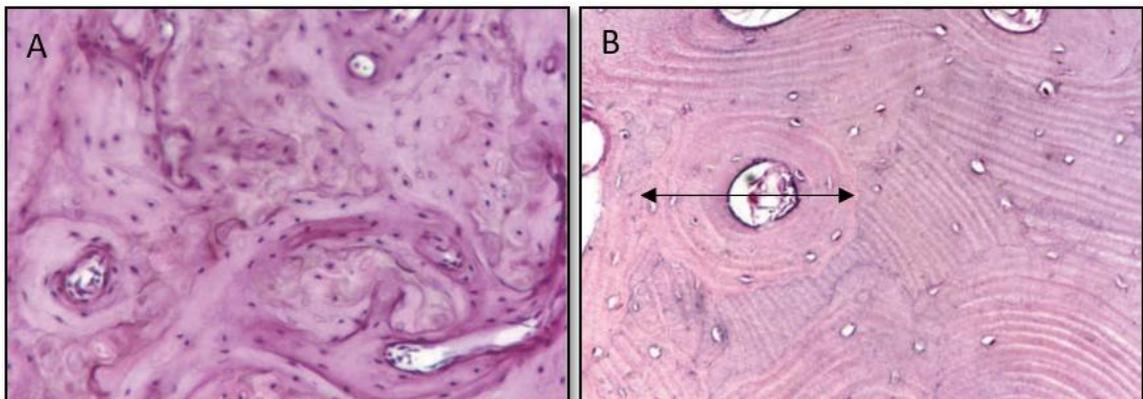


Figura 2: Fotografías de huesos inmaduro y maduro descalcificados con tinción de hematoxilina-eosina. (imagen adaptada de Pawlina, 2016)

A: Hueso reticular, no laminillar o inmaduro, de formación rápida, en que las fibras de colágeno tienen una distribución desorganizada. Se caracteriza por presentar mayor número de osteocitos alargados y bajo contenido mineral. Es reemplazado paulatinamente por hueso lamelar o laminillar. **B:** Hueso laminillar, lamelar o hueso maduro: Presenta fibras de colágeno ordenadas y paralelas, organizadas en sistemas de Havers (flecha negra), las que cambian de orientación dependiendo de las necesidades biomecánicas del hueso.

MODELOS DE ESTUDIO DE REGENERACIÓN ÓSEA

En una revisión sistemática desarrollada por Leyendecker Jr. y cols. (Leyendecker Jr y cols., 2018) muestra que variados equipos de investigación han evaluado el potencial de regeneración ósea en modelos *in vivo* mediante el uso de hDPSCs. Entre los mamíferos más utilizados se encuentran ratas (Jahanbin y cols., 2016; Paino y cols., 2017), ratones (Kim y cols., 2015; Yasui y cols., 2015), conejos (Alkaisi y cols., 2013; Wongsupa y cols., 2017), cerdos (Cao y cols., 2015; Kuo y cols., 2015), ovejas (Levi y cols., 2010), perros (Behnia y cols., 2014), entre otros. Las estrategias utilizadas en los modelos experimentales han sido: formación de hueso ectópico, ya sea mediante la implantación de constructos subcutáneos (Kang y cols., 2017; Laino y cols., 2005) o intraperitoneales (El-Gendy y cols., 2013). También se han creado **defectos críticos**, que corresponden a "la herida intraósea de tamaño más pequeño en un hueso y especies de animales en particular, que no reparan espontáneamente durante la vida del animal" (Schmitz & Hollinger, 1986). Estos defectos se han evaluado en calota (Petridis y cols., 2015; Wongsupa y cols., 2017), maxilar, mandíbula (Kuo y cols., 2015; Li, Y. y cols., 2016), y tibia (Feng y cols., 2016).

En este contexto, y para establecer una secuencia lógica en el proceso de investigación, en el Laboratorio de Histo-Morfología Oral de la FOUC se ha implementado y estandarizado un modelo para el estudio de la reparación ósea en defectos críticos de calota de ratón, demostrando que efectivamente después de 30 y 90 días de realizado el defecto, no se produce neoformación ósea en el área del defecto, y solo se cierra superficialmente el defecto óseo mediante la formación de tejido fibroso (Fernández, 2019).

En base a la evidencia actual, sabemos que las hDPSCs constituyen una población de células madre adultas, más fácilmente accesibles que las células de la médula ósea y además son de fácil manipulación, lo que las convierte en una población celular con proyección terapéutica tanto a nivel odontológico como médico, en el terreno de la ingeniería tisular y medicina regenerativa.

Finalmente, ante la existencia de múltiples diseños metodológicos y técnicas descritas en la literatura, tanto para el manejo *in vitro* de las hDPSCs, como para su utilización en modelos *in vivo* y a futuro en pacientes; es necesario adaptar dichos procedimientos a nuestra realidad local, como es sugerido en los principios de la Odontología y Medicina basada en la Evidencia, y así contar con una línea de base estableciendo protocolos de obtención, cultivo e implantación que puedan ser usados y replicados en futuras investigaciones de hDPSCs y su potencial regenerativo, en el contexto de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las células pulpaes humanas obtenidas mediante protocolo desarrollado en Laboratorio de Histo-Morfología Oral de la FOUCCh presentan características de célula madre y participan en la neoformación tisular al interior de un defecto crítico de calota de ratón

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y estandarizar en la FOUCCh, un protocolo de obtención de células madre pulpaes humanas y evaluar histológicamente su potencial reparativo en un modelo *in vivo* de defecto crítico de calota de ratón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer protocolo para obtención y cultivo de células madre pulpaes de dientes permanentes humanos.
2. Caracterizar las poblaciones celulares obtenidas de células pulpaes humanas.
3. Evaluar histológicamente la neoformación tisular al interior de un defecto crítico de calota de ratón a los 30 días post-implantación de células madre pulpaes.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental descriptivo, enmarcado en el Proyecto PAI N.º 79160076, titulado “Células madre aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales”. (Ver Anexo 1)

PROTOCOLO DE OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTARIA HUMANA

RECUPERACIÓN DE TERCEROS MOLARES.

Se recuperaron 6 terceros molares sanos a partir de pacientes humanos sistémicamente sanos, entre 17 y 25 años, con indicación de exodoncia, realizada en pabellón de Clínica Odontológica de la Universidad de Chile (COUCH) según lista de pacientes citados, previa firma de consentimiento informado y/o asentimiento según corresponda (Anexo 2). Dicho procedimiento y Consentimiento Informado se encuentra visado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 3).

Una vez realizado el procedimiento, los dientes fueron transportados de forma individual en medio RPMI 1640 [+ L-glutamina] (Biological Industries) en frío (5°C) al Laboratorio de Histo-Morfología Oral de la FOUC h para su procesamiento inmediato (Figura 3, A).

EXTRACCIÓN DE PULPA DENTARIA Y OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO

La recuperación de la pulpa dentaria se realizó mediante corte con instrumental rotatorio y refrigeración constante en sentido transversal del diente, 1mm apical al límite amelocementario (LAC), sin llegar a comunicar con cavidad pulpar, para posteriormente separar ambos fragmentos (porción coronal y radicular) mediante cizallamiento (Figura 3, B).

La pulpa cameral se retiró cuidadosamente utilizando hoja de bisturí N.º 15, pinzas y/o sonda de caries (Figura 3, C). La extracción de células pulpares se llevó a cabo efectuando método **mecánico-enzimático**: el tejido pulpar recuperado se fragmentó utilizando hoja de bisturí n°15 (Figura 3, D) y luego fue tratado en medio de digestión [*Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x) + GlutaMAX™ (Gibco®), 100U/ml de colagenasa y 1U/ml dispasa II*], durante 45 min a 37°C en agitación constante a 150 revoluciones por min (rpm) (Orbit™ P4, Labnet©). Posteriormente se detuvo la reacción enzimática incorporando el doble de volumen de medio STOP [*medio DMEM (1x) + GlutaMAX™ (Gibco®), 10% de suero fetal bovino (FBS) (HI FBS, Gibco®)*]. Luego se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos, a 37°C (Universal 320R, Hettich©).

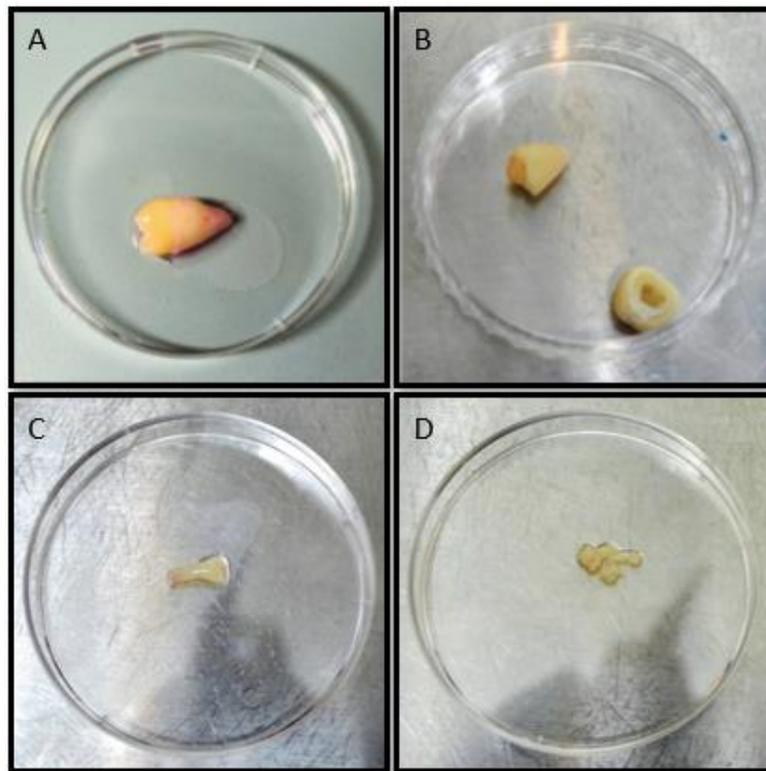


Figura 3: Procedimiento de obtención de tejido pulpar.

A: Tercer molar previo a limpieza y sección. **B:** Diente seccionado mediante cizallamiento con pulpa expuesta. **C:** Pulpa dental extraída. **D:** Explante de pulpa dental fragmentado previo al procedimiento de digestión enzimática.

Posteriormente se retiró el sobrenadante y el tejido pulpar procesado fue sembrado en placa de 6 pocillos (Falcon®) (previamente tratada con gelatina/PBS 0.1% por 10 min a 37°C) en medio inicial de cultivo [*DMEM (1x) + GlutaMAX™, suplementado con 20% de FBS (HI FBS, Gibco®); 1% de amoxicilina/estreptomicina/anfotericina-b; 1µL/ml de Factor de Crecimiento Fibroblástico 2 (FGF-2)*]. Finalmente, el cultivo en dos dimensiones estaba compuesto de fragmentos de explante pulpar y de algunas células en suspensión. El tejido fue incubado a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ (Heracell™ VIOS 160i, Thermo Scientific™).

Después de iniciado el cultivo, las células migraron desde el explante o formaron las primeras colonias a partir de células en suspensión que se adhirieron al plástico. A ese momento del cultivo, se le denominó P0, es decir, las primeras poblaciones celulares que migraban desde los explantes pulpares, sin haber sufrido un proceso de replicación. Una vez obtenido un grado de confluencia del 70 – 80%, se realizó el replicado del cultivo. Para tal efecto, se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con 1ml de tampón fosfato salino (PBS) 1x de forma cuidadosa. Una vez retirado el PBS se agregó 500µl de tripsina (TrypLE™ Express 1x, [-] phenol red (ref. 12504-021, Gibco)) y se llevó a incubadora a 37°C durante 1 minuto. Posteriormente, se retiró la tripsina y se agregó 1ml de medio de cultivo secundario [*DMEM (1x) + GlutaMAX™, suplementado con 10% de FBS (HI FBS, Gibco); 1% de amoxicilina/estreptomicina/anfotericina-b; 1µL/ml de FGF-2*] para resuspender las células y distribuir las en placas de 6 pocillos. De este modo el cultivo celular entró al pasaje 1 (P1), es decir, una población celular que sufrió un proceso de tripsinización para su replicación. Finalmente se llevó a incubadora y el medio de cultivo se cambió cada dos días.

EVALUACIÓN DE PROTOCOLO DE CULTIVO

Para obtener una población celular lo más enriquecida con característica de células progenitoras, se evaluó la concentración de suero utilizado y el número de pasajes de replicación de cada cultivo. En relación con la cantidad de suero, siempre se inició el cultivo con FBS al 20%. Luego del primer pasaje, se mantuvo la concentración al 20% en una de las muestras (según protocolo original de Gronthos

y colaboradores (Gronthos y cols., 2000), mientras que el resto fueron cultivadas al 10% de FBS (según protocolo presentado). Una vez obtenidos los cultivos, se evaluó el perfil inmunofenotípico de las poblaciones celulares obtenidas en diferentes pasajes de replicación.

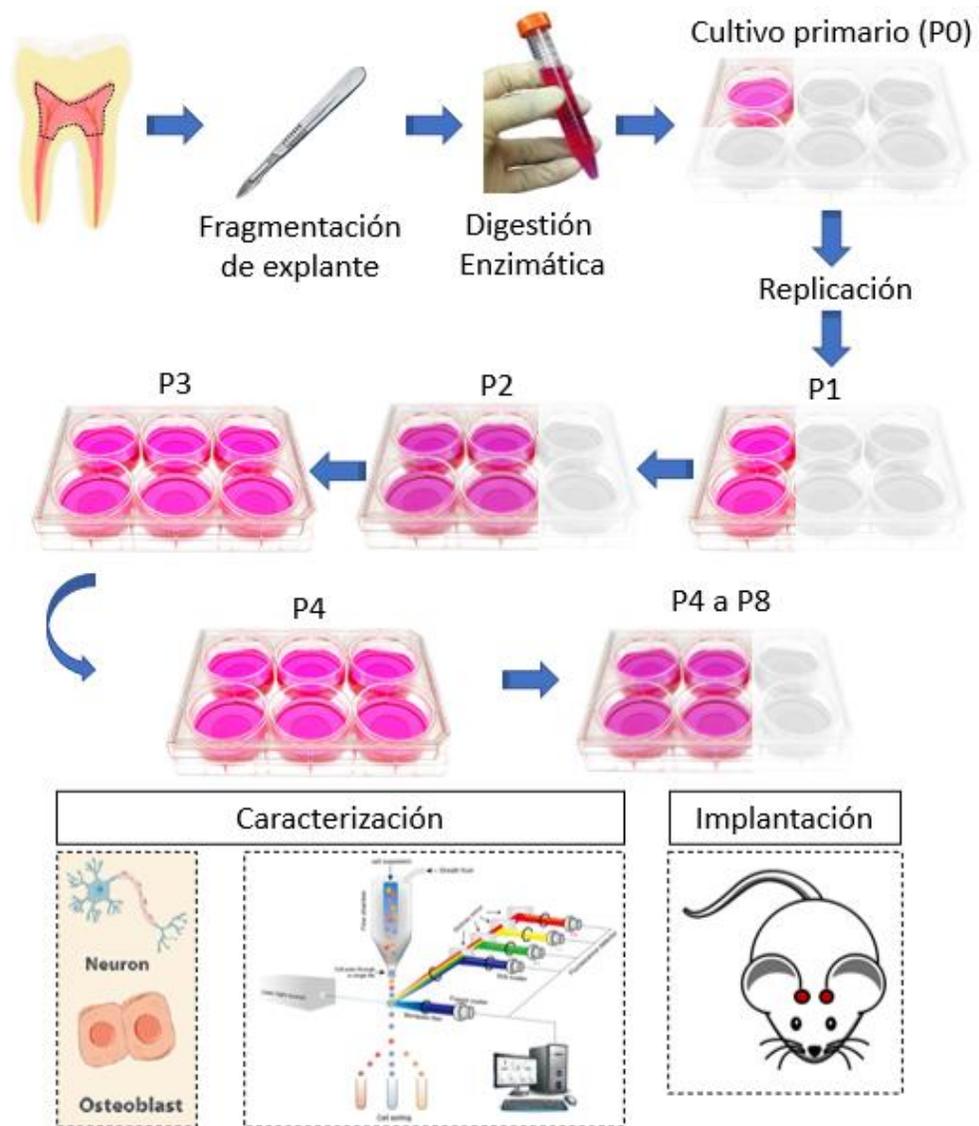


Figura 4. Representación esquemática de proceso de obtención, cultivo, replicación, caracterización e implantación de hDPSC en modelo *in vivo*.

Se muestra esquema de obtención y replicación de poblaciones celulares pulpares para ser analizadas en ensayo de diferenciación *in vitro*; análisis mediante citometría de flujo y ensayos de reparación *in vivo*.

CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES

CARACTERIZACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La presencia y el perfil de hDPSCs en los cultivos celulares según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) (Dominici y cols., 2006) fue determinada mediante citometría de flujo en equipo BD FACSAria™ III, (BD Biosciences®) (Figura 5, A) del Programa Disciplinario de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, basado en la expresión variable de marcadores de superficie.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados (BioLegend®) para **CD73** (APC/Cyanine7 anti-human CD73 Antibody; clon AD2); **CD90** (PE/Cy5 anti-human CD90 Antibody, clon 5E10); **CD105** (APC anti-human CD105 Antibody, clon 43^a3, anti-CD29) y **CD29** (Alexa Fluor® 700 anti-human CD29 Antibody, clon TS2/16). Para evaluar la presencia de marcadores de superficie hematopoyéticos se evaluó la expresión de los marcadores de superficie **CD14** (FITC anti-human Antibody CD14, clon 63D3); **CD31** (FITC anti-human CD31 Antibody, clon WM59), **CD34** (FITC anti-human CD34 Antibody, clon 561) y **CD45** (FITC anti-human CD45 Antibody, clon 2D1). Para evaluar la viabilidad celular se utilizó el fluorocromo BUV496-A (BioLegend®)

Las muestras seleccionadas para el análisis de marcadores de superficie fueron las siguientes: Pasaje de replicación 1, 3 y 8 (P1, P3 y P8, respectivamente). En este caso, las poblaciones P1, P3 y P8 fueron cultivadas en 10% de FBS (pero en 20% antes de ser replicadas). Mientras que la población P1' fue cultivada siempre en 20% de FBS tal como describe Gronthos y colaboradores.

Para el análisis de citometría de flujo, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente tripsinizadas (TrypLE™ Express 1X, Gibco®) y resuspendidas en medio DMEM (1x) + GlutaMAX™ (Gibco®), con 10% de FBS (HI FBS, Gibco®). Las células en suspensión fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm. Se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 500µl de medio DMEM (1x) + GlutaMAX™ (Gibco®), con 10% de FBS (HI FBS, Gibco®) y se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados a una concentración de 0.5µg / 100µl de

medio durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadió 5 ml del medio de cultivo señalado previamente y se volvió a centrifugar durante 10 min a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células incubadas fueron resuspendidas en 500 µl de FBS filtrado (HI FBS, Gibco®) sin diluir.

Los datos obtenidos de la citometría de flujo fueron analizados por software de BD FACSDiva® 8.0.2. y Microsoft Excel™



Figura 5: Equipamiento para desarrollo de citometría de flujo

A: Equipo BD FACSAria™ III (BD Biosciences®). **B:** Equipo con software de análisis de datos BD FACSDiva® 8.0.2.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN IN VITRO

Se evaluó la capacidad de diferenciación *in vitro* de las poblaciones obtenidas de células pulpaes. Dado el origen ecto-mesenquimático (D'Aquino y cols., 2008) de las hDPSC, el interés y la línea de investigación del proyecto, se evaluó el potencial de diferenciación *in vitro* a linaje osteoblástico y neuronal. Las poblaciones en P3, cultivadas en medio suplementado con FBS al 10%. fueron las utilizadas para los procesos de diferenciación.

Diferenciación a linaje osteoblástico

Las células en P3 fueron tripsinizadas y sembradas a una densidad de 2×10^4 células/cm² en medio de cultivo secundario, sobre láminas de vidrio y pocillos tratados previamente con gelatina/PBS 0.1%. Luego de 24 horas, se lavó el cultivo tres veces con PSB 1X y se reemplazó el medio de cultivo secundario por medio de diferenciación, constituido por DMEM (1x) + GlutaMAX™, suplementado con 10% de FBS (HI FBS, Gibco®); 1% de amoxicilina/estreptomicina/anfotericina-b; 20ul/ml de ácido ascórbico; 10ul/ml de dexametasona; 10ul/ml β-glicerol-fosfato.

El proceso de diferenciación se realizó durante 21 días en incubadora a 37°C, 5% de CO₂. Durante ese período, el medio de diferenciación se cambió tres veces por semana (Janebodin y cols., 2011). Transcurridos los 21 días, las células fueron lavadas 2 veces con 1ml de PBS 1X y fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% PBS durante 30 minutos a 4°C.

El mismo proceso de diferenciación se realizó con poblaciones celulares cargadas en matrices de ácido poliláctico (cultivo 3D). Para ello, 200.000 células fueron cargadas en las matrices y analizadas como se describe a continuación.

La presencia de nódulos de mineralización ósea asociados al proceso de diferenciación osteogénica de las células se determinó por medio de la tinción con rojo alizarina (Ovchinnikov, 2009). Brevemente: las células fijadas fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, e inoculadas con el colorante Rojo Alizarina 40mM en NaH₂PO₄ 0,1 M pH 4,3 (Sigma©) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron nuevamente lavadas 3 veces con agua bidestilada. Se adquirieron las imágenes con microscopio óptico invertido de contraste de fase Olympus IX51® (Zeiss, Primo Vert®) para su análisis.

