



CARACTERIZACIÓN DE LA PAPILA APICAL COMO UN NICHOS DE CÉLULAS  
TRONCALES MESENQUIMALES EN DIENTES PERMANENTES INMADUROS  
MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Trabajo de investigación  
requisito para optar al  
Título de cirujano dentista

Alumno: Álvaro Monsalve Gutierrez

Docente guía: Prof. Isaac García Carrillo PhD.

*Al profesor Eduardo Couve*

## Agradecimientos

Al Profesor Eduardo Couve, con quien comenzamos esta investigación hace ya mucho tiempo, y cuyos consejos y enseñanzas fueron fundamentales durante el desarrollo de mi carrera y me inspiraron a seguir el camino de la ciencia.

Al Profesor PhD. Isaac García, mentor y tutor de esta tesis y cuyas enseñanzas fueron fundamentales y enumerarlas al detalle requeriría una sección aparte.

A PhD. Barbara Cádiz y al Sr. Fidel Espinoza del Laboratorio de Microscopía Avanzada de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso por su apoyo y consejo en el procesamiento y observación de las muestras.

Al Profesor MSC. Rodrigo Fuentes de la Cátedra de Patología, por su apoyo y consejo como docente informante de esta tesis.

A las Profesoras MSC Paula Vallejo y PhD. Angelina Palacios de la cátedra de ciencias básicas por sus constantes consejos y apoyo durante mis años como ayudante

A mis amigas Alejandra por sus recomendaciones musicales, a Constanza por estar siempre, a Jeannette por cuidarme siempre incluso siempre a la distancia, y a las tres por entender lo importante que este proyecto era para mi.

A mis padres Ximena y Fernando, los más importantes, sin quienes nada de esto hubiese sido posible.

*Oh, I get by with a little help from my friends  
Mm, I get high with a little help from my friends  
Mm, gonna try with a little help from my friends*

*The Beatles*

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	3
2.1. Células troncales mesenquimales.....	3
2.2. Dientes permanentes.....	17
2.3. Papila apical.....	22
3. Pregunta de investigación.....	30
4. Objetivos.....	30
5. Hipótesis.....	31
6. Diseño metodológico.....	32
7. Materiales y métodos.....	33
8. Resultados.....	38
9. Discusión.....	46
10. Conclusiones.....	51
11. Sugerencias.....	52
12. Referencias bibliográficas.....	53
13. Anexos.....	63

## Resumen

**Introducción:** La papila apical es un tejido ubicado en el ápice de los dientes inmaduros del cual se han aislados células que cumplen con las características de células troncales mesenquimales, sin embargo, se han realizado pocos estudios acerca de las condiciones de las células en la papila.

**Objetivo:** Caracterizar las células troncales mesenquimales de la papila apical, su metabolismo de oxígeno y su relación con los componentes neurovasculares mediante inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia.

**Materiales y métodos:** Caracterizamos marcadores de células troncales e hipoxia mediante inmunohistoquímica. Los dientes inmaduros recién extraídos se fijaron en PFA y se desmineralizaron en EDTA durante 3 meses, luego se criopreservaron y se realizaron cortes de 25  $\mu\text{m}$  en criostato. Los cortes, montados en portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios, finalmente se marcaron los núcleos con DAPI, se montaron los cubreobjetos y una vez secas, las muestras se observaron y analizaron con microscopio confocal.

**Resultados:** Se detectó la expresión de los marcadores de células troncales mesenquimales CD73, CD90, CD105, CD146 y STRO-1, así como la expresión de HIF-1 $\alpha$  en una amplia zona de la papila. La expresión de  $\beta$ -Tubulina III de fue escasa al igual que la expresión de CD31 y  $\alpha$ -SMA.

**Conclusión:** La papila apical es un tejido escasamente innervado y pobremente vascularizado, que alberga una población de células troncales mesenquimales en condiciones de hipoxia. La evidencia apoya la idea de que la papila apical corresponde a un nicho de células troncales.