Paralelamente, se evaluó la diferenciación de las células en cultivo 2D mediante técnica de inmunofluorescencia para **osteocalcina humana**; como control de morfología celular se utilizó la detección de f-actina en el citoplasma (rodamina/faloidina) y ubicación de núcleos (DAPI), según protocolo de Laboratorio de Histo-Morfología Oral de la FOUC (Anexo 4).

Diferenciación a linaje neuronal

Las células en P3 fueron tripsinizadas, resuspendidas y sembradas en medio Neurobasal™ (Gibco®) suplementado con B27™ 1X (Invitrogen-Gibco: 12587-010), ácido retinoico 5 µM/mL, 2mM de glutamina y 50 U/mL de penicilina/estreptomicina. La densidad de inoculación fue de 3×10^4 células/cm² en láminas de vidrio, previamente tratadas con Poli-L-Lisina/Laminina (Sigma P7280-5MG/Sigma L2020-1MG, Gibco®) a concentración de 33µl poli-L-Lisina/3 µl laminina por mL de PBS durante 2 horas a temperatura ambiente.

El proceso de diferenciación se realizó durante 17 días en incubadora a 37°C, 5% de CO₂, en ese periodo el medio de diferenciación se cambió cada dos días (protocolo adaptado de Gaspard y cols., 2009).

Se evaluó la diferenciación neuronal de las células mediante técnica de inmunofluorescencia para **proteína NeuN y Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)**; como control morfológico celular se utilizó la detección nuclear (DAPI), todo según protocolo de Laboratorio de Histo-Morfología Oral de la FOUC (Anexo 5).

ELABORACIÓN DE CONSTRUCTOS

Para la elaboración de los constructos, se utilizó ácido poliláctico (*poly-lactic acid*, PLA) (Figura 6, A) como matriz o andamiaje. Se prepararon matrices de PLA de aproximadamente 1mm de espesor y de 3.5mm de diámetro (Figura 6, B).

Luego de obtener las matrices, las células cultivadas en P3 fueron tripsinizadas, resuspendidas y centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos (Universal 320R, Hettich©). A continuación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo secundario a una concentración de 20.000 células/ μ l, cargando las matrices con 10 μ l/matriz (Figura 6, C), (200.000 células por constructo aprox). Los constructos cargados con células se llevaron a incubadora a 37°C y atmosfera con 5% de CO₂ durante 45 min para permitir que las células se adhieran a la matriz. Luego se agregó 1ml de medio de cultivo y dejó incubar por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó la inducción osteogénica de las células pulpares con DMEM (1x) + GlutaMAX™, suplementado con 10% de FBS (HI FBS, Gibco®); 1% de amoxicilina/estreptomicina/anfotericina-b; 20ul/ml de ácido ascórbico; 10ul/ml de dexametasona; 10ul/ml B-glicerol-fosfato. Se incubaron en este medio por 48 horas a 37°C en ambiente con 5% de CO₂ para su posterior implantación.

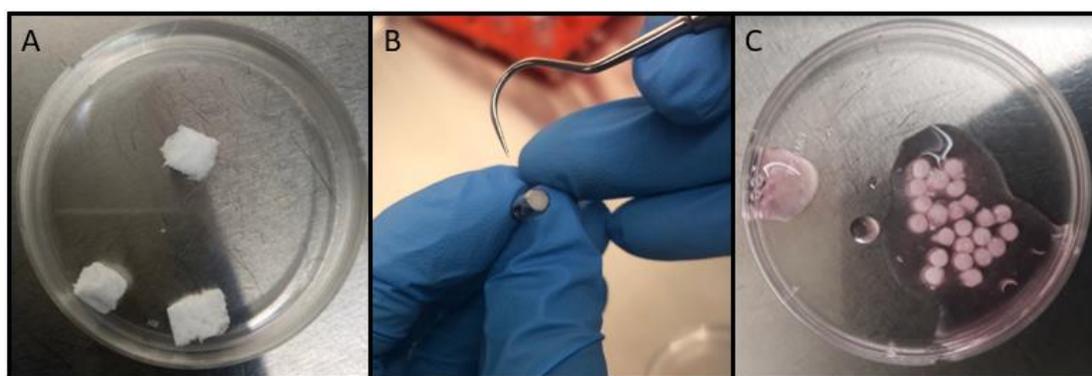


Figura 6: Procedimiento para elaboración de constructos

A: Trozos de PLA sin procesar. **B:** Trefina y en su punto central una matriz de PLA de 3,5mm (Referencia N.º: 37153, Nobel Biocare©). **C:** Matriz con células recién cargadas en su estructura para la formación del constructo con células pulpares humanas.

PROTOCOLO DE IMPLANTACIÓN DE CONSTRUCTO CON CELULAS PULPARES HUMANAS EN DEFECTO CRITICO DE CALOTA DE RATÓN.

ANIMALES

Todos los procedimientos propuestos para el tratamiento y cuidado de los animales fueron aprobados por el CICUA de la FOUCh (ver Anexo 6) y el Comité Institucional de Bioseguridad de la Universidad de Chile (Campus Norte) (ver Anexo 7).

El grupo de experimentación estuvo compuesto por ratones *Mus Musculus* NOD/SCID (*Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*). Se utilizó un total de 4 ratones macho adultos de 6 a 8 semanas, identificados con un sistema de microchip subcutáneo (Injectable Transponder 12mm Microchip with BioBond® Anti-Migration Cap) y sistema de scanner de lectura (Virbac BackHome V800). Estos ratones se caracterizan por una deficiencia inmune inducida genéticamente, homocigotos para la mutación del gen *Prkdc^{scid}* (comúnmente conocido como SCID), siendo deficientes de células B y células T. Poseen el timo, los ganglios linfáticos y los folículos esplénicos desprovistos de linfocitos, presentan hipogammaglobulinemia y un microambiente hematopoyético normal. Además, aceptan injertos alogénicos y xenogénicos, lo que los convierte en modelos ideales para experimentos de transferencia celular (The Jackson Laboratory, 2018).

Este tipo de ratón ha sido utilizado en distintas líneas investigativas, como por ejemplo: observación de formación ósea (Dreyer y cols., 2017; Li, C. y cols., 2016; Nakajima y cols., 2018), recuperación hematopoyética (Rahmig y cols., 2016; Tian, Liang & Zhang, 2016), reconstrucción de tejido neuronal (Uchida y cols., 2017), entre otras.

PROTOCOLO QUIRÚRGICO PARA ELABORACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS DE TAMAÑO CRÍTICO E IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS PULPARES.

Las cirugías fueron realizadas por la Dra. Soledad Acuña Mendoza en las dependencias del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, brevemente:

Cada animal fue pesado y anestesiado mediante una inyección subcutánea de Ketamina/Xilacina 100 mg/kg y 20 mg/kg respectivamente. Para corroborar el efecto anestésico de los fármacos se verificó la ausencia de reflejo pulgar.

Bajo campana de flujo laminar, se realizó una incisión lineal con una hoja de bisturí número 15 y se expuso la región parietal del cráneo del animal. Se realizaron dos defectos críticos (DC) sin comprometer las suturas de la calota, paralelos a la línea media (Figura 7, A). Los defectos se realizaron con pieza de mano y contraángulo a baja velocidad y con trefina de 3.5 mm (Figura 7, B) (GuidedTissue Punch for NP-sleeve, Ref. n° 37153, Nobel Biocare©) como ha sido previamente descrito en la literatura (Seo y cols., 2008; Ma y cols., 2015)

Una vez realizados los DC, se implantó el constructo con células pulpares (Figura 7, C). Los constructos fueron manipulados con pinza anatómica estéril, procurando mantener su estructura tridimensional sin alteraciones. Se posicionó el constructo en el área del DC sin ejercer presión en sentido axial del defecto.

Luego, se reposicionó el colgajo y suturó el tejido blando con punto simple (Figura 7, D), usando sutura reabsorbible marca Vicryl 5-0 (Ethicon®). Inmediatamente después de la intervención, se aplicó una inyección subcutánea de Paracetamol líquido (200 mg/kg). El operador portó durante todo el procedimiento quirúrgico: guantes, máscara, gorro, lentes de protección y delantal.

El esquema de implantación de los constructos se describe en Figura 8.

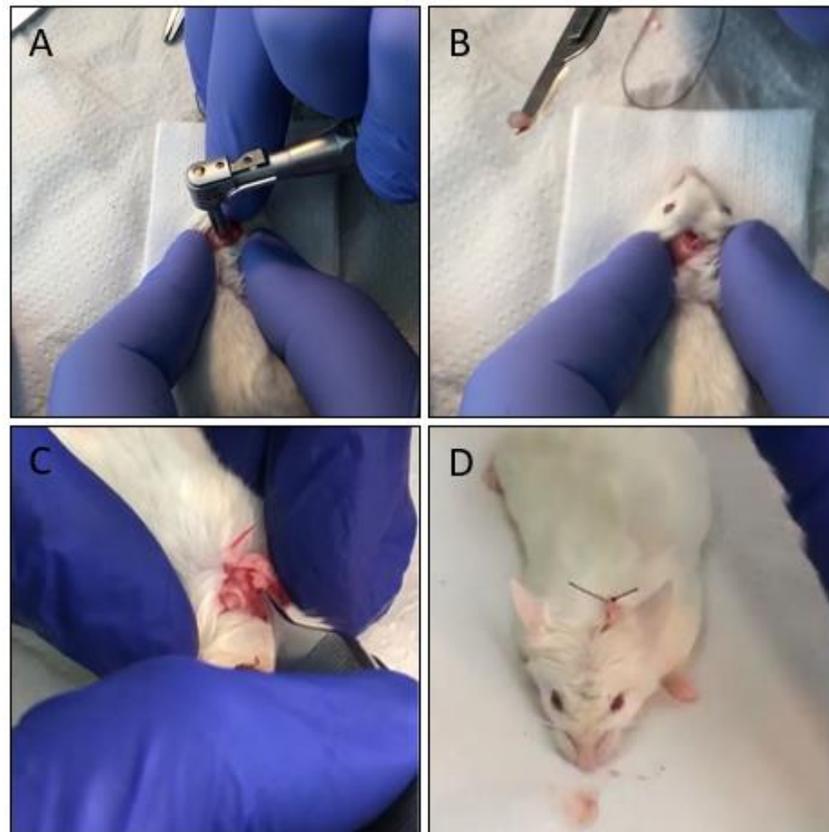


Figura 7: Procedimiento quirúrgico de defecto crítico de calota de ratón e implantación de constructo con células pulpares

A: Realización de defecto crítico en hueso parietal derecho con instrumental rotatorio. **B:** Retiro de porción de calota de 3,5 mm de diámetro y aprox. 0,5 mm de espesor. **C:** Posicionamiento de constructo con células pulpares. **D:** Sutura de colgajo mediante punto simple

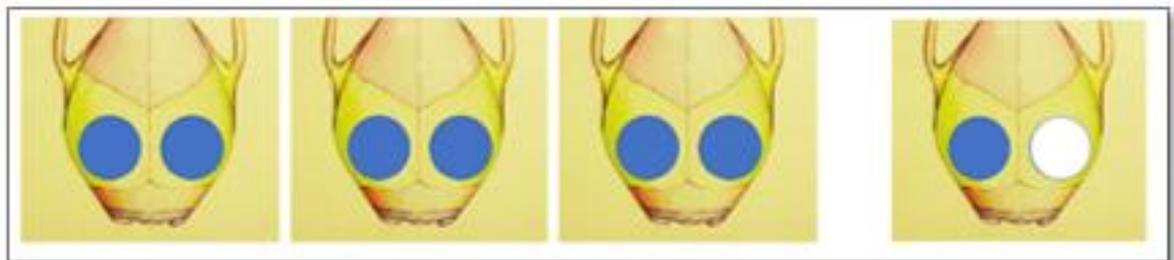


Figura 8: Esquema de defectos críticos en calota de ratón y recuperación de muestras.

Esquemas de las muestras recuperadas a los 30 días. En azul: defectos críticos tratados con células pulpares. En blanco: defectos críticos sin células pulpares.

CUIDADOS POSTOPERATORIOS

En las visitas post cirugía se evaluaron los aspectos que están detallados en la hoja de visita periódica o Protocolo de Supervisión para Roedores modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985) (ver anexo 8). En caso de constatar sufrimiento del animal se debía practicar la eutanasia de este mediante dislocación cervical bajo anestesia.

RECUPERACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS HISTO-MORFOLÓGICO

Los ratones operados fueron sacrificados mediante dislocación cervical bajo anestesia a los 30 días después de la cirugía de DC, según esquema señalado en Figura 8.

Los cráneos de los animales fueron disecados en placa fría, liberando el tejido óseo de todos los tejidos blandos. Los cráneos se fijaron por inmersión con solución de formalina al 10% en PBS (pH 7,4) durante 48 horas a 4°C. Luego, se realizó la desmineralización del tejido óseo en una solución acuosa de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% pH 7.4, durante tres periodos de 28 ciclos de 2 minutos en microondas, para acelerar el proceso de desmineralización, intercaladas por periodos de enfriamiento (Arana-Chavez & Nanci, 2001).

Los cráneos así desmineralizados se prepararon para su inclusión en parafina. Las muestras fueron lavadas en dos baños sucesivos de tampón PBS en 24 horas y luego se introdujeron en la máquina procesadora de tejidos donde fueron deshidratadas en alcohol de grado creciente desde 70° a 100°, aclaradas en 2 baños de xilol y uno de acetato de butilo y luego impregnadas en dos baños de parafina líquida.

Finalmente, las muestras fueron incluidas en parafina nueva en el centro de inclusión, colocando la muestra según la orientación deseada de corte, dejando solidificar la parafina en platina fría.

Se realizaron cortes seriados de 5 µm con un micrótopo fijo tipo Minot (Reichert-Jung Mod 1130®) con mecanismo de rotación. Se recuperaron los cortes histológicos en portaobjetos convencionales (LaborGlärer®) mediante sistema de

flotación en baño de agua destilada (mod. 395, LipShaw®) entre 38°C y 40°C de temperatura. Luego, los cortes fueron secados en estufa (UM 600, Memmert®) a una temperatura de 60°C por 24 horas.

Los cortes fueron desparafinados mediante baños de 10 min. en xilol (2 baños), alcohol 100° (2 baños), alcohol 95° (2 baños) y agua destilada (2 baños), y preparados para tinción con Hematoxilina-Eosina y con Tricrómico de Masson-Goldner, según técnica empleada en Laboratorio de Histo-Morfología Oral de la FOUC. (Ver anexo 9 y 10, respectivamente)

Los cortes teñidos fueron observados y fotografiados a aumentos de 5x, 10x y 40x, usando un microscopio óptico Zeiss® Axio Lab A1, con una cámara digital Canon® EOS Rebel-T3, montada para microscopio (Figura 9), con software EOS Utility para transferencia de imágenes.



Figura 9. Cámara digital Canon® EOS Rebel-T3, montada en microscopio óptico Zeiss® Axio Lab. A1 y computador para obtención y procesamiento de imágenes.

RESULTADOS

RESULTADO 1: OBTENCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DE PULPA DENTARIA HUMANA

Las condiciones de extracción y cultivo de tejido pulpar desarrolladas en el laboratorio de Histo-Morfología Oral de la FOUC permitieron obtener cultivos primarios de poblaciones celulares heterogéneas, a partir de la pulpa dentaria terceros molares de paciente sistémicamente sanos.

Luego de los procesos de digestión mecánica y enzimática, se obtuvieron las primeras poblaciones celulares después de 3 a 5 días (Figura 10, A), las cuales migraron desde los explantes de tejido pulpar. A los 10 días de cultivo (Figura 10, B), la confluencia celular alcanzaba aproximadamente el 80% alrededor del tejido pulpar, por lo que se realizó la primera replicación de cultivo. En ese momento se obtuvo una suspensión de células unitarias las que se sembraron a una densidad de 150.000 células/cm² (Figura 10, C), lo que permitió, después de 5 días, tener un tapiz celular con aproximadamente 80% de confluencia (Figura 10, D). En este estado se volvió a replicar el cultivo. En esas condiciones de cultivo de 2 dimensiones, las poblaciones celulares presentaron un comportamiento y morfología compatible con células progenitoras: capacidad de adherencia al plástico y morfología romboidal heterogénea, con extensas prolongaciones citoplasmáticas, similar a un fibroblasto.

Aproximadamente a partir del pasaje de replicación P8, se comenzó a evidenciar una disminución en la velocidad de división celular (mayor tiempo para alcanzar la confluencia), y un cambio en la morfología de las células cultivadas (datos no mostrados).

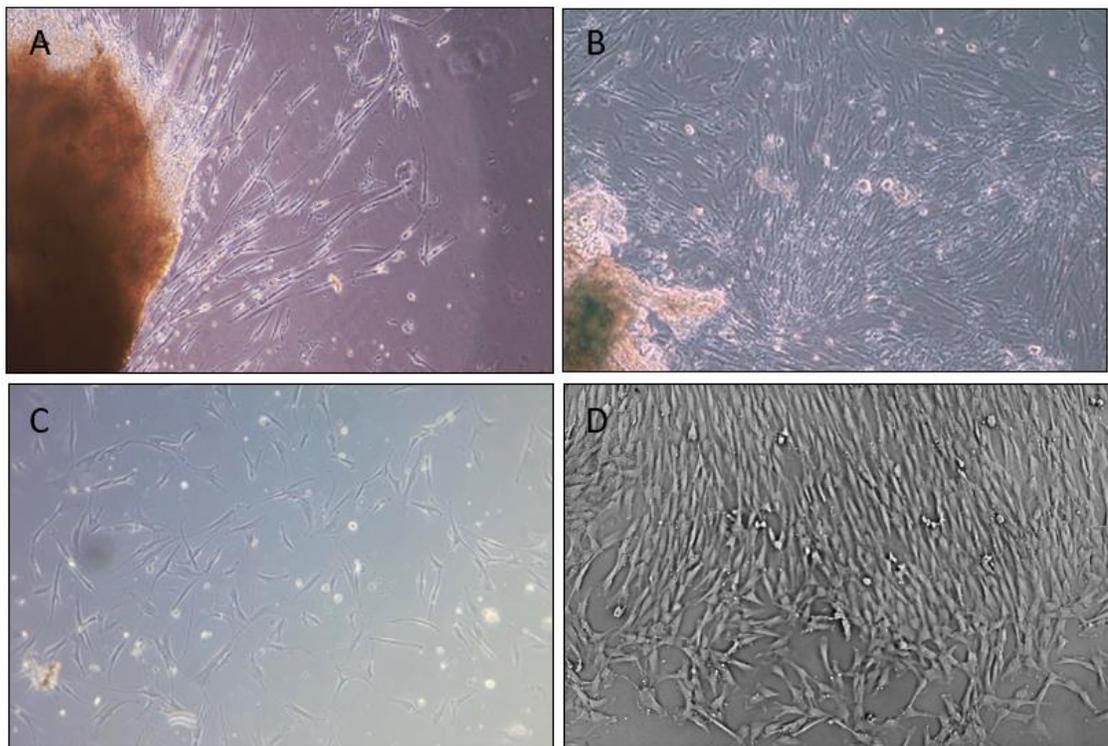


Figura 10. Cultivo primario de células pulpares humanas. Microscopio invertido, contraste de fase

A y B, Poblaciones celulares a P0: **A:** Migración de células desde explantes pulpares 3-5 días después del inicio del cultivo celular. Aspecto de “rayos de sol” (Microfotografía 10x). **B:** Confluencia de 80% aproximadamente, 10 días después de iniciado el cultivo celular. Se observa la formación de cúmulos celulares y persistencia del explante pulpar (Microfotografía 5x). **C y D:** Poblaciones celulares en P1: **C:** Cultivo celular inmediatamente posterior a replicación de cultivo (150.000 células /cm² (Microfotografía 10x). **D:** Cultivo celular 5 días después de replicación, presentando una confluencia celular cercana al 80% (Microfotografía 10x).

RESULTADO 2: LAS POBLACIONES CELULARES OBTENIDAS PRESENTAN CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS DE MSC

RESULTADO 2.1. LAS CÉLULAS OBTENIDAS EN P3 PRESENTAN LA MAYOR EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MSC

Luego de tres cultivos independientes se obtuvieron 5 muestras de poblaciones celulares a distintos pasajes (entre P1, P3 y P8), en las cuales se analizó la expresión de marcadores de superficie de MSC mediante citometría de flujo.

En el cultivo en pasaje 3 (P3) se lograron las mejores condiciones para obtener una población celular con características de células madre mesenquimales. Las condiciones que permitieron obtener esa población fueron: iniciar el cultivo con un 20% de FBS y luego bajar la concentración a 10% de FBS a partir de la primera replicación (P1).

El detalle de los perfiles celulares más representativos, en las distintas condiciones de cultivo y replicación, se muestran en las figuras 11 a 14.

En el perfil de citometría de flujo de la Figura 11, se observó que al mantener el 20% de concentración de suero durante todo el cultivo (P1'), el 51,2% del total de células viables analizadas, tuvo una expresión positiva de marcadores hematopoyéticos (CD14, CD31, CD34 y CD45). Mientras que la población hematopoyética negativa (48,8% de células viables), mostró un perfil de expresión positiva para marcadores MSC de 99,5% para CD73; 90,0% para CD90; 60,0 % para CD105 y 67,9% para CD29.

Al modificar la concentración de suero al 10% dentro del cultivo, a partir de la primera replicación (P1), el perfil de citometría de flujo de las células en P1 (Figura 12) mostró una caída de células hematopoyéticas (2,7% de células viables analizadas). Mientras que la población hematopoyética negativa (97,3% de células viables), mostró un perfil de expresión positivo para marcadores MSC del 97.6% para CD73; 83% para CD90; 61% para CD105 y 77,8% para CD29.

Dados estos resultados, se mantuvo la concentración de suero al 10% en el resto de las replicaciones para purificar el cultivo hacia una línea hematopoyética negativa. En esas condiciones, se analizó los cultivos en P3 y P8.

El perfil de citometría de flujo de las células en P3 (Figura 13) mostró una caída de células hematopoyéticas (0,3% de células viables analizadas) (Gráfico 1). Mientras que la población hematopoyética negativa (99,7% de células viables), mostró un perfil de expresión positivo para marcadores MSC del 95.9% para CD73, 93.2% para CD90, 93.5% para CD105 y 93.3% para CD29.

Estos resultados muestran que el aumento en la expresión de marcadores mesenquimáticos fue la principal diferencia entre el pasaje P1 y P3, los cuales fueron ambos cultivados con un 10% de suero.

En relación a la expresión conjunta de marcadores, se observó que el 100% de las células CD90, CD105 y CD29 positivas, expresaban también el marcador CD73 (Figura 13 C, D, E, Gráficos de dispersión).

Finalmente, el perfil de citometría de flujo de las células en el pasaje de cultivo P8 (Figura 14), mostró que la población hematopoyética negativa (34,6% de células viables) tuvo una pérdida de expresión de marcadores mesenquimáticos, ya que sólo hubo un 43.1% de expresión positiva para CD73; 17,9% para CD90; 35,0% de CD29 y un 6,7% para CD105.

Un resumen de los datos cuantitativos es mostrado en la Tabla N°2.

En relación a la reproductividad de los resultados, para eliminar la contaminación de células hematopoyéticas, se evidenció que en los pasajes P1' al 20% y P1 al 10% existió una gran variabilidad en las poblaciones obtenidas (Gráfico 1, ver desviación estándar), no siendo reproducible el enriquecimiento del cultivo en células no hematopoyéticas a ese pasaje (desviación estándar muy amplia). Por el contrario, al pasaje 3 (P3), las poblaciones obtenidas presentaron un porcentaje homogéneo en el nivel de expresión de marcadores no hematopoyéticos (con una desviación estándar de 0.08) (Gráfico 1), logrando de modo reproducible, un cultivo enriquecido en células mesenquimáticas (Figura 13) con una expresión promedio del 93,8% de marcadores de célula madre mesenquimática (Tabla N°2).

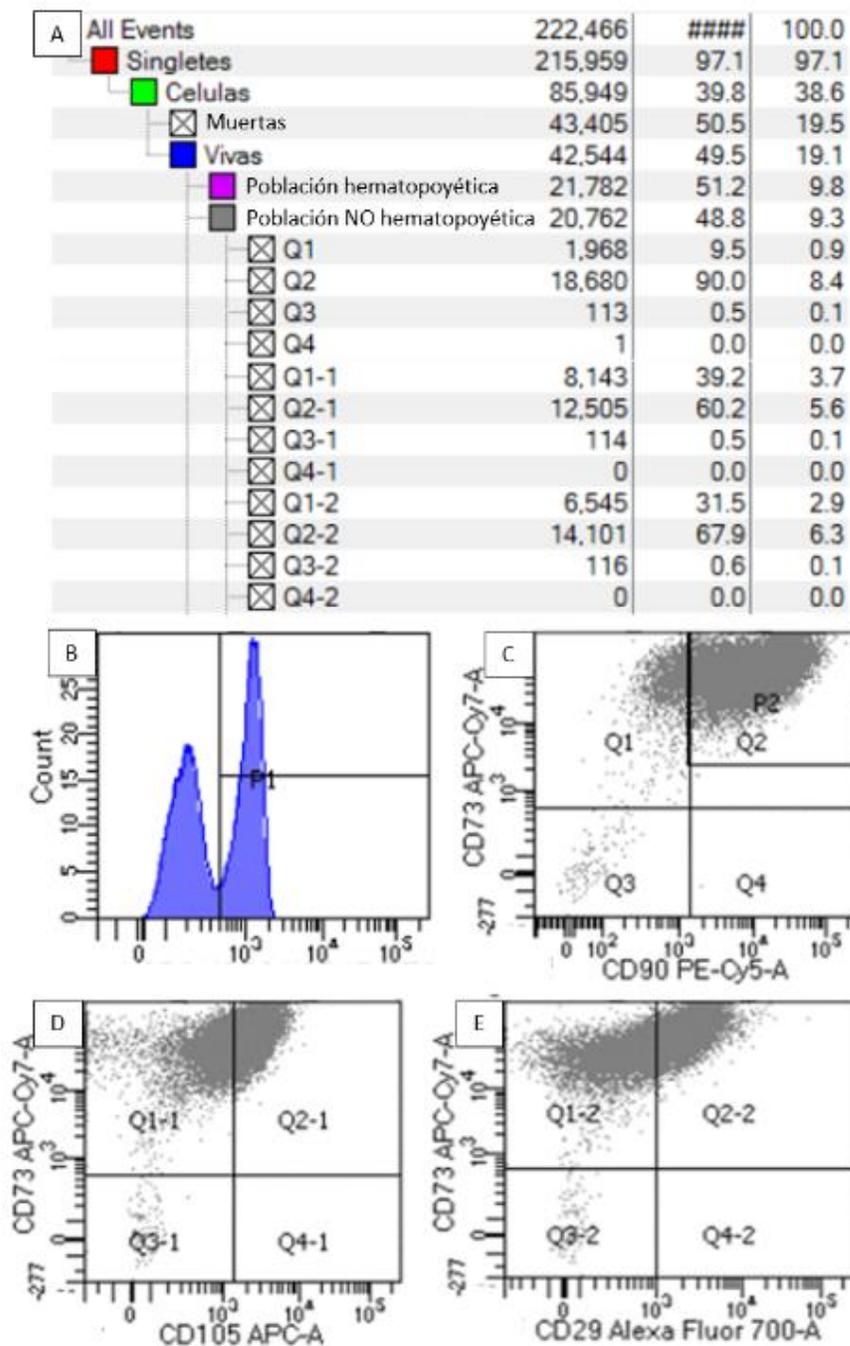


Figura 11: Expresión de marcadores mesenquimáticos de una población de celulares pulpares cultivadas en 20% de FBS en pasaje 1 (P1) analizadas en citometría de flujo.
A: Resultados cuantitativos de la expresión de marcadores hematopoyéticos y no hematopoyéticos. **B:** Histograma representativo de células viables hematopoyéticas y no hematopoyéticas: 51,2% positivas a marcadores de superficie hematopoyéticos (CD14, CD31, CD34 Y CD45) y 48,8% no hematopoyéticas. **C, D y E:** Población no hematopoyética bajo la expresión de marcadores de superficie de célula madre mesenquimática (CD73 y CD90, CD105 y CD29). **C:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD90 (Q2, 90% de expresión). **D:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD105 (Q2-1, 60,2% de expresión). **E:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD29 (Q2-2, 67,9% de expresión).

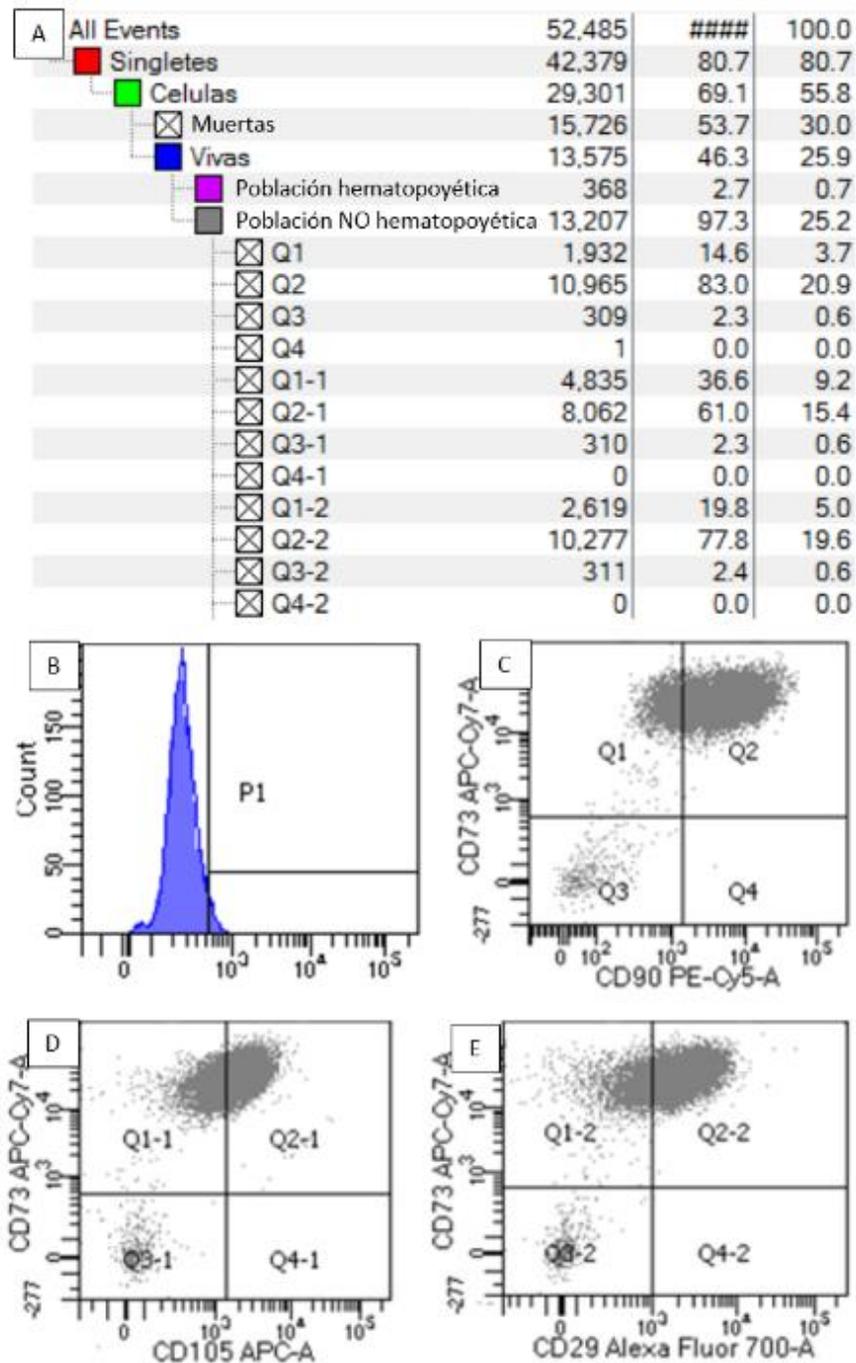


Figura 12: Expresión de marcadores mesenquimáticos de una población de celulares pulpaes cultivadas en 10% de FBS en pasaje 1 (P1) analizadas en citometría de flujo.
A: Resultados cuantitativos de la expresión de marcadores hematopoyéticos y no hematopoyéticos. **B:** Histograma representativo de células viables hematopoyéticas y no hematopoyéticas: 2,7% positivas a marcadores de superficie hematopoyéticos (CD14, CD31, CD34 y CD45) y 97,3% no hematopoyéticas. **C, D y E:** Población no hematopoyética bajo la expresión de marcadores de superficie de célula madre mesenquimática (CD73 y CD90, CD105 y CD29). **C:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD90 (Q2, 83% de expresión). **D:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD105 (Q2-1, 61% de expresión). **E:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD29 (Q2-2, 77,8% de expresión).

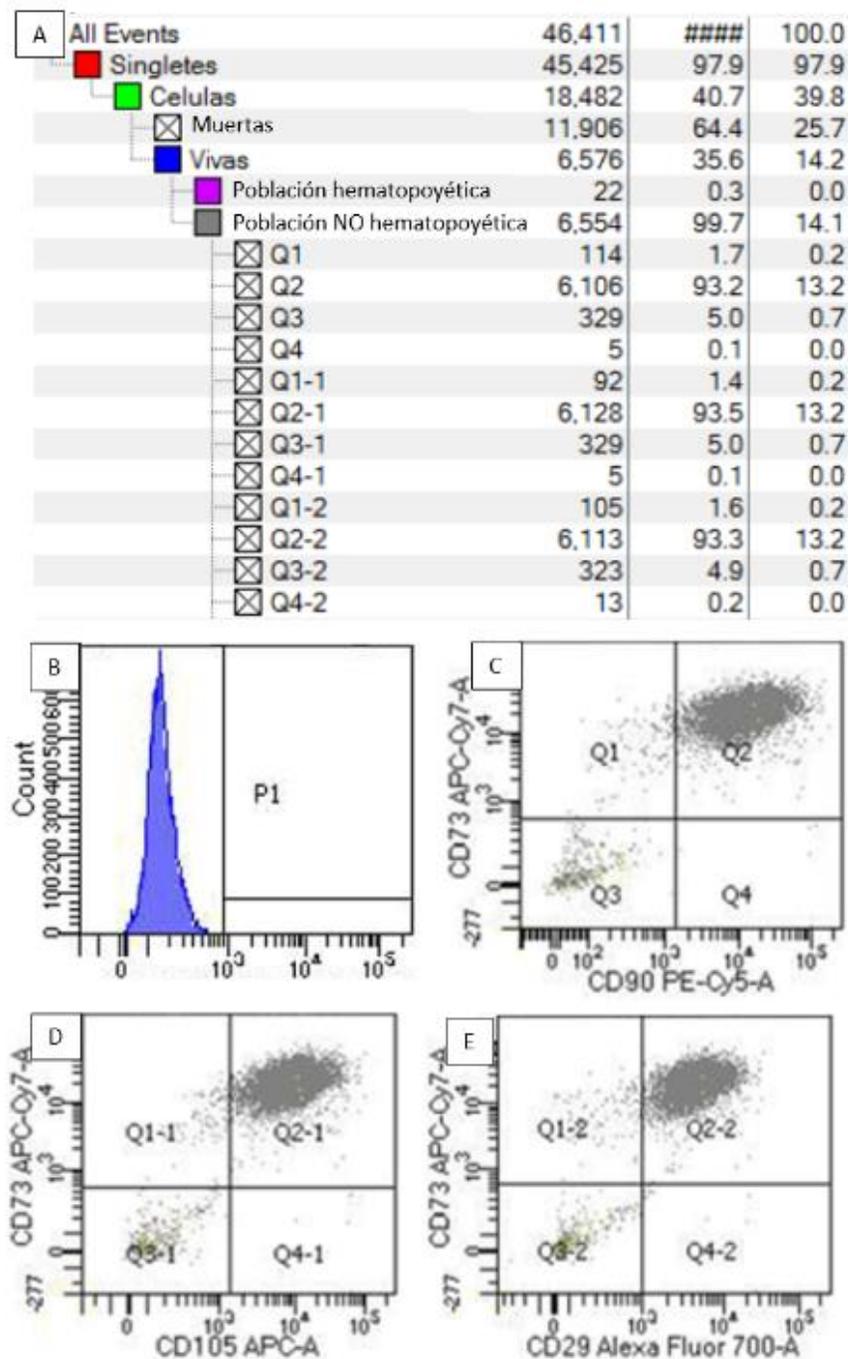


Figura 13: Expresión de marcadores mesenquimáticos de una población de celulares pulpaes cultivadas en 10% de FBS en pasaje 3 (P3) analizadas en citometría de flujo.
A: Resultados cuantitativos de la expresión de marcadores hematopoyéticos y no hematopoyéticos. **B:** Histograma representativo de células viables hematopoyéticas y no hematopoyéticas: 0,3% positivas a marcadores de superficie hematopoyéticos (CD14, CD31, CD34 Y CD45) y 99,7% no hematopoyéticas. **C, D y E:** Población no hematopoyética bajo la expresión de marcadores de superficie de célula madre mesenquimática (CD73 y CD90, CD105 y CD29). **C:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD90 (Q2, 93,2% de expresión). **D:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD105 (Q2-1, 93,5% de expresión). **E:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD29 (Q2-2, 93,3% de expresión).

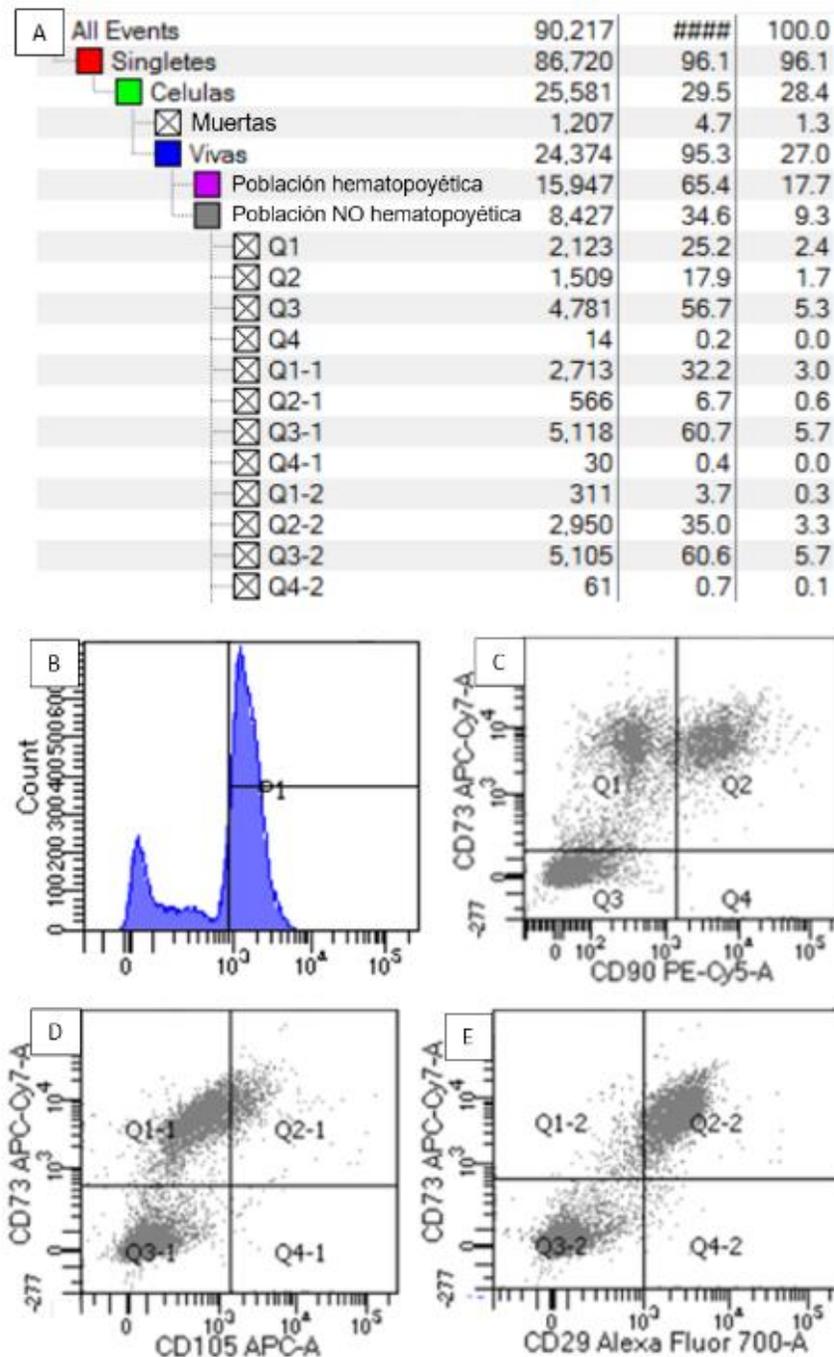
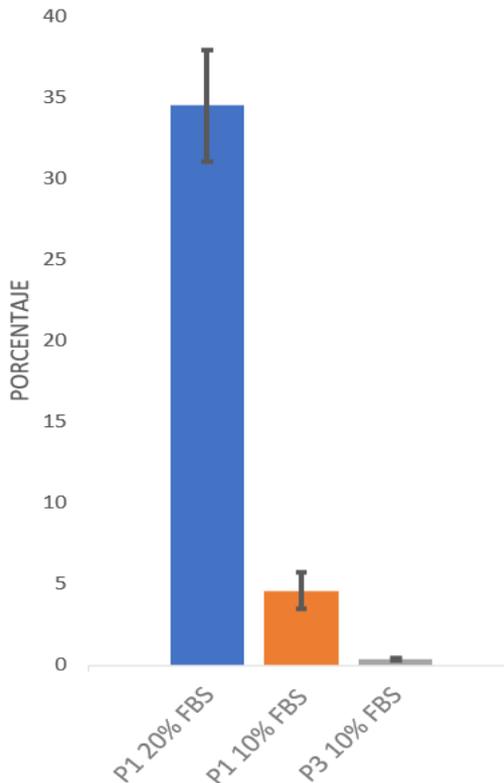


Figura 14: Expresión de marcadores mesenquimáticos de una población de celulares pulpares cultivadas en 10% de FBS en pasaje 8 (P8) analizadas en citometría de flujo.