## **Glosario de términos y abreviaturas**

- BMSCs: *Bone marrow stem cells* (Células troncales de la médula ósea).
- DFSCs: *Dental follicle stem cells* (Células troncales del folículo dental).
- DPSCs: *Dental pulp stem cells* (Células troncales de la pulpa dental).
- GMSCs: *Gingival-derived mesenchymal stem cells* (Células troncales mesenquimales de la encía).
- HIF: *Hypoxia inducible factor* (Factor inducido por hipoxia)
- IPAPCs: *Inflamed periapical progenitor cells* (Células progenitoras de periapices inflamados)
- MSC: *Mesenchymal stem cells* (Células troncales mesenquimales).
- OESCs: *Oral epithelial stem cells* (Células troncales del epitelio oral)
- PDLSCs: *Periodontal ligament stem cells* (Células troncales del ligamento periodontal).
- PSCs: *Periosteal stem cells* (Células troncales del periostio)
- PECAM: *Platelet endothelial cell adhesion molecule* (Molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias)
- SCAP: *Apical papilla stem cells* (Células troncales de la papila apical).
- SGSCs: *Salivary gland stem cells* (Células troncales de las glándulas salivales).
- SHED: *Stem cells from human exfoliated deciduous teeth* (Células troncales de dientes deciduos exfoliados humanos).
- TGPCs: *Tooth germ progenitor cells* (Células progenitoras del germen dental).

## Introducción

Las células troncales mesenquimales (MSC) son células indiferenciadas, con capacidad de dividirse simétrica o asimétricamente, diferenciarse en múltiples linajes, ser móviles y organizarse en agrupaciones multifuncionales, que se han identificado en múltiples tejidos humanos incluyendo tejidos orales<sup>1</sup>. En las últimas décadas su capacidad de proliferación, diferenciación e inmunomodulación ha llevado al desarrollo de un gran número de terapias experimentales basadas en sus propiedades<sup>1,2</sup>.

Uno de estos tratamientos consiste en usar las propiedades de las células de la papila apical para conseguir la regeneración de dientes inmaduros afectados por pulpitis o necrosis pulpar<sup>3</sup>. La papila apical es un tejido blando ubicado en el ápice de un diente definitivo inmaduro, que estaría implicado en el desarrollo de la raíz<sup>4</sup>. Se cree que constituye un nicho de MSC que tienen características diferentes a las células troncales de la pulpa dental (DPSC)<sup>5,6</sup>. Estas células han recibido el nombre de células troncales de la papila apical (SCAP)<sup>7</sup>.

La aparición cada vez más frecuente de tratamientos basados en células troncales es algo que algunos expertos ven con cautela<sup>8</sup>. Las propiedades inmunomoduladoras y paracrinas, los mecanismos de transmigración y orientación de estas células<sup>8</sup>, así como las condiciones del microambiente (nicho) que ocupan en los tejidos y sus efectos sobre su identidad celular y sus propiedades regenerativas, aún requieren más investigaciones<sup>8,9</sup>. Se ha planteado el rol modulador que juega en las células troncales un bajo metabolismo de oxígeno (hipoxia), el cual sería clave para la mantención de sus propiedades y que es regulado por el nicho<sup>9</sup>. Dada la heterogeneidad de las células clasificadas como “*células troncales mesenquimales*” este término ha sido cuestionado, llegando a proponerse uno centrado en sus aplicaciones terapéuticas: “*células de señalización medicinal*”<sup>10,11</sup>. Mientras estas interrogantes no sean resueltas, su uso en humanos debe ser cuidadoso, dado que puede acarrear efectos negativos<sup>12</sup>.

Los conocimientos acerca de la biología papila apical también son escasos; cultivos de células de papila apical han reportado una población de células que expresan marcadores de diferenciación clásicos de MSC, así como CD24 un marcador no reportado en otras poblaciones de MSC de origen dental<sup>13</sup>. El análisis fenotípico de las células en cultivo también ha permitido caracterizar subpoblaciones celulares<sup>14</sup>, fenómeno que no ha sido reportado *in situ* en la papila apical. Se debe tener en cuenta que el proceso de aislamiento y cultivo puede alterar las propiedades de las células<sup>6,15</sup>, por lo tanto se requieren más estudios que investiguen las características de las células en el tejido, tanto linaje como su forma y función. Hay evidencia del rol modulador de la papila sobre las células<sup>16</sup>, por lo que se ha propuesto que la papila apical es un nicho de MCS<sup>14</sup>, sin embargo, algunas características propias de los nichos, como el metabolismo de oxígeno o su relación con componentes neurovasculares<sup>9,17</sup>, no se han reportado en este tejido.

El uso de células troncales en terapias de endodoncia regenerativa<sup>18</sup>, así como sus propiedades de diferenciación en estudios experimentales<sup>14</sup>, las convierten en buenas candidatas para el desarrollo de terapias regenerativas más complejas, sin embargo, se requiere un mayor número de estudios que definan su eficacia y seguridad<sup>19</sup>. La realización de estudios descriptivos de la papila usando microscopía confocal para observar la expresión de marcadores podría aportar a comprender mejor la biología de estas células.