A: Resultados cuantitativos de la expresión de marcadores hematopoyéticos y no hematopoyéticos. **B:** Histograma representativo de células viables hematopoyéticas y no hematopoyéticas: 65,42% positivas a marcadores de superficie hematopoyéticos (CD14, CD31, CD34 Y CD45) y 34,6% no hematopoyéticas. **C, D y E:** Población no hematopoyética bajo la expresión de marcadores de superficie de célula madre mesenquimática (CD73 y CD90, CD105 y CD29). **C:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD90 (Q2, 17,9% de expresión). **D:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD105 (Q2-1, 6,7% de expresión). **E:** Diagrama de dispersión de la expresión conjunta de CD73 y CD29 (Q2-2, 35% de expresión).

Gráfico 1.
Contaminación por células hematopoyéticas en los cultivos de células pulpaes



Células hematopoyéticas positivas (media del % de expresión) al interior de los cultivos de células pulpaes humanas en las distintas condiciones de cultivo y pasajes de replicación (n=5 por cada variable) analizadas en citometría de flujo.

Marcador de superficie	P1 20% FBS	P1 10% FBS	P3 10% FBS	P8 10% FBS
CD73	99,50%	94,60%	94,90%	43,10%
CD90	90%	83%	93,30%	18,10%
CD105	60,20%	61%	93,60%	7,10%
CD29	67,90%	77,80%	93,50%	35,70%

RESULTADO 2.2. LAS POBLACIONES CELULARES OBTENIDAS PRESENTAN POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICO Y NEURONAL IN VITRO

Una vez obtenida una población celular que presentaba características de MSC, se evaluó la capacidad de diferenciación *in vitro* a linaje osteogénico y neuronal.

La diferenciación osteogénica se realizó durante 21 días en 2 y 3 dimensiones (2D y 3D, respectivamente), siendo un análisis fundamental para determinar las competencias osteogénicas de una población que sería implantada en un constructo tridimensional en la calota de un ratón.

En 2D, se observó la formación de nódulos de mineralización (Figura 16, A), y marcación positiva para coloración de rojo alizarina (Figura 16, B y C). También se observó expresión positiva para osteocalcina (Figura 16, E y F)

Para la diferenciación en 3D se confeccionaron constructos de la misma forma y dimensión de los defectos (Figura 17, A). Luego se sembraron las células al interior del constructo (Figura 17, B). Finalmente, después de 21 días de inducción osteogénica, las células secretaron una matriz positiva para rojo alizarina por formación de nódulos de mineralización que se distribuyeron entre las fibras del constructo. (Figura 17, C y D).

Considerando el origen embriológico de las células pulpares, derivadas del ectomesénquima de las células de la cresta neural, se realizó la diferenciación en 2D hacia un fenotipo neurogénico. Luego de 17 días de inducción, las células mostraron un marcaje positivo para GFAP y NeuN (Figura 18, C y F, respectivamente).

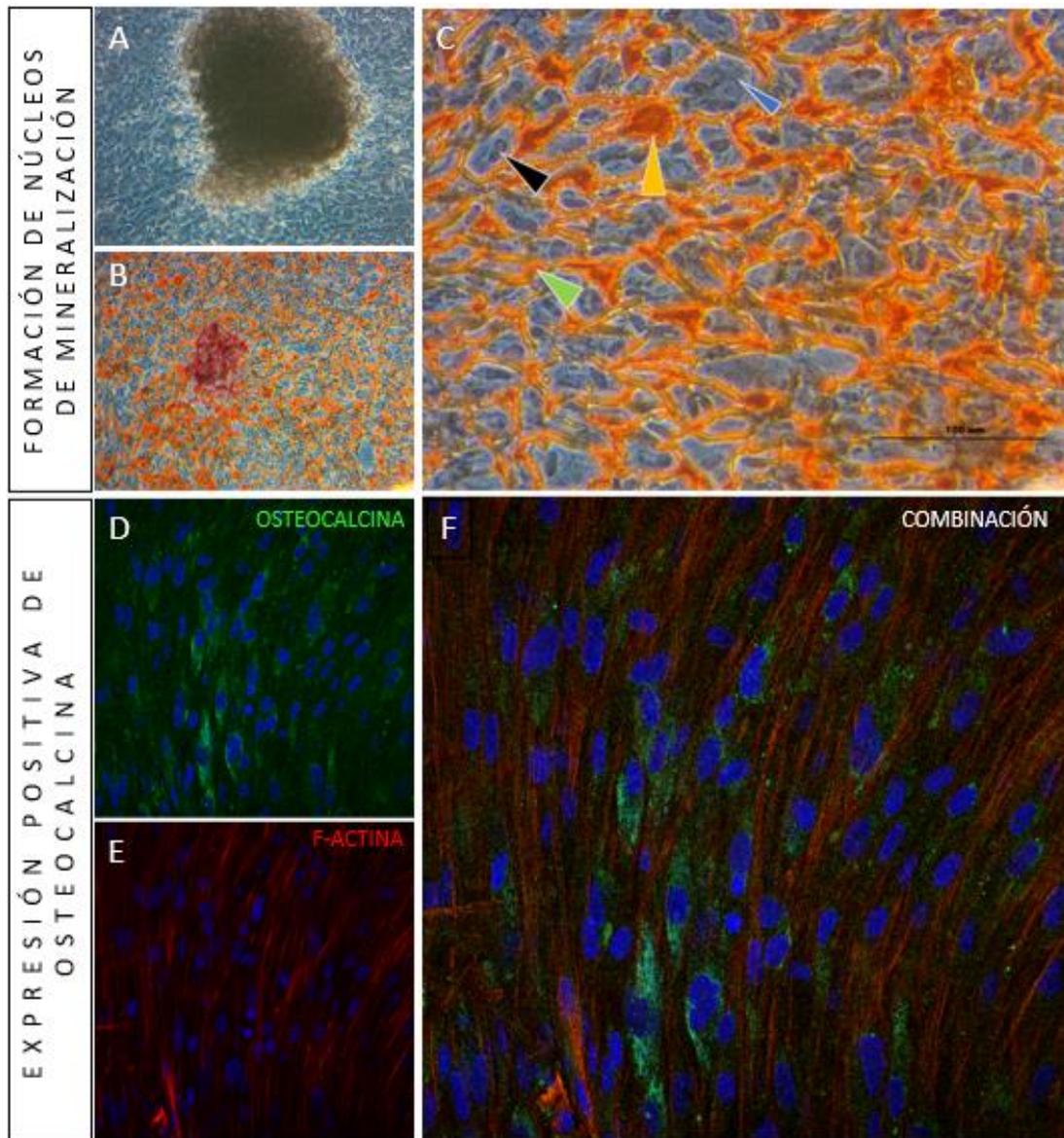


Figura 16: Población pulpar inducida a diferenciación osteogénica *in vitro*, dos dimensiones

A, B y C: Microscopio óptico convencional. **A:** Se observa formación de núcleo de mineralización (10x). **B:** Marcación positiva de matriz mineralizada con rojo alizarina (10x). **C:** A mayor aumento es posible observar núcleo celular (flecha negra), citoplasma (flecha azul); MEC positiva para tinción de rojo de alizarina, compatible con mineralización de la matriz (flecha verde); formación de núcleos de mineralización (flecha amarilla) (40x). **D, E y F:** Microscopio óptico confocal (40x). **D y F:** Poblaciones celulares pulpares positivas para osteocalcina. **E:** Citoesqueleto evidenciado por F-Actina positivo. **D-F.** Marcaje del núcleo celular con DAPI (azul).

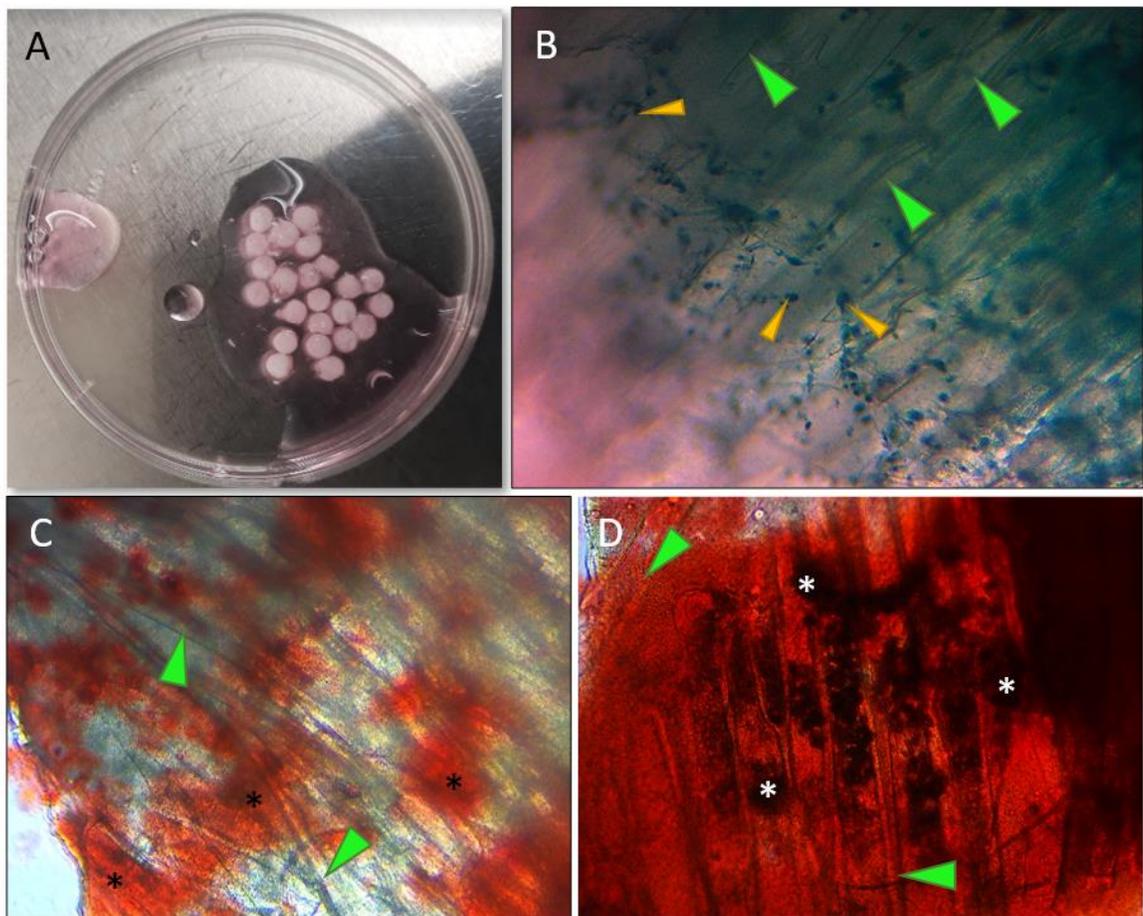


Figura 17: Población pulpar inducida a diferenciación osteogénica *in vitro*, tres dimensiones.

A: Constructo PLA cargado con células pulpares. **B, C y D:** Microscopio óptico invertido. **B:** Presencia de células (flecha amarilla) entre las fibras del constructo (flecha verde). **C-D:** Coloración positiva con rojo alizarina, indicador de una matriz mineralizada (asteriscos).

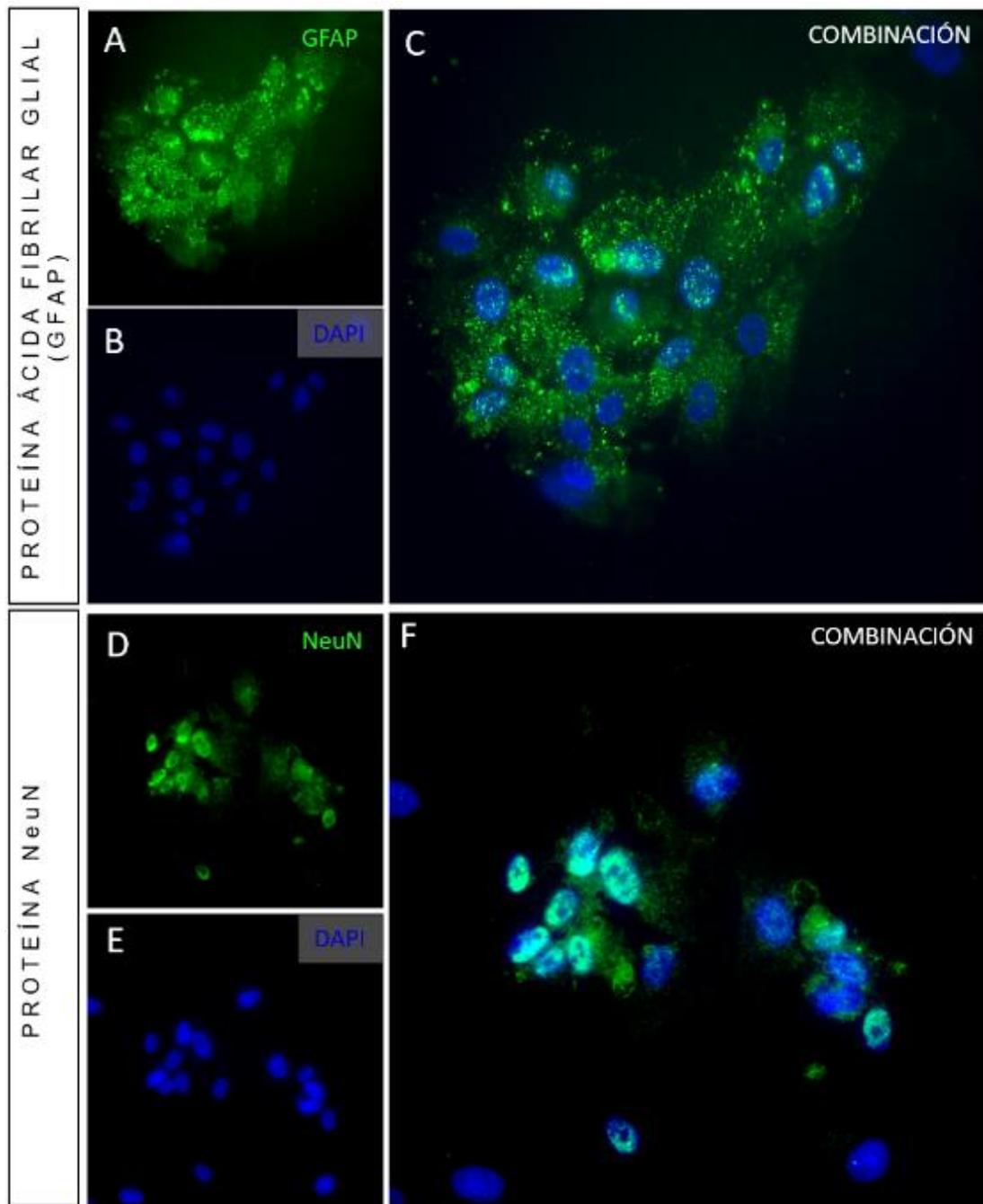


Figura 18: Población pulpar inducida a diferenciación neuronal *in vitro*, dos dimensiones. Microscopio óptico confocal. 40x.

A y C: Expresión positiva para proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (verde) distribuida en el citoplasma. **D y F:** Expresión positiva para la proteína NeuN (verde) localizada en el núcleo. **B, C, E y F:** Marcaje del núcleo celular con DAPI (azul).

RESULTADO 3. REGENERACIÓN DEL DEFECTO CRITICO MEDIANTE IMPLANTACIÓN DE CONSTRUCTO CON CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL HUMANA A 30 DÍAS.

En el control negativo de defecto crítico a 30 días post cirugía (Figura 19, A), se observaron los extremos del defecto crítico (Figura 19, B y C), y la presencia de un tejido fibroso que cierra el defecto, sin lograr la regeneración del mismo.

El tejido óseo nativo (línea blanca punteada) se observó mineralizado (tinción de color verde) y de morfología laminillar; presentando además zonas de tejido osteoide (tinción de color rojo), indicativo de proceso de remodelado óseo (Figura 19, B y C).

El tejido neoformado por parte del hospedero en el margen del defecto, presentó tejido osteoide (teñido de color rojizo) y vasos sanguíneos, el cual estaba en continuidad hacia el centro del defecto con un tejido fibroso, constituido por fibras de colágeno tipo I maduras (tinción azul) en relación directa con el tejido encefálico (ausencia de matriz osteoide) (Fernández, 2019).

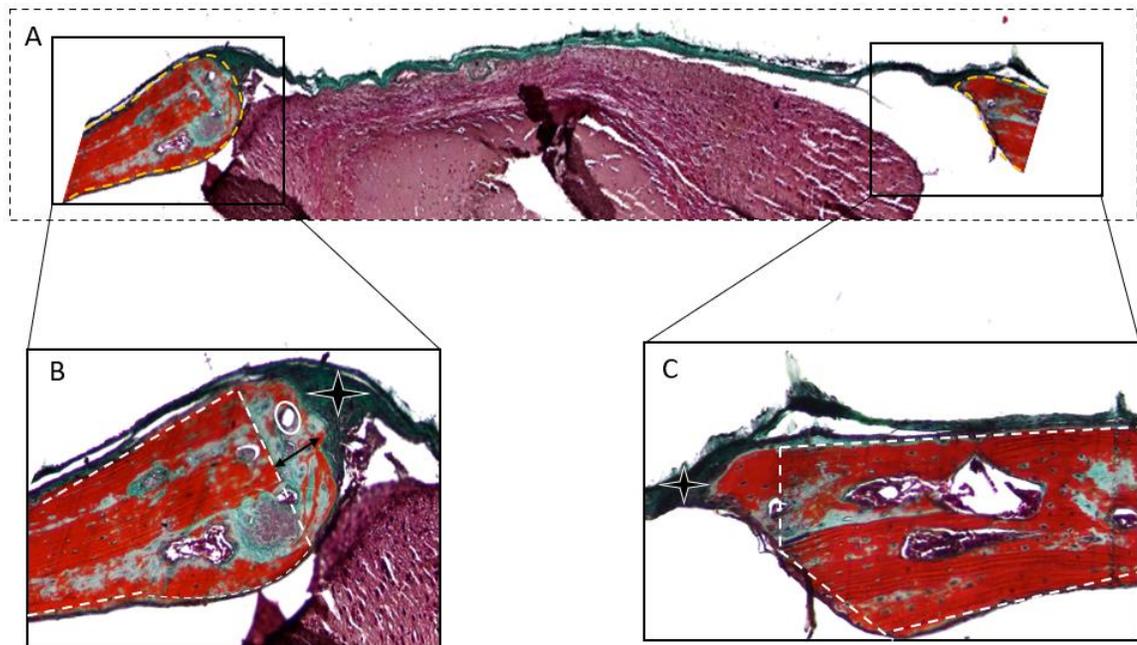


Figura 19: Control negativo de defecto crítico a 30 días post cirugía. Tricrómico de Masson-Goldner.

A: Visión general de defecto crítico. En los costados se aprecia los cabos de tejido óseo nativo y neoformado. Ambos cabos están unidos por una fina membrana de fibras colágenas maduras (verde) (5x). **B:** Se observa el tejido óseo nativo (cuadro blanco punteado) con predominio de tejido osteoide (rojo). Zona de hueso neoformado (flecha negra) con zonas de fibras colágenas maduras (verde), vasos sanguíneos (círculo blanco). Formación de tejido fibroso hacia el centro del defecto (estrella negra) (10x). **C:** Cabo contralateral presenta características similares a las observadas en B (10x).

En el grupo experimental, 30 días después de la implantación del constructo con células madre pulpareas, se observó cierre del defecto crítico mediante un tejido de aspecto trabecular (Figura 20, A), en estrecha relación con el tejido óseo de la calota y la masa encefálica del animal. A mayor aumento (Figura 20, B y D), los cabos del defecto mostraron similares características que en control negativo: hueso laminillar nativo continuado con tejido óseo neoformado por el hospedero, de características no laminillar (línea blanca punteada).

Se observó una continuación a través de tejido fibroso/colágeno entre el tejido óseo del hospedero y el constructo (Figura 20 B, D; Figura 21, A), y la coexistencia de diferentes tipos de tejidos con características fibro-condro-osteocitaria hacia el centro del defecto (Figura 20, C).

A mayor aumento, en el límite del hueso neoformado y el constructo se observó tejido fibroso (Figura 21, A) y un tejido de aspecto trabecular hacia el centro del defecto. En algunos sectores se observaron trabéculas mineralizadas similares a un hueso no laminillar, rodeadas de tejido osteoide por madurar (Figura 21, B), y en continuidad con un tejido fibroso que, a su vez, constituía trabéculas con una matriz colágena continua, abundante e irregular. También se observaron trabéculas cartilaginosas hacia el centro del defecto (Figura 20, C; Figura 21, C y D), en continuidad con trabéculas fibrosas hacia la periferia, con vasos sanguíneos de diverso calibre (Figura 21, E y F). En las trabéculas más periféricas, también se identificó mayor predominio de fibras colágenas organizadas y tejido osteoide, en estrecha relación con vasos sanguíneos y algunas células multinucleadas (Figura 21, F).

Utilizando la técnica de Tricrómico de Masson-Goldner, en una vista panorámica, se observó abundantes fibras colágenas maduras, y morfología compatible con una matriz provisional, hacia un trabeculado óseo (Figura 22, A).

A mayor aumento, el límite entre el hueso del hospedero y el constructo (Figura 22, B) mostró abundantes zonas de tejido fibroso y presencia de vasos sanguíneos (Figura 22, C).