El objetivo de este estudio es caracterizar las células troncales mesenquimales de la papila apical, su metabolismo de oxígeno y su relación con los componentes neurovasculares mediante inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia.

## Marco teórico

### 1. Células troncales mesenquimales

#### 1.1 Generalidades

Las células troncales son muy antiguas y conservadas en la evolución, siendo comunes a prácticamente todos los organismos pluricelulares, en los cuales son fundamentales en procesos como desarrollo, crecimiento y homeostasis tisular<sup>20</sup>. Las células troncales de los vertebrados se caracterizan por su capacidad para dividirse simétrica o asimétricamente, ser móviles, presentar distintos niveles de potencialidad y organizarse en unidades clonogénicas<sup>1</sup>.

En 1974 Friedenstein *et al.*, aisló a partir de la médula ósea células con morfología fibroblastoide, capaces de adherirse y crecer en placas de cultivo, que denominó “*células estromales*”, estas células además eran capaces de diferenciarse *in vivo* en osteoblastos e *in vitro* en adipocitos, condrocitos y osteocitos<sup>11·21</sup>. En 1991 Caplan propuso el término “*células troncales mesenquimales*” para referirse a estas células<sup>22</sup>. El término propuesto por Caplan se volvió muy popular y actualmente es el más utilizado para referirse a este grupo de células que se han aislado a partir de múltiples tejidos humanos y animales adultos<sup>11</sup>.

La función de las MSC sería mantener la renovación celular en los tejidos tanto en homeostasis como en procesos de reparación tisular<sup>23</sup>. Su condición de “*mesenquimales*” se debe a que derivan de las células mesenquimales embrionarias, que durante el desarrollo embrionario migran hacia distintas partes del embrión para dar origen a los tejidos conectivos y que en un principio se propuso eran de origen mesodérmico, sin embargo, la evidencia actual muestra que su origen es complejo y se remonta a todas las capas embrionarias<sup>11·23</sup>. Aún es una interrogante si las MCS en cultivos representan alguna etapa o estado de las MSC en estado nativo<sup>1</sup>.

## 1.2 Caracterización

En 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció tres criterios mínimos que deben cumplir las células aisladas y cultivadas para ser consideradas MSC: (1) Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; (2) Multipotencialidad: capacidad de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones estándar de diferenciación; (3) Expresión de moléculas de superficie: al ser analizadas utilizando citometría de flujo un  $\geq 95$  % de la población de células debe expresar CD73, CD90 y CD105, así como no expresar o expresar en niveles mínimos ( $\leq 2\%$ ) CD11b, CD14, CD16, CD34, CD45, CD79a o HLA de Clase II<sup>24</sup>. La utilización de marcadores de diferenciación celular es útil para caracterizar fenotípicamente las células, permitiendo su identificación y aislamiento de células, poblaciones y subpoblaciones, caracterizar estados de diferenciación, así como ayudar al diagnóstico de enfermedades<sup>25</sup>.

El marcador de membrana CD73, también conocido como Ecto 5'-Nucleotidasa, es una glicoproteína que se encarga de transformar AMP en adenosina, que se expresa de manera constitutiva en células endoteliales y del sistema inmune. En MSC parece tener un rol en la diferenciación<sup>26-27</sup>. CD90 también llamada THY-1, es una proteína de membrana anclada a glicofosfatidilinositol, se expresa en muchos tipos de células como neuronas, fibroblastos y MSC, en las que parece cumplir un papel en la mantención del estado indiferenciado y la capacidad de proliferación, diferenciación y motilidad celular<sup>28-29</sup>. CD105 (Endoglina) también es una glicoproteína de membrana, actúa como co-receptor de TGF- $\beta$  y juega un rol fundamental en la angiogénesis, la migración celular y se relaciona con un mayor potencial de diferenciación de las células<sup>29-30-31</sup>.

Estos tres marcadores, fundamentales para la caracterización de las MSC, han sido reportados en poblaciones de células aisladas de múltiples tejidos<sup>29-32</sup>, además han sido reportados en muestras de tejidos, tanto de manera individual, como en conjunto; se han reportado células perivasculares que expresan CD90 y CD105 en

muestras de pulmón<sup>33</sup>, así como células placentarias que co-expresan los tres marcadores<sup>34</sup>. La expresión parece tener asociación funcional con la expresión de otros marcadores<sup>28</sup>. Otros marcadores que se han reportado en MSC son CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49, CD51, CD54, CD106, CD117, CD146, CD166, CD271 y STRO-1<sup>8-15</sup>, de los cuales CD146 y STRO-1, han demostrado ser especialmente útiles para aislar MSC desde la médula ósea<sup>11</sup>.