Los núcleos de osificación presentes se observaron mayoritariamente con hueso no laminillar y con tejido osteoide en su periferia (Figura 22, D). Finalmente, las zonas con tejido cartilaginoso se observaron en estrecha relación a tejido óseo no laminillar y tejido fibroso (Figura 22, E)

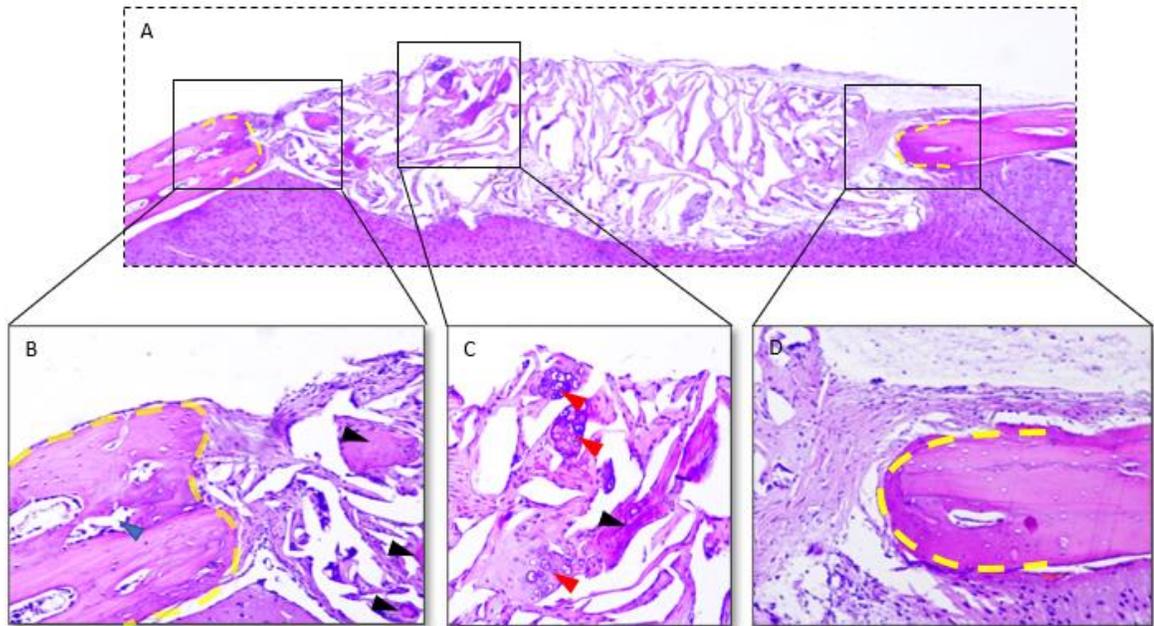


Figura 20: Defecto crítico a 30 días post implantación de hDPSCs. Tinción de H&E. Microscopio óptico convencional.

A: Vista panorámica de defecto crítico con constructo de hDPSC delimitado por tejido óseo de la calota del hospedero. Masa encefálica en la parte inferior (5x). **B:** Hueso nativo y hueso neoformado por parte del hospedero (línea amarilla) y vasos sanguíneos (flecha azul), en estrecha continuación con constructo implantado. En zona del constructo se puede apreciar la formación de núcleos de osificación (flecha negra) (10x). **C:** Islotes de cartílago (flecha roja) y núcleos de osificación (flecha negra) hacia el centro del defecto. **D:** Cabo contralateral con características similares.

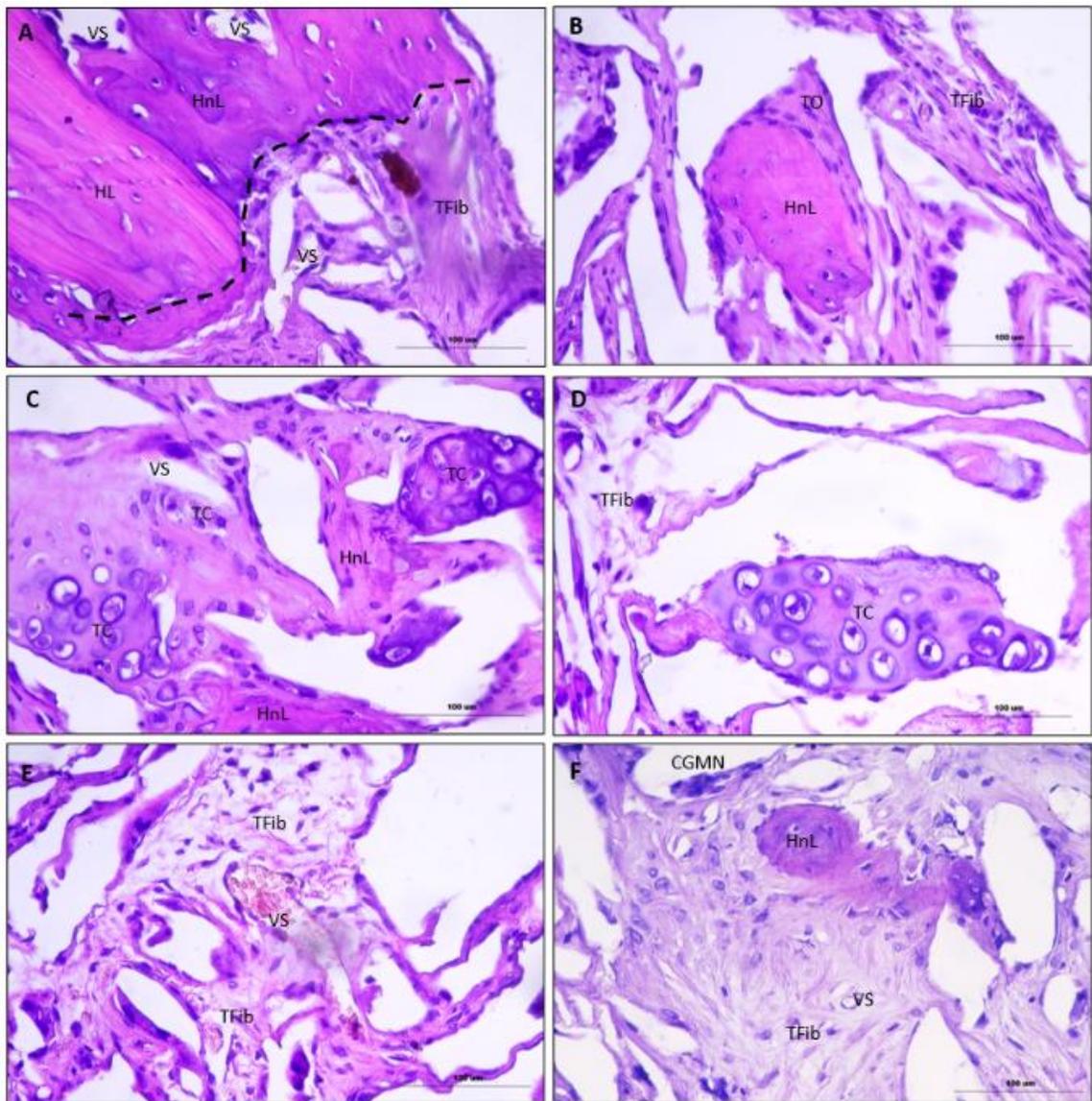


Figura 21: Tipos de tejidos encontrados al interior de defecto crítico a 30 días post implantación de hDPSC. Tinción H&E. 40X

A: Límite entre tejido óseo neoforado del hospedero y constructo (línea punteada). El hueso del hospedero muestra vasos sanguíneos (VS), hueso laminillar (HL) y pequeñas zonas de hueso no laminillar (HnL). En la zona del defecto se observa tejido fibroso (Tfib) y vasos sanguíneos (VS). **B:** Trabéculas de hueso no laminillar (HnL), rodeado por tejido osteoide (TO) y por tejido fibroso. **C y D:** Trabéculas de tejido cartilaginoso (TC), más hacia el centro del defecto, en relación a formación de hueso inmaduro (HnL), vasos sanguíneos (VS) y tejido fibroso (Tfib). **E:** Trabéculas de fibras colágenas organizadas, con presencia de vasos sanguíneos. **F:** Tejido fibroso con gruesos fascículos, tejido osteoide, hueso inmaduro y varias células gigantes multinucleadas (CGMN) asociadas.

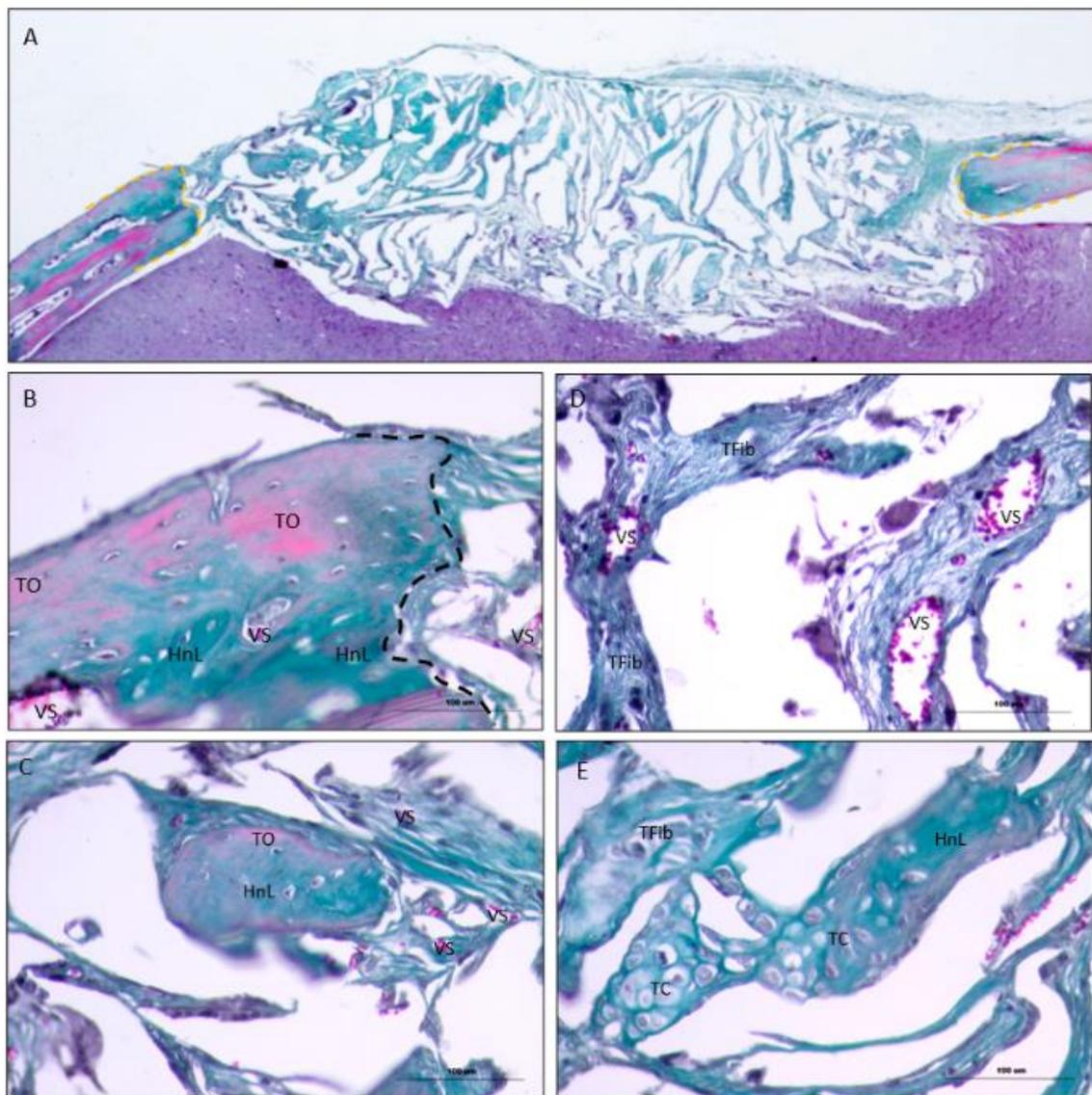


Figura 22: Defecto crítico a 30 días post implantación de hDPSC. Tricrómico de Masson-Goldner. Microscopio óptico convencional. 40x.

A: Vista panorámica de defecto crítico con constructo de hDPSC. Abundante predominio de fibras colágenas maduras, compatible con tejido óseo en formación en toda la extensión del defecto. **B:** Límite entre tejido óseo neoformado por el hospedero y el constructo (línea punteada). En zona de tejido neoformado se observa tejido osteoide (TO), vasos sanguíneos (VS) y porciones de tejido óseo no laminillar (HnL). **C:** Núcleo de osificación, con hueso no laminillar (HnL) en zona central y tejido osteoide (TO) más periférico; vasos sanguíneos (VS) y fibras colágenas maduras. **D:** Vasos sanguíneos (VS) en relación a zonas de tejido fibroso (TFib) de aspecto trabecular. **E:** Trabéculas de cartílago (TC) en relación a hueso no laminillar (HnL).

DISCUSIÓN

La medicina regenerativa es una disciplina que se ha desarrollado ampliamente en el mundo, que busca recuperar la función de tejidos u órganos perdidos o dañados en consecuencia a traumas, patologías o malformaciones congénitas, basándose en tres elementos clave, que son las señales morfogenéticas, biomateriales utilizados como andamiaje, y las células madre (Akter & Ibanez, 2016; Reddi & Iwasa, 2019).

Gracias al descubrimiento de las células madre pulpaes hace dos décadas por parte de Gronthos y colaboradores (Gronthos y cols., 2000), la disciplina odontológica se ha convertido en un actor relevante de la investigación en medicina regenerativa. En la actualidad se describen diversas metodologías para la obtención, purificación, mantención y almacenamiento de las poblaciones celulares, lo que se traduce en diferencias importantes al momento de obtener y comparar resultados para establecer protocolos reproducibles. Es por esta razón, que diseñar, implementar y evaluar protocolos, tanto para la obtención y cultivo de poblaciones celulares con propiedades de células madre; así como para el establecimiento de modelos *in vivo* de regeneración ósea es fundamental para iniciar los primeros análisis y realizar proyecciones de ensayos clínicos en humanos a largo plazo.

En este trabajo de investigación se implementó y evaluó un protocolo *in vitro* de obtención y cultivo de poblaciones celulares a partir de la pulpa de terceros molares humanos, cuya caracterización nos permite establecer que estamos frente a una población de hDPSC. También se implementó un protocolo de implantación de las poblaciones celulares obtenidas en un modelo *in vivo* de regeneración ósea de defecto crítico de calota de ratón. Para tal objetivo, se recuperaron y analizaron muestras después de 30 días de implantadas las células madre pulpaes humanas al interior del defecto crítico en la calota de ratones inmunosuprimidos.

La primera etapa del protocolo de cultivo *in vitro* correspondió a la obtención y posterior aislamiento de poblaciones celulares desde el tejido pulpar. La evidencia existente es categórica respecto a la importancia de la edad del donante en la obtención de muestras pulpaes, ya que la capacidad de proliferación, migración y

potencial de diferenciación de las hDPSCs disminuyen a medida que aumenta la edad del donante, afectando las propiedades regenerativas de estas células (Ercal y cols., 2018). El criterio de edad establecido para la recuperación de muestras establecido en este estudio, es consistente a lo reportado en la literatura (Wu y cols., 2015), permitiendo aprovechar al máximo el potencial de proliferación y diferenciación de las hDPSCs, dadas las características de desarrollo y menor grado de madurez del tercer molar respecto al resto de los dientes (Shi y cols., 2020). Sin embargo, al tener una expectativa de aplicación terapéutica para un amplio rango de la población, es necesario en el futuro, establecer mecanismos de almacenamiento del tejido pulpar durante largo periodos, o implementar protocolos de purificación y expansión de células obtenidas de paciente de mayor edad, y no sólo de pacientes jóvenes.

El aislamiento de poblaciones celulares desde el tejido pulpar se realizó utilizando el método del explante y la digestión enzimática (en adelante método mecánico-enzimático). Este método contribuyó a obtener las primeras células observables al microscopio en un plazo menor a 5 días, siendo este tiempo igual o menor a lo reportado en la literatura (Mushahary y cols., 2018; Viña-Almunia y cols., 2016). Esto se debe a que **la fragmentación mecánica del tejido pulpar permitió aumentar su área superficial, para que las enzimas pudieran degradar la MEC, y con ello, favorecer la migración de las células hacia la superficie de las placas de cultivo.** Además, se ha descrito que la conservación de fragmentos del tejido pulpar en el cultivo permite la liberación de factores de crecimiento al medio de cultivo (Mushahary y cols., 2018) siendo reportado por varios autores como el más adaptado para la obtención del cultivo primario (Anitua y cols., 2018; Mushahary y cols., 2018).

Por otro lado, dentro del protocolo, la utilización de suero fetal bovino (FBS) como suplemento al medio de cultivo es fundamental para favorecer la adhesión, aportar nutrientes y factores de crecimiento a las células en cultivo (van der Valk y cols., 2011). La utilización de medio de cultivo primario suplementado con FBS al 20% en la fase inicial del cultivo realizado en este estudio, pudo contribuir a disminuir los tiempos iniciales de cultivo (en conjunto con el método mecánico

enzimático), debido a la mayor concentración de factores de crecimiento y nutrientes. Sin embargo, la mantención de esta concentración puede favorecer la proliferación de poblaciones celulares no deseadas, tal como se observó en el análisis de citometría de flujo, donde más de un 50% de las poblaciones celulares presentó marcadores de superficie hematopoyéticos. La disminución de aproximadamente 18 veces menos células hematopoyéticas se puede asociar a concentraciones menores de FBS en el medio de cultivo, y consecuentemente, una purificación del cultivo, favoreciendo el fenotipo de MSC. Esa variación de suero no alteró los tiempo finales para obtener un número suficiente de células, y además implicó una economía en insumos, tal como lo describen algunos autores). En la actualidad, dado el origen xenobiótico y el desconocimiento de las concentraciones específicas de nutrientes y factores de crecimiento presentes en el FBS, se ha planteado la posibilidad de que pueda generar riesgos de contaminación viral, bacteriana, fúngica y/o priónica; junto con la posible inducción del rechazo inmune de las células trasplantadas al huésped (Qu y cols., 2020), lo que explica la tendencia a nivel mundial de desarrollar cultivos en ausencia de suero animal

El suero humano o el plasma rico en plaquetas han sido postulados como posibles alternativas al suero fetal bovino en el cultivo de hDPSCs y otras MSC (Xiao y cols., 2018), ya que, además del cultivo, se buscaría acelerar la transición de los estudios *in vitro* a los ensayos clínicos. Sin embargo, el uso de suero humano alogénico también puede presentar potenciales riesgos de contaminación con patógenos, toxinas u otros agentes inmunogénicos (Xiao y cols., 2018). El uso de suero autólogo puede eliminar el riesgo de reacción inmune, no obstante, su uso también es problemático, ya que se requiere de tiempo adicional para realizar el proceso de obtención y cultivo celular, sumado a la alta cantidad de suero necesario para generar un número clínicamente relevante de células madre de un paciente (Knuth y cols., 2019).

Junto con lo señalado anteriormente, estudios realizados con productos humanos presentan conclusiones contradictorias respecto a la tasa de proliferación celular, en comparación con medios suplementados con FBS (Xiao y cols., 2018), al igual que una menor tasa de diferenciación (Ercal y cols., 2018; van der Valk y

cols., 2018). Un estudio realizado por Brohlin y colaboradores, utilizando suero humano alogénico, mostró una mayor tasa de proliferaron, pero se redujo significativamente la expresión del marcador de MSC: CD105 (Brohlin y cols., 2017). Por lo tanto, **a pesar de todo el esfuerzo y la investigación dedicados a este campo, todavía no existe evidencia suficiente que respalde establecer un protocolo de cultivo libre de suero de origen animal, que permita que las hDPSCs mantengan su capacidad de proliferación y potencial de diferenciación sin alteraciones** (Qu y cols., 2020).

Uno de los problemas más importantes con respecto a las hDPSC, y en general para todas las células con potencial uso clínico, es el número de pasajes *in vitro* más favorable para obtener un número adecuado de células y paralelamente, no perder las propiedades progenitoras (Ledesma-Martínez, y cols., 2011). Se observó que cultivos en pasajes celulares muy tempranos (pasaje celular 1) estaban muy “contaminados” con otras poblaciones celulares, asociadas a un inmunofenotipo hematopoyético. Esto se condice con los resultados obtenidos y lo descrito en la literatura (Shi y cols., 2020), ya que en el protocolo presentado en este estudio, las poblaciones celulares con mayor expresión de marcadores de MSC y, por lo tanto, las utilizadas en los ensayos de diferenciación *in vitro* y las pruebas *in vivo*, corresponden a células en pasaje 3 (P3) de replicación. Estos resultados concuerdan con los de Choi y colaboradores, quienes compararon el efecto terapéutico de MSC que habían sufrido 3, 5, 7 y 9 pasajes de cultivo, y que presentaban variaciones significativas en la expresión de los marcadores de superficie (Choi y cols., 2010), del mismo modo que se señala en otros estudios pero con hDPSCs (Chen Y. y cols., 2020; Jahanbin y cols., 2016; Pedroni y cols., 2019).

Por lo tanto, en las actuales condiciones de cultivo, las hDPSC en P3 podrían ser más adecuadas para ensayos *in vivo*, ya que presentan el potencial y el comportamiento biológico óptimo para ser utilizadas en el contexto de regeneración ósea (Chen Y. y cols., 2020).

Respecto a la caracterización de poblaciones de hDPSCs, se realizó el análisis de la expresión de antígenos de la superficie celular, siguiendo los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) para MSC (Dominici y cols., 2006), que en líneas generales establece como requisitos presentar una expresión positiva \geq al 95% para los marcadores CD73, CD90 Y CD105; junto con una expresión positiva menor al 2% para antígenos de superficie hematopoyéticos.