CD146, un marcador también conocido como molécula de adhesión celular de melanomas (MCAM), por el tipo de tumor en que fue descrito por primera vez, es una glicoproteína de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresada principalmente por células endoteliales, se ha asociado a angiogénesis y tejidos en desarrollo<sup>35</sup>. CD146 se expresa en MSCs de diversos orígenes, asociándose a poblaciones con un alto potencial de proliferación y diferenciación<sup>35-36</sup>. La expresión de este marcador ha sido reportada *in situ*, en MSC no hematopoyéticas en la médula ósea, en una ubicación perivascular en co-expresión con CD271<sup>37</sup>.

STRO-1 aunque no se encuentra dentro de los marcadores definidos por la ISCT es uno de los marcadores de MSC más conocidos. STRO-1 es una proteína de membrana de tipo I, que se transloca desde el retículo endoplasmático a la membrana celular en respuesta al agotamiento intracelular del calcio<sup>36</sup>. Se ha asociado STRO-1 con el estado indiferenciado y de multipotencialidad. En cultivos se ha reportado que su expresión disminuye a medida que aumentan los pasajes celulares<sup>38</sup>. Aunque no se ha reportado en todos los tipos de MSC, es constante en algunos tipos, como las derivadas de origen dental<sup>36</sup>. La expresión *in situ* de este marcador se ha reportado en varios tejidos, como la médula ósea, tejido adiposo y pulpa dental, principalmente en una ubicación perivascular <sup>39-40</sup>.

Aunque continúa usándose, la definición propuesta por la ISCT parece ser insuficiente para caracterizar la complejidad y heterogeneidad de las MSC<sup>15</sup>. No hay marcadores específicos de MSC y la expresión de combinaciones específicas de

estos marcadores parece ser tejido-dependiente y ser afectada por los procesos de aislamiento y cultivo, por lo que los enfoques *in vitro* pueden ser limitados a la hora de abordar la biología de las MSC<sup>8,15</sup>. La mayoría de los estudios sobre MSC se centran en la multipotencialidad y la ingeniería de tejidos, sin embargo la comprensión acerca de la biología de las MSC, su ubicación anatómica y su rol en la fisiología y patología de los tejidos aún es escasa<sup>41</sup>.

Analizar la expresión de marcadores *in situ*, a través de microscopía parece ser un buen enfoque, pero está limitado por la cantidad de marcadores que se pueden pesquisar a la vez y por la cantidad relativamente baja de MSC que hay en los tejidos<sup>34</sup>.

### **1.2.1 Pericitos**

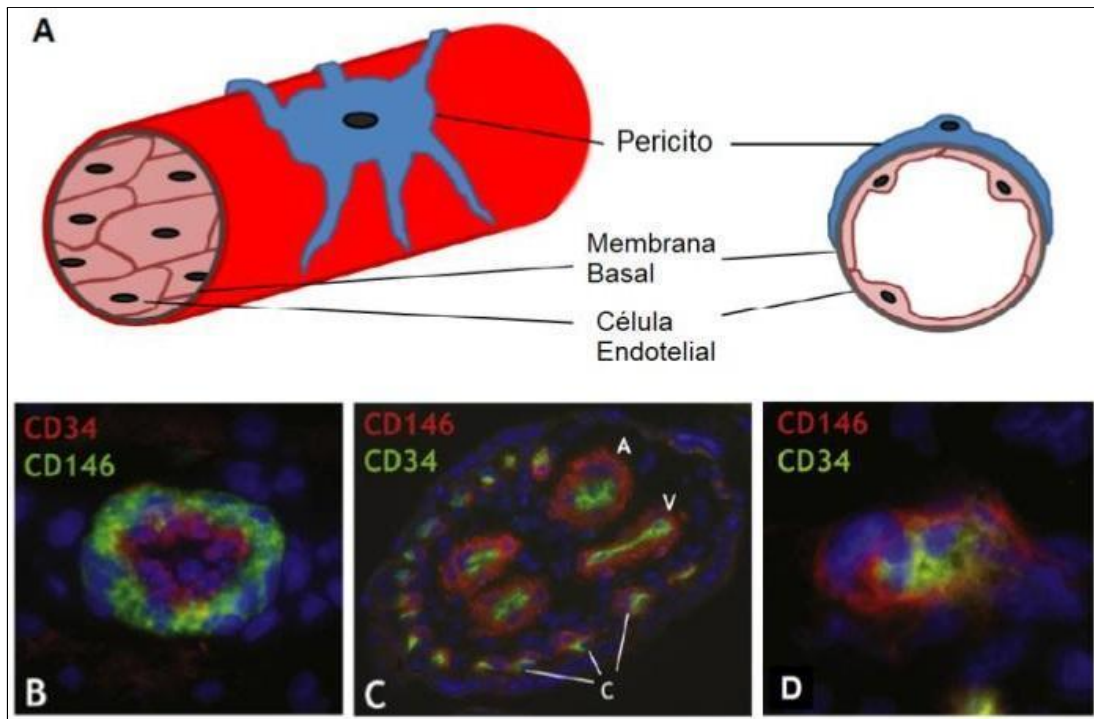
La evidencia parece indicar que en los tejidos adultos las MSC se comportan como pericitos<sup>42</sup>. Los pericitos son células ubicadas en capilares y pequeños vasos (Fig. 1), con morfología fibroblastoide, núcleo prominente y múltiples procesos citoplasmáticos a través de los cuales se mantienen en contacto con varias células endoteliales por medio de distintos complejos de unión, regulando el intercambio de sustancias entre el vaso y el tejido<sup>42,43</sup>. Se ha propuesto que los pericitos también juegan un importante rol en la angiogénesis y tienen la capacidad de actuar como células precursoras de endotelios y células de músculo liso<sup>43,44</sup>.

Los pericitos expresan marcadores que permiten asociarlos con las MSC; se ha reportado la expresión *in situ* e *in vitro* de CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 y STRO-1<sup>40,42</sup>. También se ha reportado adherencia al plástico y capacidad de diferenciación adipo, condro, mio y osteogénica<sup>45</sup>. Estas características de los pericitos se ajustan a la definición de MSC, lo que ha llevado a proponer que las MSC en los tejidos adultos son células perivasculares<sup>46,47</sup>. Esto también se apoya en que los pericitos se originan a

partir de células mesenquimales que son reclutadas por los vasos en formación durante la vasculogénesis<sup>43</sup>.

A pesar de la similitud fenotípica entre pericitos y MSC, también hay marcadores que no comparten, como Alfa-Actina de Músculo liso ( $\alpha$ SMA), reportado en pericitos y células de músculo liso<sup>43</sup>. Otros marcadores como CD146 han sido reportados en varios tipos de células, como endotelios, MSC y pericitos. Esto, sumado a que no existen marcadores específicos de pericitos dificulta su identificación<sup>43,48</sup>. En la capa adventicia de vasos de mayor calibre se ha detectado la presencia de una población de células que expresan marcadores de MSC pero que no expresan CD146 y que poseen características distintas de los pericitos<sup>49</sup>.

Se debe tener en cuenta que no todos los pericitos comparten el mismo origen embriológico, por ejemplo, los pericitos cerebrales se originan a partir del neuroectodermo<sup>48</sup>. Además, el análisis de transcriptomas y epigenomas de pericitos de distintos tejidos de origen demuestra que existe una pre-programación hacia un linaje específico<sup>47</sup> y que la expresión génica entre pericitos y MSC en cultivo difiere, siendo los pericitos células más diferenciadas. Lo anterior sugiere que los pericitos pueden tener una función tisular que se pierde al ser liberados del tejido y cultivados<sup>1</sup>. La evidencia actual parece indicar que los pericitos son un grupo heterogéneo de células con características diversas, entre las que se encuentran células con características de MSC<sup>47</sup>. Faltan estudios que profundicen en estos hallazgos y aborden la discrepancia entre el gran potencial de proliferación observado *in vitro* y el pobre desempeño *in vivo*<sup>1</sup>.



**Figura 1:** (A) Ilustración de un pericito en un vaso sanguíneo. (B,C,D) Localización de células perivasculares en vasos sanguíneos de distintos tejidos mediante los marcadores CD34 y CD146. Adaptado de Crisan *et al.*, 2008 y Mills *et al.*, 2013.