Los resultados del análisis de citometría de flujo para el cultivo celular en P3, mostraron una baja expresión positiva de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD31, CD34 y CD45, con un 0,3%; mientras que en el 99,7% con expresión hematopoyética negativa, se observó una expresión de 95.9% para CD73, 93.2% para CD90, 93.5% para CD105 y 93.3% para CD29.

El origen embrionario en la cresta neural craneal de las hDPSC podría explicar esta discrepancia de valores, pero de igual manera obtener resultados favorables en el proceso de regeneración ósea. De hecho, algunos grupos han propuesto que las hDPSC pudieran tener una diferencia de inmunofenotipo a la descrita para las MSC por el ISCT (Anitua y cols., 2018; Ledesma-Martínez y cols., 2019).

Otro factor importante es que las poblaciones de hDPSCs son heterogéneas, formadas por subpoblaciones mixtas con diferentes propiedades fenotípicas y biológicas, y por consiguiente con potenciales de proliferación y diferenciación variables (Shi y cols., 2020) lo que se traduce en hDPSCs con perfiles de expresión inmunofenotípica de MSC variables entre estudios, tanto en el tipo de marcador como el porcentaje expresado (Chen Y. y cols., 2020; Nakajima y cols., 2018; Pedroni y cols., 2019).

Además de la expresión de antígeno específico propuesta por el ISCT, se han estudiado muchos otros marcadores de superficie para la caracterización de hDPSCs, tales como CD13, CD44, CD166 y CD29 (Ducret y cols., 2016; Qu y cols., 2020), siendo este último incluido en el análisis de citometría de flujo, cuya expresión del 93.3% en P3 validaría su uso. Sin embargo, es importante destacar que en la actualidad, **aún no existe un marcador específico para identificar las hDPSCs** (Yang y cols., 2020).

Otro factor que confirmó el análisis de citometría de flujo fue el hecho que, si bien se pueden mantener poblaciones en cultivo, el inmunofenotipo de MSC comienza a cambiar, y con ello, disminuye sus características de células progenitoras. De hecho, varios autores relatan que largo periodos de cultivo disminuyen la expresión de CD73, CD90 y CD105 (Ledesma-Martínez y cols., 2019), del mismo modo como se evidencia en este estudio. Esto impide mantener las poblaciones celulares por largo tiempo en cultivo, lo que condiciona la pronta utilización de las células para evitar los fenómenos de senescencia celular; o la búsqueda de estrategias para su preservación. En este contexto, se han realizado un número limitado de estudios sobre la optimización de los métodos de criopreservación existentes, tanto de células aisladas como de dientes completos (Morsczeck, 2019; Zeitlin, 2020), entregando una oportunidad para el desarrollo de futuras investigaciones.

En relación con los constructos, el ácido poliláctico (PLA) cumple con las propiedades básicas necesarias para su uso como andamio: biocompatibilidad, biodegradabilidad y resistencia mecánica. Además, la microestructura de este biomaterial, permite el intercambio de nutrientes, desechos y la neovascularización (Kanczler y cols., 2020). Una de las limitaciones del uso de PLA fue determinar la cantidad y distribución de células adheridas al interior del constructo. Ante esto, se intentó caracterizar el constructo, evaluando la presencia y distribución de las células utilizando un microscopio invertido, demostrando la presencia de células en esta matriz tridimensional y su actividad con la formación de núcleos de mineralización, aunque una mayor caracterización del constructo sería deseable. Las técnicas actuales de preparación y observación implementadas en nuestro laboratorio, mediante microscopía óptica convencional, utilizan reactivos que disuelven la matriz de ácido poliláctico, impidiendo su análisis detallado (Murariu & Dubois, 2016). Ante esto, una alternativa sería polimerizar un constructo con las células en su interior, mediante la técnica de bioimpresión 3D, y de ese modo determinar con precisión el número de células implantadas y su distribución tridimensional al interior del constructo (Chandra y cols., 2020).

Es importante destacar que la evidencia actual indica que este material por sí solo no es capaz de inducir una neoformación ósea exitosa y que debe ser utilizado en combinación con otros biomateriales, fármacos, o señales bioquímicas (como por ejemplo ácido poliláctico-co-glicólico, policaprolactona, colágeno, vidrio bioactivo, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, dexametasona, BMP-2, entre otros), para poder generar grados variables de osteoinducción (Alksne y cols., 2020; Amjadian y cols., 2016; Bejarano y cols., 2020; Nofar y cols., 2019).

Sumado a lo anterior, en otros modelos *in vivo* que han utilizado PLA como andamio (puro o combinado) y células madre en la evaluación del potencial de regeneración ósea, sus controles negativos (uso de PLA sin células en defecto crítico) presentan poca o nula formación de tejido osteoide en el área del defecto (Habibovic, 2014; Han S.H. y cols., 2020; Schüttler y cols., 2020; Seebach, 2015; Tu y cols., 2020; Wang y cols., 2018). Dados estos antecedentes, no se consideró necesaria la realización de un control negativo de constructo sin células, favoreciendo así la reducción del número de ratones empleados en el modelo *in vivo*. Sin embargo, para dar mayor solidez a los resultados en el contexto del protocolo de la FOUCh, se planificó realizar una nueva serie experimental que incluyera la realización de dicho control.

En relación a los tejidos formados al interior del defecto, los resultados obtenidos evidenciaron que **la implantación de constructo cargado con hDPSC favoreció la reparación y cierre del defecto mediante un tejido, en comparación al control negativo**. En el área del defecto se observó la presencia de células distribuidas de modo homogéneo y asociadas a una matriz osteoide con las características clásicas de un proceso de regeneración (Kanczler y cols., 2020): fibras colágenas distribuidas al azar que forman fascículos más gruesos y presentan un proceso de maduración, desarrollando una estructura más organizada, favoreciendo así la formación de núcleos de mineralización. Esos resultados son compatibles con otros autores (Collignon y cols., 2018; Novais y cols., 2019; Pedroni y cols., 2019; Petridis y cols., 2015) que describen patrones de regeneración similares al nuestro.

Sin embargo, los resultados de este trabajo de investigación no permiten determinar si efectivamente las células implantadas se diferencian hacia un linaje óseo para posteriormente secretar una MEC favorable con el proceso regenerativo; o si dichas células presentan un efecto paracrino con las células del hospedero, mediante la secreción de factores de crecimiento y moléculas de señalización.

Una posibilidad es que células del hospedero hayan sido inducidas a migrar desde los cabos del defecto crítico, o por los vasos sanguíneos que se formaron. Sin embargo, es importante destacar que la formación de los núcleos de mineralización se produce tanto en la periferia como en el centro del defecto crítico, y no sólo en la periferia como se observa en el control negativo. Esto sugiere que las células pulpares sintetizarían dicho tejido. Sin embargo, es necesario el desarrollo de un mayor análisis para confirmar la sobrevivencia de las células pulpares al interior del defecto y el rol que desempeñaron en la formación de la matriz ósea.

Varios autores relatan una baja tasa de supervivencia de células implantadas en defectos críticos (Leyendecker Jr y cols., 2018; Petridis y cols., 2015). Es probable que esto se deba a la falta de suministro de sangre y el consiguiente estrés ligado al microambiente hostil (tejido isquémico, estrés oxidativo, hipoxia, pérdida de nutrientes y de matriz extracelular) que encuentran en el hospedero (Collignon y cols., 2018). Además, las células pueden experimentar modificaciones que conducen a la senescencia replicativa o diferenciación en un tipo de célula no deseable (Pedroni y cols., 2019)

Dichas interrogantes deben ser tratada antes de transferir estos enfoques terapéuticos en el humano, ya que podría ayudar a comprender mejor los mecanismos en juego y luego impulsar y estandarizar los ensayos clínicos.

Otra estructura que se observó en el tejido neoformado fueron vasos sanguíneos. La neovascularización es de extrema importancia en la ingeniería de tejidos, porque aporta los nutrientes necesarios para la formación del nuevo tejido (de Cara y cols., 2019). Numerosos estudios asocian el éxito de los procesos regenerativos al establecimiento de una red vascular completamente funcional dentro del tejido neoformado para permitir su supervivencia. (Chen Y. y cols., 2020; Novais y cols., 2019; Qu y cols., 2020).

Se ha reportado en la literatura que las células madre pulpaes pueden diferenciarse en células similares al endotelio (Chen Y. y cols., 2020). Además, se ha planteado que, en condiciones hipóxicas, la actividad angiogénica paracrina de estas células podría ser mayor, ya que en estudios *in vitro* se ha visto una mayor expresión de factores de angiogénesis, como VEGF, SDF-1 y PDGF (Dreyer y cols., 2017; Qu y cols., 2020). También se ha descrito que la estimulación de la formación de vasos mediante factores angiogénicos podría aumentar la formación de hueso y la curación de fracturas en modelos *in vivo* (Francois & Yaszemski, 2019). Sin embargo, al igual que con el tejido óseo, no se logró establecer qué población celular se diferenció o participó en la formación de esos vasos, ya que pudo ser el hospedero, la diferenciación de las células pulpaes, o una combinación de ambas.

Otro tejido observado al interior del defecto fue tejido cartilaginoso. La evidencia establece que, desde un punto de vista embriológico, las células derivadas de la cresta neural contribuyen a la formación de los tejidos de la región craneofacial (Pisciotta y cols., 2020). El hueso parietal de la calvaria se forma por un proceso óseo intramembranoso y se esperaría que sus defectos se curen a través de los mismos mecanismos (Collignon y cols., 2018). Una posibilidad es que esta diferenciación condrogénica tenga relación con el microambiente hostil en el que se encuentran implantadas las células, ya que se ha descrito que las condiciones hipóxicas favorecen la diferenciación hacia condrocitos de varias MSC (Bornes y cols., 2015). De este modo el ambiente *in vivo* puede presentar una mayor importancia respecto al patrón u origen embriológico de las células, guiando el proceso de regeneración ósea mediante la osificación endocondral.

La osificación endocondral en ingeniería tisular ha sido considerado como prometedor en la formación de hueso, ya que induce naturalmente la vascularización en el sitio del implante (Kanczler y cols., 2020; Knuth y cols., 2019). Se ha descrito en el proceso de osificación endocondral, que cuando comienza la diferenciación hipertrófica, los condrocitos secretan factores como ANG-1, PDGFA y VEGF, que ayudarían en el reclutamiento de la vascularización cercana a la plantilla del cartílago, lo que finalmente dará como resultado un suministro de células pre-osteoblásticas al sitio de la lesión (Han S. y cols., 2020).

Se ha planteado además, que células progenitoras diferenciadas en condrocitos persistirían dentro de la matriz ósea y contribuirían directamente a la formación de hueso al sufrir una transdiferenciación a células similares a los osteoblastos (Knuth y cols., 2019). Esta investigación contrasta con la evidencia clásica, donde se cree que después de la diferenciación hipertrófica de los condrocitos, la apoptosis es su único destino (Gibson y cols., 1995). Por el contrario, un subconjunto de ellos sería capaz de transdiferenciarse en osteoblastos o células similares a los osteoblastos, ayudando aún más en el proceso de formación ósea. Por lo tanto, analizar los procesos que llevan a la presencia de cartílago en el área del defecto representa un aporte significativo en la descripción de los mecanismos biológicos de regeneración ósea mediada por hDPSC.

Para finalizar, una limitación de este estudio tiene relación con las características inmunológicas del modelo animal seleccionado, ya que la evidencia indica que la interacción entre las células del sistema esquelético y el sistema inmune es importante para una reparación ósea fisiológica exitosa (Azi y cols., 2016). Se ha descrito que durante la remodelación ósea, linfocitos T y B infiltrados en el sitio de la fractura están involucradas en el proceso de reparación ósea, ya que linfocitos Th2 y T reguladores influyen negativamente en la maduración de los osteoclastos (Gómez-Barrena y cols., 2015; Schindeler y cols., 2008), sin embargo, las células Th17 muestran un efecto positivo sobre la osteoclastogénesis (Vernal & Garcia-Sanz, 2008). Otros estudios han informado que ratones que carecen de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T y B parecen haber acelerado la reparación de fracturas en comparación con aquellos con un sistema inmunitario completamente competente (Loi y cols., 2016; Rambhia & Ma, 2019).

Si bien se han realizado numerosos estudios sobre las características inmunomoduladoras de las MSC (Demircan y cols., 2011; Ducret y cols., 2016; El-Hashash, 2020; Z. Li y cols., 2014; Zhang y cols., 2009), la evidencia es prácticamente nula respecto a cómo responde un sistema inmune competente a la implantación de hDPSC indiferenciadas en el contexto de regeneración ósea. La comprensión de las complejas interacciones entre el sistema inmune y las células madre brinda oportunidades para optimizar la reparación ósea y otros procesos

regenerativos mediante la modulación de la respuesta inflamatoria (Lu y cols., 2017). Esto podría mejorar potencialmente la calidad de vida en casos de traumatismo, infección, osteonecrosis, defectos óseos y otras lesiones musculoesqueléticas.

En base a los resultados presentados en este trabajo, y los antecedentes previamente discutidos, es posible confirmar parcialmente la hipótesis de trabajo planteada, que establece que “las células pulpares humanas obtenidas mediante protocolo desarrollado en el Laboratorio de Histo-Morfología Oral de la FOUC presentaron características de célula madre y participaron en la neoformación tisular al interior del defecto crítico de calota de ratón”, ya que, por una parte, se demostró la validez del protocolo presentado para obtención y cultivo de hDPSCs; y por otra, que la utilización del constructo con hDPSCs permite la formación de un nuevo tejido que cierra el defecto crítico en el período de estudio, y por el contrario, sin la presencia de este constructo, no hay neoformación tisular. Sin embargo, la falta de un control negativo de constructo sin células, en el modelo *in vivo* de regeneración ósea, condiciona la certeza de establecer, que las hDPSCs implantadas participan en la neoformación tisular al interior del defecto crítico de calota de ratón.

EXPECTATIVAS

La reconstrucción de defectos óseos críticos maxilofaciales representa un desafío importante en las áreas de odontología y medicina, y son el objetivo principal de varios grupos de investigación. Con este objetivo en mente, la pulpa dental es una fuente prometedora de poblaciones celulares con características de células madre, con una alta capacidad de diferenciación y una técnica de recolección no invasiva que se puede realizar después de la extracción dental de rutina. Los enfoques actuales buscan facilitar la reparación ósea al proporcionar un microambiente adecuado y propicio que no interfiera con los procesos regenerativos nativos mientras los acelera sinérgicamente.

Los resultados *in vitro* e *in vivo*, junto con la identificación de las fortalezas y limitaciones de este estudio, respaldan la realización de nuevas investigaciones, tanto para verificar la presencia de células humanas al interior de los defectos, y el origen de especie de los tejidos neoformados; así como para poder identificar en detalle los mecanismos celulares y moleculares que median totalmente la reparación ósea inducida por hDPSCs.

CONCLUSIONES

1. El protocolo de cultivo presentado permite la obtención de poblaciones celulares con características de hDPSC en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
2. La concentración de FBS como suplemento a medio de cultivo basal, y el número de pasajes de replicación, puede modificar las poblaciones celulares obtenidas.
3. A partir de los procedimientos efectuados, fue posible la elaboración de constructo con hDPSCs, el cual fue implantado exitosamente en modelo *in vivo* en dependencias de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
4. La implantación de constructo con hDPSCs en defecto crítico de calota de ratón, contribuye positivamente en el proceso de regeneración de la lesión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghaloo, T. L., Chaichanasakul, T., Bezouglaia, O., Kang, B., Franco, R., Dry, S. M., Atti, E., & Tetradis, S. (2010). Osteogenic potential of mandibular vs. Long-bone marrow stromal cells. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1293–1298. <https://doi.org/10.1177/0022034510378427>
- Akobeng A. K. (2005). Principles of evidence based medicine. *Archives of disease in childhood*, 90(8), 837–840. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.071761>
- Akter, F. (2016a). Chapter 1: What is Tissue Engineering? En *Tissue Engineering Made Easy*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00001-1>
- Akter, F. (2016b). Chapter 2: Principles of Tissue Engineering. En *Tissue Engineering Made Easy*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3>
- Akter, F. & Ibanez, J. (2016). Bone and Cartilage Tissue Engineering. En *Tissue Engineering Made Easy*. Elsevier Inc. Chapter 8. páginas 77-97: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00008-4>
- Alkaisi, A., Ismail, A. R., Mutum, S. S., Hayati, N., Razak, A., & Omfs, M. D. (2013). Transplantation of Human Dental Pulp Stem Cells: Enhance Bone Consolidation in Mandibular Distraction Osteogenesis. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 71(10), 1758.e1-1758.e13. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.05.016>
- Alksne, M., Kalvaityte, M., Simoliunas, E., Rinkunaite, I., Gendviliene, I., Locs, J., Rutkunas, V., & Bukelskiene, V. (2020). In vitro comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103641>
- Amjadian, S., Seyedjafari, E., Zeynali, B., & Shabani, I. (2016). The synergistic effect of nano-hydroxyapatite and dexamethasone in the fibrous delivery system of gelatin and poly(L-lactide) on the osteogenesis of mesenchymal stem cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 507(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.032>
- Anitua, E., Troya, M., & Zalduendo, M. (2018). Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*, 20(4), 479–498. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.12.011>
- Arana-Chavez, V. E., & Nanci, A. (2001). High-resolution Immunocytochemistry of Noncollagenous Matrix Proteins in Rat Mandibles Processed with Microwave Irradiation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(9), 1099–1109. <https://doi.org/10.1177/002215540104900904>

- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A., & Gronthos, S. (2008). Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells*, 26(7), 1787–1795. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0979>
- Aydin, S., & Şahin, F. (2019). Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1144, 123–132. https://doi.org/10.1007/5584_2018_333
- Azi, M. L., Aprato, A., Santi, I., Junior, M. K., Masse, A., & Joeris, A. (2016). Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1312-4>
- Barteneva, N. S., Fasler-Kan, E., & Vorobjev, I. A. (2012). Imaging Flow Cytometry: Coping with Heterogeneity in Biological Systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60(10), 723–733. <https://doi.org/10.1369/0022155412453052>
- Behnia, A., Haghghat, A., Talebi, A., Nourbakhsh, N., & Heidari, F. (2014). Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect. 6(4), 505–510. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.505>
- Bejarano, J., Boccaccini, A. R., Covarrubias, C., & Palza, H. (2020). Effect of Cu- and Zn-doped bioactive glasses on the in vitro bioactivity, mechanical and degradation behavior of biodegradable PDLLA scaffolds. *Materials*, 13(13). <https://doi.org/10.3390/ma13132908>
- Bornes, T. D., Jomha, N. M., Mulet-Sierra, A., & Adesida, A. B. (2015). Hypoxic culture of bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells differentially enhances in vitro chondrogenesis within cell-seeded collagen and hyaluronic acid porous scaffolds. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0075-4>
- Breeland, G., Sinkler, M. A., & Menezes, R. G. (2020). Embryology, Bone Ossification. En *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30969540>
- Briquez, P. S., & Hubbell, J. A. (2020). Morphogenesis and tissue engineering. En *Principles of Tissue Engineering*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818422-6.00009-5>
- Brohlin, M., Kelk, P., Wiberg, M., & Kingham, P. J. (2017). Effects of a defined xeno-free medium on the growth and neurotrophic and angiogenic properties of human adult stem cells. *Cytotherapy*, 19(5), 629–639. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.02.360>
- Brüel, A., Christensen, E., Qvortrup, K., Tranum-Jensen, J., & Geneser, F. (2014). Geneser Histología. En *Editorial Médica Panamericana: Vol. 4° Edición*.