### 1.3 Propiedades y Potencial terapéutico

El potencial terapéutico de las MSC se fundamenta en una serie de propiedades que exhiben las células en condiciones experimentales:

#### 1.3.1 Propiedades paracrinias

Las MSC producen y liberan una gran variedad de moléculas tróficas que son denominadas secretoma<sup>50</sup>, estas moléculas incluyen una fracción proteica soluble: factores de crecimiento, proteínas de adhesión, componentes de la matriz extracelular, enzimas y citoquinas; y una fracción vesicular: exomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos<sup>11-50</sup>. El secretoma de las MSC les permite participar y regular distintos procesos como la angiogénesis, la quimiotaxis, la reparación y la regeneración de tejidos. También se ha reportado su capacidad antibacteriana, antiviral y antiparasitaria<sup>11</sup>. La interacción del secretoma de las MSC con células cancerígenas también se ha estudiado con dispares resultados; las MSC tienen un efecto neoplásico o

antineoplásico que parece ser dependiente del tipo de células y del tipo de cáncer<sup>11</sup>. Utilizar las propiedades paracrinas de las MSC permitiría darles un uso terapéutico que resuelva el problema de la expansión de las células, sin embargo el estado del arte de este campo aún es incipiente y son necesarias más investigaciones<sup>50</sup>.

### **1.3.2 Inmunomodulación**

Las MSC son células que presentan una baja inmunogenicidad, por lo que pueden trasplantarse sin la necesidad de inmunosupresión<sup>8</sup>, también tienen la capacidad de interactuar con una gran variedad de células del sistema inmune, tanto a través de su secretoma como a través de contacto célula-célula, lo que les permite mediar procesos tanto del sistema inmune innato, como del adaptativo<sup>51</sup>. Entre estos procesos se encuentran la capacidad de regular la inflamación, siendo capaces de reparar tejidos y células, frenar o reforzar la respuesta inmune, estimular la proliferación y migración de células inmunocompetentes y estimular la liberación de moléculas pro inflamatorias a través de sus factores solubles<sup>51</sup>. Las MSC también tienen efectos inmunosupresores, principalmente a través de la inhibición de la proliferación de células del sistema inmune<sup>52</sup>. Pese a que aún se requieren más estudios y posibles terapias se encuentran en etapas de desarrollo, la capacidad inmunomoduladora de las MSC es prometedora para el tratamiento de enfermedades autoinmunes<sup>51</sup>.

### **1.3.3 Migración**

Las MSC tienen la capacidad de migrar, adherirse e insertarse en los tejidos, permitiéndoles participar en procesos de reparación<sup>8</sup>. Esta capacidad está dada por la expresión de moléculas de adhesión y la capacidad de responder a moléculas quimioattractantes<sup>53</sup>. Esto permitiría el uso terapéutico de las MSC mediante inyección intravenosa, sin embargo, se ha reportado que la capacidad de migrar de las células se ve afectada por la cantidad de pasajes en condiciones de cultivos, ya que altera el perfil de expresión de moléculas

de superficies. La edad del donante también puede alterar esta capacidad<sup>8</sup>. Se han identificado una serie de moléculas implicadas en el proceso de migración de las MSC como bFGF, VEGF, TGF- $\beta$ 1, PDGF-B<sup>53</sup>, sin embargo, el proceso de interacción de las MSCs con el endotelio aún requiere más investigaciones<sup>8</sup>.

### **1.3.4 Multipotencialidad**

La propiedad de diferenciarse en células de distintos linajes es posiblemente la que más ha atraído las investigaciones y el desarrollo de terapias basadas en MSC. Se acepta que todas las MSC tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condroblastos y adipocitos<sup>24</sup>. También se ha reportado que las MSCs son capaces de diferenciarse en miocitos, neuronas, hepatocitos, melanocitos, endotelios, odontoblastos, cementoblastos y otros tipos de células<sup>2,54,55</sup> (Fig. 2). La diferenciación de MSC hacia distintos tipos de linajes se logra a través de diferentes medios de cultivos y agentes inductores, y parece estar determinada por el tejido de origen de las MSC<sup>55</sup>. Por ejemplo, las células troncales mesenquimales de la médula ósea (BMSCs) muestran buen perfil de diferenciación condroblastica y osteoblastica, mientras que las MSC de origen dental parecen tener buen perfil de diferenciación hacia células neurales<sup>13</sup>. También se ha reportado que las MSC aisladas a partir de tejidos peri embrionarios como el cordón umbilical tienen mejores propiedades de expansión e inmunomodulación<sup>55</sup>. La diferenciación hacia distintos linajes celulares es una propiedad que no solamente se ha observado en cultivos, se han realizado múltiples estudios experimentales en modelos animales que comprueban la capacidad de estas células para diferenciarse *in vivo* y participar procesos de regeneración de tejidos<sup>2,11</sup>, actualmente se encuentra en desarrollo un gran número de ensayos clínicos en humanos<sup>1</sup>. La mayoría de estos tratamientos usan el enfoque clásico de ingeniería de tejidos; utilizando células, un andamiaje y factores de crecimiento<sup>56</sup>.