- Cao, Y., Liu, Z., Xie, Y., Hu, J., Wang, H., Fan, Z., Zhang, C., Wang, J., Wu, C., & Wang, S. (2015). Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine. *Stem Cell Research & Therapy*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0244-5>
- Casagrande, L., Cordeiro, M. M., Nör, S. A., & Nör, J. E. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 99(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10266-010-0154-z>
- Chandra, P. K., Soker, S., & Atala, A. (2020). Tissue engineering: current status and future perspectives. En *Principles of Tissue Engineering*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818422-6.00004-6>
- Chang, C. C., Chang, K. C., Tsai, S. J., Chang, H. H., & Lin, C. P. (2014). Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *Journal of the Formosan Medical Association*, 113(12), 956–965. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2014.09.003>
- Chen, Y., Li, X., Wu, J., Lu, W., Xu, W., & Wu, B. (2021). Dental pulp stem cells from human teeth with deep caries displayed an enhanced angiogenesis potential *in vitro*. *Journal of dental sciences*, 16(1), 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.03.007>
- Chen, Yishan, Lin, J., Yu, Y., & Du, X. (2020). Role of mesenchymal stem cells in bone fracture repair and regeneration. En *Mesenchymal Stem Cells in Human Health and Diseases*. Elsevier Inc. Chapter 7. (pp. 127-143) <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819713-4.00007-4>
- Cheng, A., Schwartz, Z., Kahn, A., Li, X., Shao, Z., Sun, M., Ao, Y., Boyan, B. D., Chen, H., Antonio, S., Surgery, M., & Aviv, T. (2018). *Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration*. 1–52. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2018.0119>
- Choi, M. R., Kim, H. Y., Park, J. Y., Lee, T. Y., Baik, C. S., Chai, Y. G., Jung, K. H., Park, K. S., Roh, W., Kim, K. S., & Kim, S. H. (2010). Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 472(2), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.054>
- Collignon, A.-M., Castillo-Dali, G., Gomez, E., Guilbert, T., Lesieur, J., Nicoletti, A., Acuna-Mendoza, S., Letourneur, D., Chaussain, C., Rochefort, G. Y., & Poliard, A. (2018). Mouse Wnt1-CRE⁻Rosa Tomato Dental Pulp Stem Cells Directly Contribute to the Calvarial Bone Regeneration Process. *STEM CELLS*, 37(5), 701–711. <https://doi.org/10.1002/stem.2973>
- Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., Smith, A. J., & Nör, J. E. (2008). Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *Journal of Endodontics*, 34(8), 962–969. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.04.009>

- D'aquino, R., de Rosa, A., Laino, G., Caruso, F., Guida, L., Rullo, R., Checchi, V., Laino, L., Tirino, V., & Papaccio, G. (2009). Human dental pulp stem cells: From biology to clinical applications. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312(5), 408–415. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21263>
- D'Aquino, R., Graziano, A., Laino, G., & Papaccio, G. (2008). Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 65–65. <https://doi.org/10.1007/s12015-008-9015-3>
- de Cara, S. P. H. M., Origassa, C. S. T., de Sá Silva, F., Moreira, M. S. N. A., de Almeida, D. C., Pedroni, A. C. F., Carvalho, G. L., Cury, D. P., Câmara, N. O. S., & Marques, M. M. (2019). Angiogenic properties of dental pulp stem cells conditioned medium on endothelial cells in vitro and in rodent orthotopic dental pulp regeneration. *Heliyon*, 5(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01560>
- Demircan, P. C., Sariboyaci, A. E., Unal, Z. S., Gacar, G., Subasi, C., & Karaoz, E. (2011). Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: Comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy*, 13(10), 1205–1220. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.605351>
- Dennis, J. E., & Caplan, A. I. (1996). Analysis of the developmental potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Connective Tissue Research*, 35(1–4), 147–153.
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dreyer, C. H., Kjærgaard, K., Ditzel, N., Jørgensen, N. R., Overgaard, S., & Ding, M. (2017). Optimizing combination of vascular endothelial growth factor and mesenchymal stem cells on ectopic bone formation in SCID mice. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105(12), 3326–3332. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36195>
- Ducret, M., Fabre, H., Degoul, O., Atzeni, G., McGuckin, C., Forraz, N., Mallein-Gerin, F., Perrier-Groult, E., Alliot-Licht, B., & Farges, J. C. (2016). Immunophenotyping reveals the diversity of human dental pulp mesenchymal stromal cells in vivo and their evolution upon in vitro amplification. *Frontiers in Physiology*, 7(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00512>
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: Hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 329–337. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023

- Durr-E-Sadaf (2019). How to apply evidence-based principles in clinical dentistry. *Journal of multidisciplinary healthcare*, 12, 131–136. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S189484>
- El-Gendy, R., Yang, X. B., Newby, P. J., Boccaccini, A. R., & Kirkham, J. (2013). Osteogenic differentiation of human dental pulp stromal cells on 45S5 bioglass® based scaffolds in vitro and in vivo. *Tissue Engineering - Part A*, 19(5–6), 707–715. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0112>
- El-Hashash Ahmed H.K. (2020) *Mesenchymal stem cells in human health and diseases: general discussion, remarks, and future directions*. En *Mesenchymal Stem Cells in Human Health and Diseases*, Academic Press, Chapter 11. Pages 179-199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819713-4.00011-6>.
- Ercal, P., Pekozer, G. G., & Kose, G. T. (2018). Dental Stem Cells in Bone Tissue Engineering: Current Overview and Challenges. En *Adv Exp. Medicine, Biology-Neuroscience and respiration*. (Vol. 6, Número October 2014, pp. 113–127). https://doi.org/10.1007/5584_2018_171
- Erices, A., Conget, P., Minguell, J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 109(2), 235–242. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15921619>
- Feng, G., Zhang, J., Feng, X., Wu, S., Huang, D., & Hu, J. (2016). Runx2 modified dental pulp stem cells (DPSCs) enhance new bone formation during rapid distraction osteogenesis (DO). *Differentiation*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.06.001>
- Fernandez -Tresguerres Hernandez-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Del Canto Pingarrón, M., & Blanco Jerez, L. (2006b). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11(1), 32–36.
- Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Del Canto Pingarrón, M., & Blanco Jerez, L. (2006a). Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11(2), 92–98.
- Fernandez, I. (2019). Implementación de modelo in vivo de defecto crítico de calota de ratón para regeneración de tejidos duros. En *Tesis de Pregrado, Facultad de Odontología de la Universidad de Chile*.
- Francois Elvis L. & Yaszemski, Michael J. (2019). Preclinical Bone Repair Models in Regenerative Medicine, Chapter 43. Editor(s): Anthony Atala, Robert Lanza, Antonios G. Mikos, Robert Nerem,
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea-Pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, 3, 393–403

- Frohlich, M., Grayson, W., Wan, L., Marolt, D., Drobnic, M., & Vunjak- Novakovic, G. (2008). Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 3(4), 254–264. <https://doi.org/10.2174/157488808786733962>
- Galler, K. M., Brandl, F. P., Kirchhof, S., Widbiller, M., Eidt, A., Buchalla, W., Göpferich, A., & Schmalz, G. (2018). Suitability of Different Natural and Synthetic Biomaterials for Dental Pulp Tissue Engineering. *Tissue Engineering - Part A*, 24(3–4), 234–244. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0555>
- Gandia, C., Armiñan, A., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, M. D., Sanchez-Torrijos, J., Payá, R., Mirabet, V., Carbonell-Uberos, F., Llop, M., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2008). Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Stem Cells*, 26(3), 638–645. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0484>
- Gardin, C., Ricci, S., & Ferroni, L. (2016). Dental Stem Cells: Classification and Properties. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*, 1–25. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33299-4>
- Gaspard, N., Bouschet, T., Herpoel, A., Naeije, G., van den Aemele, J., & Vanderhaeghen, P. (2009). Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Protocols*, 4(10), 1456–1463. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.157>
- Gibson, G. J., Kohler, W. J., & Schaffler, M. B. (1995). Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Developmental Dynamics*, 203(4), 468–476. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030409>
- Gilbert, S. F. (2005). Biología del desarrollo. 7° Ed. En *Editorial Médica Panamericana*.
- Gómez-Barrena, E., Rosset, P., Lozano, D., Stanovici, J., Ermthaller, C., & Gerbhard, F. (2015). Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*, 70, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.033>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Habibovic, P. (2014). In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. *Biomatter*, 4, e27664. <https://doi.org/10.4161/biom.27664>
- Han, S. H., Cha, M., Jin, Y. Z., Lee, K. M., & Lee, J. H. (2020). BMP-2 and hMSC dual delivery onto 3D printed PLA-Biogel scaffold for critical-size bone defect regeneration in rabbit tibia. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 16(1), 015019. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aba879>
- Heineken, F. G., & Skalak, R. (1991). Tissue Engineering: A Brief Overview. *Journal of Biomechanical Engineering*, 113, 3–4.

- Hofstetter, C. P., Schwarz, E. J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D. J., & Olson, L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(4), 2199–2204.
- Hollands, P., Aboyeji, D., & Orcharton, M. (2018). Dental pulp stem cells in regenerative medicine. *British Dental Journal*, *224*(9), 747–750. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.348>
- Hubbell, J. A. (2003). Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, *14*(5), 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.09.004>
- Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Imai, T., Tanaka, T., Nakahara, T., Ishikawa, H., Mitev, V., & Haapasalo, M. (2012). High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *Journal of Endodontics*, *38*(4), 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.12.011>
- Jacques, E., & Suuronen, E. J. (2020). The Progression of Regenerative Medicine and its Impact on Therapy Translation. *Clinical and Translational Science*, cts.12736. <https://doi.org/10.1111/cts.12736>
- Jahanbin, A., Rashed, R., Alamdari, D. H., Koohestanian, N., Ezzati, A., Kazemian, M., Saghafi, S., & Raisolsadat, M. A. (2016). Success of Maxillary Alveolar Defect Repair in Rats Using Osteoblast-Differentiated Human Deciduous Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *74*(4), 829.e1-829.e9. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.11.033>.
- Janebodin, K., Horst, O. V., Ieronimakis, N., Balasundaram, G., Reesukumal, K., Pratumvinit, B., & Reyes, M. (2011). Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS ONE*, *6*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027526>
- Jiang, Y., Wang, D., Blocki, A., & Tuan, R. S. (2020). Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering. En *Principles of Tissue Engineering*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818422-6.00051-4>
- Kanczler, J. M., Wells, J. A., Gibbs, D. M. R., Marshall, K. M., Tang, D. K. O., & Oreffo, R. O. C. (2020). Bone tissue engineering and bone regeneration. En *Principles of Tissue Engineering: Vol. 37 Suppl 3* (pp. 917–935). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00052-6>
- Kaneko, T., Gu, B., Sone, P. P., Zaw, S. Y. M., Murano, H., Zaw, Z. C. T., & Okiji, T. (2018). Dental Pulp Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells: a Review with a Protocol. *Stem Cell Reviews and Reports*, *14*(5), 668–676. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9826-9>
- Kang, K. J., Lee, M. S., Moon, C. W., Lee, J. H., Yang, H. S., & Jang, Y. J. (2017). In Vitro and In Vivo Dentinogenic Efficacy of Human Dental Pulp-Derived Cells Induced by Demineralized Dentin Matrix and HA-TCP. *Stem cells international*, *2017*, 2416254. <https://doi.org/10.1155/2017/2416254>

- Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B., & Aflatoonian, R. (2012). Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *Journal of Visualized Experiments*, 69(November). <https://doi.org/10.3791/4372>
- Kim, S., Song, J. S., Jeon, M., Shin, D. M., Kim, S. O., & Lee, J. H. (2015). Ectopic Hard Tissue Formation by Odonto/Osteogenically In Vitro Differentiated Human Deciduous Teeth Pulp Stem Cells. *Calcified tissue international*, 97(1), 80–89. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9989-1>
- Knuth, C., Kiernan, C., Wolvius, E., Narcisi, R., & Farrell, E. (2019). Understanding tissue-engineered endochondral ossification; towards improved bone formation. *European Cells and Materials*, 37, 277–291. <https://doi.org/10.22203/eCM.v037a17>
- Kuo, T., Lee, S., Wu, H., Poma, M., Wu, Y., & Yang, J. (2015). An in vivo swine study for xeno-grafts of calcium sulfate-based bone grafts with human dental pulp stem cells (hDPSCs). *Materials Science & Engineering C*, 50, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.092>
- Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., & Robey, P. G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(9), 1335–1347. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.9.1335>
- Laino, G., D'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., Pirozzi, G., & Papaccio, G. (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(8), 1394–1402. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050325>
- Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Núñez, V. M., & Santiago-Osorio, E. (2016). Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: A review. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4709572>
- Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Núñez, V. M., Santiago-Osorio, E., Beerman, I., & Hare, J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Periodontal Tissue Regeneration in Elderly Patients. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 74(9), 1351–1358. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly227>
- Levi, M., Feitosa, T., li, L. F., Cristina, P., lii, B. B., Valverde, C., Iv, W., X, M. A. M., Eduardo, C., & Ix, A. (2010). Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine Sucesso no transplante de células tronco mesenquimais em ovinos com osteonecrose induzida da cabeça do fêmur . Resultados preliminares. *Acta Cirurgica Brasileira*, 25(5), 416–422.
- Leyendecker Jr, A., Gomes Pinheiro, C. C., Lazzaretti Fernandes, T., & Franco Bueno, D. (2018). The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review. *Journal of Tissue Engineering*, 9. <https://doi.org/10.1177/2041731417752766>

- Li, C. S., Yang, P., Ting, K., Aghaloo, T., Lee, S., Zhang, Y., Khalilinejad, K., Murphy, M. C., Pan, H. C., Zhang, X., Wu, B., Zhou, Y. H., Zhao, Z., Zheng, Z., & Soo, C. (2016). Fibromodulin reprogrammed cells: A novel cell source for bone regeneration. *Biomaterials*, 83, 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.013>
- Li, Y., Zhao, S., Nan, X., Wei, H., Shi, J., Li, A., & Gou, J. (2016). Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues Rocky Tuan; Timothy O'Brien. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0404-2>
- Li, Z., Jiang, C. M., An, S., Cheng, Q., Huang, Y. F., Wang, Y. T., Gou, Y. C., Xiao, L., Yu, W. J., & Wang, J. (2014). Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Diseases*, 20(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/odi.12086>
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G., & Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 11(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>
- Loi, F., Córdova, L. A., Pajarinen, J., Lin, T. hua, Yao, Z., & Goodman, S. B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 86, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>
- Lu, L. Y., Loi, F., Nathan, K., Lin, T. H., Pajarinen, J., Gibon, E., Nabeshima, A., Cordova, L., Jämsen, E., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2017). Pro-inflammatory M1 macrophages promote Osteogenesis by mesenchymal stem cells via the COX-2-prostaglandin E2 pathway. *Journal of Orthopaedic Research*, 35(11), 2378–2385. <https://doi.org/10.1002/jor.23553>
- M. Gomez de Ferraris, A. C. (2009). *Histología, Embriología e Ingeniería tisular*, 3^o Edición. (3^o Edición). <https://doi.org/9786078546251>
- Ma, L., Aijima, R., Hoshino, Y., Yamaza, H., Tomoda, E., Tanaka, Y., Sonoda, S., Song, G., Zhao, W., Nonaka, K., Shi, S., & Yamaza, T. (2015). Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates secondary osteoporosis through interleukin-17-impaired functions of recipient bone marrow mesenchymal stem cells in MRL/lpr mice. *Stem cell research & therapy*, 6(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0091-4>
- McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–5812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
- Morsczeck C. (2019). Cellular senescence in dental pulp stem cells. *Archives of oral biology*, 99, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.012>

- Morton, D., & Griffiths, P. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record*, *116*(16), 431–436. <https://doi.org/10.1136/vr.116.16.431>
- Murariu, M., & Dubois, P. (2016). PLA composites: From production to properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *107*, 17–46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.003>
- Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, *93*(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
- Nakajima, K., Kunimatsu, R., Ando, K., Ando, T., Hayashi, Y., Kihara, T., Hiraki, T., Tsuka, Y., Abe, T., Kaku, M., Nikawa, H., Takata, T., Tanne, K., & Tanimoto, K. (2018). Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *497*(3), 876–882. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.156>
- Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Arijji, Y., & Matsushita, K. (2017). Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem cell research & therapy*, *8*(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0506-5>
- Niebage, C., Karbanová, J., Steenblock, C., Corbeil, D., & Hoflack, B. (2016). Cell Surface Proteome of Dental Pulp Stem Cells Identified by Label-Free Mass Spectrometry. *PLoS ONE*, *11*(8), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159824>
- Nofar, M., Sacligil, D., Carreau, P. J., Kamal, M. R., & Heuzey, M. C. (2019). Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications. En *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 125, pp. 307–360). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002>
- Novais, A., Lesieur, J., Sadoine, J., Slimani, L., Baroukh, B., Saubaméa, B., Schmitt, A., Vital, S., Poliard, A., Héлары, C., Rochefort, G. Y., Chaussain, C., & Gorin, C. (2019). Priming Dental Pulp Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth with Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Mineralization Within Tissue-Engineered Constructs Implanted in Craniofacial Bone Defects. *Stem Cells Translational Medicine*, *8*(8), 844–857. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0182>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds. *Materials Today*, *14*(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Olson, J. L., Atala, A., & Yoo, J. J. (2011). Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Medical Journal*, *47*(1), 1. <https://doi.org/10.4068/cmj.2011.47.1.1>
- Ovchinnikov, D. (2009). Alcian blue/alizarin red staining of cartilage and bone in mouse. *Cold Spring Harbor Protocols*, *4*(3), pdb.prot5170. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5170>

- Paino, F., Noce, M. La, Giuliani, A., De Rosa, A., Mazzoni, S., Laino, L., Amler, E., Papaccio, G., Desiderio, V., & Tirino, V. (2017). Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: A new tool in bone tissue engineering. *Clinical Science*, 131(8), 699–713. <https://doi.org/10.1042/CS20170047>
- Pawlina, W. (2016). *Histology: A Text and Atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology* (7° Edición).
- Pedroni, A. C. F., Sarra, G., de Oliveira, N. K., Moreira, M. S., Deboni, M. C. Z., & Marques, M. M. (2019). Cell sheets of human dental pulp stem cells for future application in bone replacement. *Clinical Oral Investigations*, 23(6), 2713–2721. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2630-8>
- Pereira, R. F., Halford, K. W., O'Hara, M. D., Leeper, D. B., Sokolov, B. P., Pollard, M. D., Bagasra, O., & Prockop, D. J. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), 4857–4861. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4857>
- Petridis, X., Diamanti, E., Trigas, G. C., Kalyvas, D., & Kitraki, E. (2015). Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 43(4), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.02.003>
- Pisciotta, A., Bertani, G., Bertoni, L., Di Tinco, R., De Biasi, S., Vallarola, A., Pignatti, E., Tupler, R., Salvarani, C., de Pol, A., & Carnevale, G. (2020). Modulation of Cell Death and Promotion of Chondrogenic Differentiation by Fas/FasL in Human Dental Pulp Stem Cells (hDPSCs). *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00279>
- 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., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Prósper F, Gavira JJ, Herreros J, Rábago G, Luquin R, Moreno J, Robles JE, Redondo P. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre [Cell transplant and regenerative therapy with stem cells]. *An Sist Sanit Navar*. 2006;29 Suppl 2:219-34. Spanish. PMID: 16998528.
- Prowse, A. B. J., Chong, F., Gray, P. P., & Munro, T. P. (2011). Stem cell integrins: Implications for ex-vivo culture and cellular therapies. *Stem Cell Research*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.09.005>
- Qu, C., Brohlin, M., Kingham, P. J., & Kelk, P. (2020). Evaluation of growth, stemness, and angiogenic properties of dental pulp stem cells cultured in cGMP xeno-/serum-free medium. *Cell and Tissue Research*, 380(1), 93–105. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03160-1>

- Rahmig, S., Kronstein-Wiedemann, R., Fohgrub, J., Kronstein, N., Nevmerzhitskaya, A., Bornhäuser, M., Gassmann, M., Platz, A., Ordemann, R., Tonn, T., & Waskow, C. (2016). Improved Human Erythropoiesis and Platelet Formation in Humanized NSGW41 Mice. *Stem Cell Reports*, 7(4), 591–601. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.005>
- Rambhia, K. J. & Ma, P. X. (2019). Biomineralization and Bone Regeneration. En *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier Inc. Chapter 48. Pag 853-866. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809880-6.00048-5>
- Reddi, A. H., & Iwasa, K. (2019). Morphogenesis, Bone Morphogenetic Proteins, and Regeneration of Bone and Articular Cartilage. En *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier Inc. Chapter 25. Pag 405-416 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809880-6.00025-4>
- Reichert, J. C., Gohlke, J., Friis, T. E., Quent, V. M. C., & Hutmacher, D. W. (2013). Mesodermal and neural crest derived ovine tibial and mandibular osteoblasts display distinct molecular differences. *Gene*, 525(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.026>
- Rodríguez, M. A. L., Rodríguez, A. E. C., Carrillo, E. A. S., Alejandra Guerrero Álvarez Nava, S., & Acevedo, A. F. F. O. (2015). *Compendio De Histología Medica Y Celular*.
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering C*, 78, 1246–1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>
- Saito, M. T. (2015). Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World Journal of Stem Cells*, 7(2), 399. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i2.399>
- Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., Hibi, H., Kadomatsu, K., Ishiguro, N., & Ueda, M. (2012). Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 80–90. <https://doi.org/10.1172/JCI59251>
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 19(5), 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.004>
- Schmitz, John P., Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 205, 299–308.
- Schüttler, K. F., Bauhofer, M. W., Ketter, V., Giese, K., Eschbach, D. A., Yenigün, M., Fuchs-Winkelmann, S., & Paletta, J. R. J. (2020). Direct incorporation of mesenchymal stem cells into a Nanofiber scaffold – in vitro and in vivo analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 9557. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66281-6>

- Seebach, C. (2015). Improved Bone Formation by Differentiated Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Seeded on High Concentrated Bioglass-Polylactic Acid Composite in Calvarial Rat Bone Defect. *Stem Cells Research, Development & Therapy*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.24966/SRDT-2060/100004>
- Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y., & Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
- Seo, B.M., Sonoyama, W., Tamaza, T., Coppe, C., Kikuri, T., Akiyama, K., Lee, J.S., Shi, S. (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.*, 14(5), 428–434. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Shi, X., Mao, J., & Liu, Y. (2020). Concise review: Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem cells translational medicine*, December 2019, 1–21. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0398>
- Shih, D. T., Lee, D., Chen, S., Tsai, R., Huang, C., Tsai, C.-C., Shen, E.-Y., & Chiu, W.-T. (2005). Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. *Stem Cells*, 23(7), 1012–1020. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0125>
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.-Y., Shi, S., & Wang, S. (2006). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE*, 1(1), e79. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000007>
- Spath, L., Rotilio, V., Alessandrini, M., Gambarà, G., De Angelis, L., Mancini, M., Mitsiadis, T. A., Vivarelli, E., Naro, F., Filippini, A., & Papaccio, G. (2010). Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6 B), 1635–1644. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00848.x>
- Tannenbaum, J. & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch’s 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(2), 120–132.
- The Jackson Laboratory. (2018). *Mouse Strain Datasheet - 001303*.
- Thomson, J., Itskivitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., Jones, J. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tian, D. M., Liang, Y. M., & Zhang, Y. Q. (2016). Endothelium-targeted human Delta-like 1 enhances the regeneration and homing of human cord blood stem and progenitor cells. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0761-0>