Se espera que las propiedades de las MSC permitan desarrollar tratamientos para un gran número de patologías humanas como la enfermedad de Parkinson, enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de ceguera, esclerosis múltiple, diabetes, quemaduras y daño a la médula espinal. Sin embargo aún se requieren más investigaciones para comprobar su seguridad y eficacia<sup>12,57</sup>.

#### **1.4 Nichos de células troncales**

Se han aislado MSC de una gran variedad de tejidos humanos: médula ósea, tejido adiposo, cartílago, ligamentos, hígado, cerebro, riñones, páncreas, músculo esquelético, sangre periférica, vasos sanguíneos, placenta, cordón umbilical, leche materna, flujo menstrual, así como la pulpa y otros tejidos de origen dental<sup>1,2,8,23,58</sup>. Sin embargo, en la mayoría de los casos el sitio y las condiciones específicas en que residen las MSC aún no han sido dilucidadas<sup>11</sup>.

Se denomina nicho, al microambiente especializado y dinámico en que residen las células troncales en los tejidos y que se encarga de regular su supervivencia y funcionamiento, manteniendo su capacidad de autorrenovación y multipotencialidad<sup>17,59</sup>. Los modelos clásicos de estudio de nichos de células troncales se encuentran en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*<sup>60</sup>. En mamíferos, se han reportado nichos en los folículos pilosos, epidermis, intestino delgado, médula ósea, testículos y músculo esquelético<sup>60,61</sup>. La ubicación perivascular de los nichos les permitiría responder rápidamente a daño tisular y explicaría la presencia de MSC en una gran variedad de tejidos, sin embargo la evidencia disponible acerca de los pericitos y los nichos de MSC es limitada y por lo tanto afirmar que todos los nichos son perivascuales es apresurado<sup>1,46</sup>. Las características de los nichos son variables y específicas para los distintos tipos de tejidos, sin embargo existen componentes comunes a todos ellos<sup>9</sup>:

##### **1.4.1 Componentes celulares**

Además de las células troncales, en los nichos residen células inmunitarias, nerviosas, vasculares y células específicas de cada tejido<sup>9</sup>. La función de

estos componentes celulares es mantener la quiescencia y regular la autorrenovación, proliferación y diferenciación. La presencia de nervios sensoriales ha sido reportada en los nichos de células troncales de la médula ósea, donde se cree regulan la proliferación de estas células a través de la vía simpática<sup>61</sup>. Las células inmunitarias pueden residir en el nicho o migrar desde el exterior, para mediar procesos de regeneración y reparación<sup>9</sup>. Parte de estos procesos se llevan a cabo a través de interacción directa entre las células, mediante receptores y moléculas de adhesión como las cadherinas<sup>59</sup>.

#### **1.4.2 Matriz extracelular**

La matriz extracelular de los nichos se compone de elementos proteicos como lamininas, fibronectina y colágeno<sup>59</sup>. Proporciona un soporte estructural en que las células troncales y los demás componentes del nicho pueden integrarse e interactuar de manera funcional<sup>62</sup>. La matriz extracelular interactúa con las células troncales a través de receptores celulares como las integrinas, las que son fundamentales para la autorrenovación y división asimétrica. Además la matriz extracelular es el medio en que difunden y acumulan los factores de señalización, elementos clave en la biología de los nichos<sup>62</sup>.

#### **1.4.3 Factores de señalización**

Son la forma en que las células troncales y las demás células del nicho se comunican de manera indirecta. Estas moléculas incluyen factores de crecimiento, hormonas, moléculas proinflamatorias y moléculas pequeñas como óxido nítrico<sup>9-59</sup>, que actúan a través de distintas vías de señalización como Notch, Wnt y Hedgehog, que participan en la regulación procesos como la expansión, liberación, migración y diferenciación de las células<sup>9</sup>.

#### **1.4.4 Factores físicos**

Las células troncales responden a señales físicas del medio, tales como la elasticidad o rigidez del sustrato, fuerzas de contracción y corte. Estos

estímulos son transmitidos por la matriz extracelular y captados por la compleja maquinaria mecanosensora de las células, compuesta por complejos de adhesión, el citoesqueleto, la matriz nuclear, la lámina nuclear y la cromatina<sup>9-62</sup>. Las células responden a estos estímulos regulando su forma, expandiendo la población y promoviendo la diferenciación. Por ejemplo se ha reportado que cuando se cultivan MSC en condiciones de rigidez similares a los de la médula ósea, estas mejoran su capacidad de autorrenovación y multipotencialidad<sup>62</sup>.