- Tu, C., Chen, J., Huang, C., Xiao, Y., Tang, X., Li, H., Ma, Y., Yan, J., Li, W., Wu, H., & Liu, C. (2020). Effects of electromagnetic fields treatment on rat critical-sized calvarial defects with a 3D-printed composite scaffold. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 433. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01954-7>
- Uchida, H., Niizuma, K., Kushida, Y., Wakao, S., Tominaga, T., Borlongan, C. V., & Dezawa, M. (2017). Human Muse Cells Reconstruct Neuronal Circuitry in Subacute Lacunar Stroke Model. *Stroke*, 48(2), 428–435. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.014950>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J. J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *Altex*, 35(1), 99–118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>
- Verfaillie, C. M. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*, 12(11), 502–508. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02386-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02386-3)
- Vernal, R., & Garcia-Sanz, J. (2008). Th17 and Treg Cells, Two New Lymphocyte Subpopulations with a Key Role in the Immune Response Against Infection. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 8(4), 207–220. <https://doi.org/10.2174/187152608786734197>
- Viña-Almunia, J., Borrás, C., Gambini, J., El Alamy, M., Peñarrocha, M., & Viña, J. (2016). Influence of different types of pulp treatment during isolation in the obtention of human dental pulp stem cells. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 21(3), e374–e379. <https://doi.org/10.4317/medoral.20957>
- Wang, D., Lin, Y., Chen, L., Mo, Y., Huang, P., & Ma, R. (2018). Guided bone regeneration using a bone tissue engineering complex consisting of a poly- dl -lactide membrane and bone mesenchymal stem cells. *Oncotarget*, 9(23), 16380–16388. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23594>
- Wongsupa, N., Nuntanaranont, T., & Kamolmattayakul, S. (2017). Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells / poly (ε -caprolactone) - biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5883-x>
- Wu, W., Zhou, J., Xu, C. T., Zhang, J., Jin, Y. J., & Sun, G. L. (2015). Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5127–5134. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4106>

- Xiao, J., Yang, D., Li, Q., Tian, W., & Guo, W. (2018). The establishment of a chemically defined serum-free culture system for human dental pulp stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–15.
- Xu, G.-P., Zhang, X.-F., Sun, L., & Chen, E.-M. (2020). Current and future uses of skeletal stem cells for bone regeneration. *World Journal of Stem Cells*, 12(5), 339–350. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i5.339>
- Yang, J. W., Shin, Y. Y., Seo, Y., & Kim, H. S. (2020). Therapeutic Functions of Stem Cells from Oral Cavity: An Update. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms21124389>
- Yasui, T., Mabuchi, Y., Toriumi, H., Ebine, T., Niibe, K., Houlihan, D. D., Morikawa, S., Onizawa, K., Kawana, H., Akazawa, C., Suzuki, N., Nakagawa, T., Okano, H., & Matsuzaki, Y. (2015). *Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration*. 1–9. <https://doi.org/10.1177/0022034515610748>
- Zeitlin B. D. (2020). Banking on teeth - Stem cells and the dental office. *Biomedical journal*, 43(2), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.02.003>
- Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S., & Le, A. D. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *The Journal of Immunology*, 183(12), 7787–7798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902318>
- Zuk, P., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D., Huang, J., Mizuno, H., Alfonso, Z., Fraser, J., Berhaim, P., & Hedrick, M. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 13(1), 4279–4295. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.007>

ANEXOS:

ANEXO 1: APROBACIÓN DE PROYECTO CONICYT PAI N° 79160076



Comisión Nacional de Investigación
Científica y Tecnológica - CONICYT

Santiago, 20 de octubre de 2016

Sr.
Flavio Salazar Onfray
Vicarrector de Investigación y Desarrollo
Universidad de Chile
Presente

Estimado Sr. Salazar:

Mediante la presente quisiera informarle que finalizó el proceso de selección y adjudicación de la convocatoria del Concurso Nacional de Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia año 2016, convocatoria única.

Al respecto, informo a Usted que **la postulación presentada por la Universidad de Chile, denominada "Creación de una nueva línea de investigación en células madres de origen denterio y maxilo facial en la Facultad de Odontología Universidad de Chile", fue seleccionada para recibir los beneficios de CONICYT. En el Anexo 1 encontrará una síntesis del análisis realizado en el proceso de evaluación.**

Junto con darle mis más sinceras felicitaciones, le comunico que usted cuenta con un plazo de diez (10) días hábiles para manifestar su aceptación o rechazo a la adjudicación de la propuesta de Inserción (Anexo 2). Le agradecemos comunique su decisión a Karen Ramírez, Coordinadora de la Línea de Inserción en la Academia, al correo electrónico kramirez@conicyt.cl, adjuntando una copia del Anexo 2 con su firma.

Una vez confirmada su aceptación a la adjudicación de la propuesta, enviaremos a usted el Convenio entre su institución y CONICYT con un detalle de los pasos a seguir y los documentos necesarios para hacer efectivo el traspaso de recursos.

Reiterando mis felicitaciones,

Le saluda atentamente,

Tomás De Aguirre Cox

Programa Atracción e Inserción de Capital Humano Avanzado
Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica



ANEXO 2: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Odontología – Departamento de Patología y Medicina Oral
Ed: 17/11/2016

Universidad de Chile

Facultad de Odontología Proyecto de Investigación PAI
Académico Responsable: Soledad Acuña M

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACION DE DIENTES PARA INVESTIGACIÓN

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- I. Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
- II. 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.

I. INFORMACION

Antecedentes Generales

Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio patrocinado por Conicyt, titulado "Células madres aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales". Este proyecto de investigación se enmarca en una estrategia institucional de la Facultad de Odontología para crear una nueva línea de investigación en la utilización de células madres para la terapia y regeneración tisular. El Investigador Responsable es la Dra. Soledad Acuña Mendoza, académica de nuestra Facultad. Para iniciar la nueva línea de investigación de células madres, nos focalizaremos en implementar técnicas de cultivo estandarizadas de células pulpares humanas (de diente temporal y permanente) y de ratón. Luego, las células madres obtenidas serán utilizadas en modelos animales para sentar las bases del estudio y desarrollo de técnicas en regeneración/repación tisular.

Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

Procedimiento de toma de las muestras

Se incluirán pacientes agendados para exodoncia de terceros molares, premolares o piezas temporales sanas en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología previa autorización del Cirujano tratante y de la firma del presente consentimiento informado visado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Los dientes recién extraídos serán lavados en solución Hanks y transportados en medio de cultivo DMEM/F12 en frío al laboratorio para su procesamiento.

El total de muestras y datos obtenidos serán registrados e identificados por el investigador responsable mediante códigos para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales y se utilizarán códigos para mantener oculta la identidad de los participantes. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable.



Dpto. de Odontología Patología/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 1903



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Odontología – Departamento de Patología y Medicina Oral
Ed: 17/11/2016

Beneficios de participar en el estudio

Se les dará a conocer y se consignará en su ficha clínica los resultados de los análisis que resultan de las muestras biológicas tomadas a los pacientes.

Riesgos de participar el estudio

No hay riesgo para para el paciente. En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable: Soledad Acuña, son: 9781700.

El presente protocolo no tiene costo para el paciente y todos los eventos adversos serán resueltos sin costo para el paciente. Se señala además que en el presente estudio no hay retribución económica.

Procedimiento de resguardo de la información personal

En conformidad a las leyes vigentes, la información recogida a través del examen o de la entrevista, al igual que sus datos personales o los de su representado, se analizarán y archivarán de manera codificada para garantizar su confidencialidad, ya que los datos serán utilizados estrictamente para fines científicos y que aún tras la publicación de los resultados se continuará con la debida reserva. No obstante, el equipo de investigación, la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile o sus representantes, y el Comité de Ética Científico (CEC) podrán acceder a los datos confidenciales después de haber pasado por el proceso de anonimación, lo que permite que sus datos no sean identificados por su nombre.

La información que Ud. nos facilite sólo será utilizada o revelada para la realización de este estudio de investigación y los resultados que se obtengan serán presentados en ponencias de congresos y publicaciones escritas, resguardando la confidencialidad de los participantes.

Para mayor detalle del protocolo utilizado para el resguardo de información personal, leer apartado de Protocolo de Protección de Datos Nominativos.

Información complementaria

Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, acudiendo calle Olivos N°943, Independencia, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Departamento de Patología y Medicina Oral y comunicarse con la Dra. Acuña los días martes, jueves o viernes de 8 a 12 horas o al teléfono 29781839.

También puede contactarse con el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología cuyo presidente es el Dr. Eduardo Fernández Godoy, al fono 29781703, en horarios de oficina o al mail cec.fouch@odontologia.uchile.cl.



Dpto. de Odontología Patología/Olivos N°943, Independencia☎: 9781839/Casilla 1903



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Odontología - Departamento de Patología y Medicina Oral
Ed: 17/11/2016

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaro haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mí entregados.

Declaro haber leído y comprendido el protocolo donde se me explica como mis datos personales van ser resguardados, analizados y archivados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el Presidente del Comité de Ética de la Investigación de la Facultad, Dr. Eduardo Fernández.

Identificación Paciente

Nombre: _____
Rut: _____
Fono: _____
Firma _____ Fecha: _____

Identificación Testigo

Nombre _____
Fono: _____
Firma _____ Fecha: _____

Identificación del Director de la Clínica Odontológica

Nombre _____
Fono: _____
Firma _____ Fecha: _____

Identificación Investigador Responsable

Nombre: _____
Fono: _____
Firma _____ Fecha: _____



ANEXO 3: AUTORIZACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR PARTE DE COMITÉ DE ÉTICA CIENTÍFICO.



INFORME

PROYECTO: "Células madres aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales",

Investigadora Responsable: Dra. Soledad Acuña.

Se justifica el estudio debido a que el IP declara el uso exclusivo de las células madres que extraerá de 15 dientes donados por pacientes que consientan mediante CI firmado, la IP declara manejo estricto y confidencial de los datos

Visado Consentimiento:

El CI cumple con los requisitos solicitados por este comité de ética

Prof. Dr. Eduardo Fernández Godoy
Presidente Comité Etico Cientifico



Santiago, noviembre 14 de 2016.

ANEXO 4: PROTOCOLO DE TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA EVALUAR DIFERENCIACIÓN OSTEOGENICA EN LABORATORIO DE HISTO-MORFOLOGIA ORAL DE LA FOUCH.

- Fijar muestra con paraformaldehido al 4% durante 30 minutos a 4°C
- Lavar con PBS 1X, 3 veces durante 5 minutos
- Permeabilizar células con Triton™ X-100 0,2% (Sigma-Aldrich©) en 3.6% de formaldehido durante 10 minutos.
- Bloquear reacción con PBS/BSA al 1% durante 1 hora.
- Lavar con PBS 1X 2 veces
- Incubar marcador nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen D1306) durante una hora
- Incubar anticuerpo primario Osteocalcin Antibody (23418-1-AP) (Invitrogen) 1:200, durante 10 minutos
- Lavar con PBS 1X, 2 veces.
- Incubar con fluoróforo Alexa Fluor® 488 (color verde) (Invitrogen™), a una dilución de 1/1000 durante 10 minutos
- Lavar con PBS 1X, 2 veces.
- Incubar con 0.5 µg/ml de rodamina-faloidina en PBS durante 15 minutos.
- Lavar con PBS 1X, 2 veces.
- Secado y montaje (DAKO®) para su posterior observación en microscopio confocal (LSM 880 AiryScan (Zeiss ©)).

ANEXO 5: PROTOCOLO DE TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA EVALUAR DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN LABORATORIO DE HISTO-MORFOLOGIA ORAL DE LA FOUCH.

- Fijar muestra con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a 4°C
- Lavar con PBS 1X, 3 veces durante 5 minutos
- Permeabilizar células con Triton™ X-100 0,2% (Sigma-Aldrich©) en 3.6% de formaldehído durante 10 minutos.
- Bloquear reacción con PBS/BSA al 1% durante 1 hora.
- Lavar con PBS 1X, 2 veces
- Incubar marcador nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) DAPI Staining Solution (ab228549) Abcam©
- Incubar anticuerpo primario Anti-NeuN antibody, ab279297, Abcam©; Anti-GFAP antibody, ab4674, Abcam©) 1:200, durante 10 minutos
- Lavar con PBS 1X, 2 veces.
- Incubar con fluoróforo Alexa Fluor® 488 (color verde) (Abcam©), a una dilución de 1/1000 durante 10 minutos
- Lavar con PBS 1X, 2 veces.
- Secado y montaje (DAKO®) para su posterior observación en microscopio confocal (LSM 880 AiryScan (Zeiss ©)).

ANEXO 6: AUTORIZACIÓN COMITÉ DE INSTITUCIONAL DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CICUA)



UNIVERSIDAD DE CHILE
COMITÉ INSTITUCIONAL de CUIDADO y USO de ANIMALES (CICUA)

1

PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES (Debe ser presentado en español)

Uso Interno

Investigador: Dra. Soledad Acuña
Código CICUA: FOUCH111601



A. ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS

A.1. Título y tiempo de ejecución del proyecto presentado (mes y año de inicio y término).
Células madres aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales

Mes de inicio: marzo 2017. Mes de término: febrero 2020

A.2. Tipo de proyecto y actividad (marque con una cruz)

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: DOCENCIA: TESIS: OTRO:

Fuente Financiamiento (Nombre y n°):
Programa para la inserción a la academia (PAI) 2016

A.3. Nombre del Investigador Responsable: Soledad Acuña Mendoza

Nombre Patrocinado, si existiese (Investigador externo, Postdoctorante, Tesista):

A.4. Teléfono(s) de contacto: Numero de departamento: (56-2)2 978 1791
En caso de urgencia me puede llamar al celular 0033 658242418 (cuando viva en Chile y tenga numero chileno lo informaré a la Plataforma Experimental)
e-mail: soledad.acuna@u.uchile.cl

A.5. Mencione el Laboratorio y Departamento de la Facultad en la que se desarrollará el trabajo con animales Laboratorio de histología y patología. Departamento de Patología y medicina oral.

A.6. Contacto en caso de una emergencia con los animales en horario no laboral.

Nombre: Soledad Acuña Mendoza Teléfono: 0056 222675372 (casa del representante legal en Chile)
Cuando tenga casa y teléfono en Chile lo comunicaré a la Plataforma de Experimentación.

ANEXO 7: CERTIFICADO DE APROBACIÓN DE COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOSEGURIDAD (CIB)



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°89

Santiago, 15 de Noviembre de 2016.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación titulado "Células madres aisladas de pulpa dentaria para la regeneración en tejidos maxilofaciales". El Investigador Responsable de este proyecto es Dra. Soledad Acuña Mendoza.

Todos los ensayos propuestos a realizar del tipo bioquímicos como la obtención de las pulpas dentarias de molares y premolares/terceros molares provenientes de ratones y humanos, respectivamente, así como inmunohistoquímica se procesarán en el Laboratorio de Anatomía Patológica; los ensayos moleculares como PCR en tiempo real se realizarán en el Laboratorio de Biología Periodontal y, por último, los ensayos con los ratones BalbC y ratones transgénicos (*Mus musculus* C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J) se realizarán en la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología. El personal técnico que manipulará las muestras biológicas y los animales se encuentra debidamente entrenados en esta área. Además, ellos estarán bajo la supervisión de la Dra. Acuña.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico, químico y animales de experimentación a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Acuña para ser presentado al Concurso Nacional Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia (Programa de Atracción e Inserción de Capital Humano Avanzado, PAI) 2016.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

Niveles de Dolor o Aflicción

- A. Mínimo dolor y estrés:** Mínima molestia de los animales durante procedimientos NO QUIRÚRGICOS. Ejemplos: sujeción para observación o exámenes físicos, toma de muestras de sangre, inoculación de sustancias en pequeñas cantidades por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal u oral, pero no intratorácica o intracardiaca (Categoría B), estudios agudos sin supervivencia en los cuales los animales son completamente anestesiados y no recobran la conciencia, períodos cortos de privación de agua y comida (equivalentes a los que podrían ocurrir en condiciones naturales) o modificaciones ambientales leves, métodos de eutanasia con rápida pérdida de conciencia (sobredosis de anestésicos, decapitación luego de sedación o anestesia).
- B. Dolor asistido por medidas apropiadas:** Mínima dolor o aflicción debido al uso de medicamentos apropiados para disminuir o eliminar las molestias de los animales. Es el caso de la mayoría de los procedimientos QUIRÚRGICOS asociados a protocolos anestésicos y analgésicos apropiados. Ejemplos: canulación o cateterización de vasos sanguíneos o cavidades corporales bajo anestesia; cirugías menores bajo anestesia general o local tales como biopsias, laparoscopia; cirugías mayores bajo anestesia general con recuperación subsiguiente; sujeción o inmovilización por tiempos cortos pero que por observación evidencian leve disconfort o stress del animal; tiempo prolongado (varias horas) de inmovilización; inducción de conductas estresantes; inducción de anormalidades anatómicas, fisiológicas o enfermedades que ocasionan dolor o stress pero que esta aliviado por medidas apropiadas. Procedimientos en esta categoría no deberían causar cambios significativos en la apariencia general del animal ni en parámetros tales como frecuencia cardiaca, respiratoria, excreción urinaria y fecal, o comportamiento social.
- C. Dolor no asistido por medidas apropiadas:** Dolor o aflicción sin el uso de medicamentos para disminuir o eliminar las molestias de los animales. Si existen animales en esta categoría, el investigador debe tener una clara y sólida justificación. Ejemplos: exposición a noxas o agentes cuyos efectos son desconocidos; exposición a drogas o químicos en niveles que pueden causar la muerte, dolor severo o gran stress; estudios de comportamiento en los cuales el nivel de stress producido se desconoce; uso de relajantes musculares o drogas que producen parálisis sin usar previa anestesia; quemaduras o traumas dolorosos en animales conscientes; y todo otro procedimiento que pueda ocasionar stress severo u ocasione dolor intenso que no pueda ser aliviado por analgésicos (por ejemplo ensayos de toxicidad o infecciones experimentales en los cuales el final del experimento es la muerte del animal). Exposición a drogas o químicos en niveles incompatibles con los sistemas fisiológicos y que induzcan un malestar crónico sin medidas paliativas. Los estudios asociados a esta categoría no debiesen ser muy prolongados o de severo daño clínico para disminuir al máximo el tiempo de exposición al dolor y aflicción. El malestar puede detectarse por marcada anormalidad en los patrones de comportamiento, ausencia de "acicalamiento", deshidratación, "vocalización" anormal, anorexia prolongada; letargia; trastornos al caminar y moverse, o signos clínicos severos de infección local o sistémica.

ANEXO 9: PROTOCOLO DE TINCIÓN DE HEMATOXILINA/EOSINA DE LABORATORIO DE HISTO-MORFOLOGIA ORAL DE LA FOUCH.

La Hematoxilina-Eosina (H/E) es una de las técnicas básicas de tinción utilizada en histología. La técnica establece la aplicación de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina, que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, tales como el citoplasma (Feldman & Wolfe, 2014).

PROTOCOLO

- Desparafinar cortes mediante baños de 10 minutos en xileno (2 baños), alcohol 100° (2 baños), alcohol 95° (2 baños) y agua destilada (2 baños) de forma secuencial.
- Sumergir muestras desparafinadas en hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
- Lavar en agua corriente por 3 minutos.
- Sumergir por 3 minutos en eosina
- Lavado con agua corriente por 3 minutos
- Deshidratar los cortes recién teñidos en alcohol en concentraciones crecientes 95° y 100° (2 baños de 10 min c/u) y xilol (2 baños de 10 min c/u), para su montaje final con cubreobjetos usando el polímero de metacrilato Flo-Tex (Laboratorios Lerner).

ANEXO 10: PROTOCOLO DE TINCIÓN TRICRÓMICO DE MASSON-GOLDNER DE LABORATORIO DE HISTO-MORFOLOGIA ORAL DE LA FOUCH.

La técnica de tricrómico de Masson-Goldner permite observar los núcleos celulares de color pardo oscuro a negro; la matriz fibrosa madura (fibra de colágeno tipo I del tejido óseo maduro) de color verde azulado; citoplasma, musculatura y tejido osteoide de color rojo o marrón claro; y eritrocitos de color anaranjado luminoso.

Para esta tinción se usó el Kit de tinción “Masson-Goldner Merk (Art. 1.00485.0001)”

PROTOCOLO

- Desparafinar cortes mediante baños de 10 minutos en xileno (2 baños), alcohol 100° (2 baños), alcohol 95° (2 baños) y agua destilada (2 baños) de forma secuencial.
- Sumergir muestras desparafinadas en hematoxilina férrica de Weigert durante 5 minutos.
- Lavar en agua corriente por 3 minutos.
- Lavar con ácido acético 1% durante 30 segundos.
- Sumergir muestras en azofloxina por 10 minutos.
- Lavar con ácido acético 1% durante 30 segundos.
- Sumergir muestras en solución de ácido fosfo-volfrámico (ácido fosfotúngstico)-anaranjado G por 1 minuto.
- Lavar con ácido acético 1% durante 30 segundos
- Sumergir muestras en Verde luz SF en solución durante 2 minutos
- Lavar con ácido acético 1% durante 30 segundos
- Deshidratar los cortes recién teñidos en alcohol en concentraciones crecientes 95° y 100° (2 baños de 10 min c/u) y xilol (2 baños de 10 min c/u), para su montaje final con cubreobjetos usando el polímero de metacrilato Flo-Tex (Laboratorios Lerner).