#### **1.4.5 Metabolismo de oxígeno**

El estado metabólico de las células puede influir en la quiescencia, proliferación y diferenciación. El metabolismo celular es afectado por la concentración en el medio de iones como el calcio<sup>63</sup>, pero principalmente por la presión de oxígeno. Se ha reportado que muchos tipos de células troncales, incluidas las MSC se encuentran en condiciones de baja presión de oxígeno, es decir, en hipoxia<sup>9-17</sup>, esta condición se caracteriza por la expresión del Factor Inducido por Hipoxia 1 alfa (HiF-1 $\alpha$ ), un factor de transcripción que regula la respuesta celular a condiciones bajas de oxígeno (O<sub>2</sub>). En condiciones normales de O<sub>2</sub> (*normoxia*) el factor de transcripción es degradado por un complejo ubiquitin-proteosoma que se une a una proteína Von Hippel Lindau (VHL), la unión de esta última con HiF-1 $\alpha$  depende de la hidroxilación de una prolina por la enzima prolin hidroxilasa, que usa O<sub>2</sub> como sustrato<sup>64</sup>. Cuando la concentración de O<sub>2</sub> baja de 6% el factor se estabiliza y se expresa, formando en el núcleo un heterodímero con HiF-1 $\beta$  que se expresa de manera constitutiva en la célula. El factor de transcripción activado regula la transcripción de una batería de genes a través de la unión a una secuencia llamada elemento de respuesta a hipoxia (HRE), transcripción<sup>64-65-66</sup>. Este mecanismo también tiene la capacidad de regular genes de manera indirecta a través de la cascada de activación que genera la activación de los diversos genes que poseen la región HRE<sup>66</sup>. El resultado es una serie de

adaptaciones celulares y sistémicas tendientes a mantener la homeostasis de oxígeno, regulando procesos tales como la hematopoyesis, y el desarrollo embrionario. Cuando esto ocurre las células realizan glucólisis en vez de fosforilación oxidativa mitocondrial, la obtención de energía exclusivamente a través de la vía glucolítica en condiciones de bajas concentraciones de O<sub>2</sub> previene de la formación de especies reactivas de oxígeno, evitando el daño al ADN<sup>67</sup>. Las células en proliferación tienen un alto requerimiento de cofactores para producir reacciones anabólicas, por lo que esta forma de metabolismo es fundamental para las MSC, permitiéndoles producir energía rápidamente por glucólisis, aprovechando los cofactores en la producción de anabolismo<sup>68</sup>. Sin embargo la transición hacia un metabolismo oxidativo parece ser necesaria para la diferenciación celular; se han reportado diferencias en la arquitectura mitocondrial de células troncales y su progenie, las células indiferenciadas parecen tener una red mitocondrial inmadura y escasa, con una ubicación perinuclear limitada, esta red mitocondrial aumenta y madura una vez que las células se diferencian<sup>68</sup>. Al parecer la hipoxia sería clave para la mantención del estado indiferenciado de las células<sup>17</sup>. Este mecanismo de adaptación celular es muy antiguo y conservado en la evolución, las células eucariotas evolucionaron desde un metabolismo anaeróbico, en el cual el O<sub>2</sub> resulta tóxico, a un metabolismo aeróbico, dependiente de este para la obtención de energía a través de un sistema altamente eficiente fosforilación oxidativa<sup>65-66</sup>. Si bien los organismos más pequeños pueden obtener el oxígeno necesario para su metabolismo por simple difusión, los organismos pluricelulares más grandes debieron desarrollar sistemas de distribución de oxígeno a los tejidos<sup>65</sup>. Las concentraciones de oxígeno varían entre tejidos y por lo general distan del 21% encontrado en la atmósfera, en esta línea, se ha planteado que el estado hipóxico en que se encuentran las células troncales es de hecho un estado de hipoxia fisiológica para estas células<sup>66</sup>.

La gran cantidad de factores que se integran en los nichos pueden explicar las diferencias en la expresión de marcadores y comportamiento que exhiben las MSC cuando se cultivan<sup>15</sup>, además la desregulación de este microambiente puede estar relacionada con patologías como el cáncer<sup>17</sup>, por lo que su relevancia va más allá de la ingeniería de tejidos, pudiendo tener aplicaciones terapéuticas diversas<sup>59</sup>.

### **1.5 Controversias**

Aunque las MSC parecen estar bien caracterizadas, en los últimos años han surgido controversias en torno a su verdadera naturaleza, así como a sus posibles aplicaciones terapéuticas y potenciales riesgos.

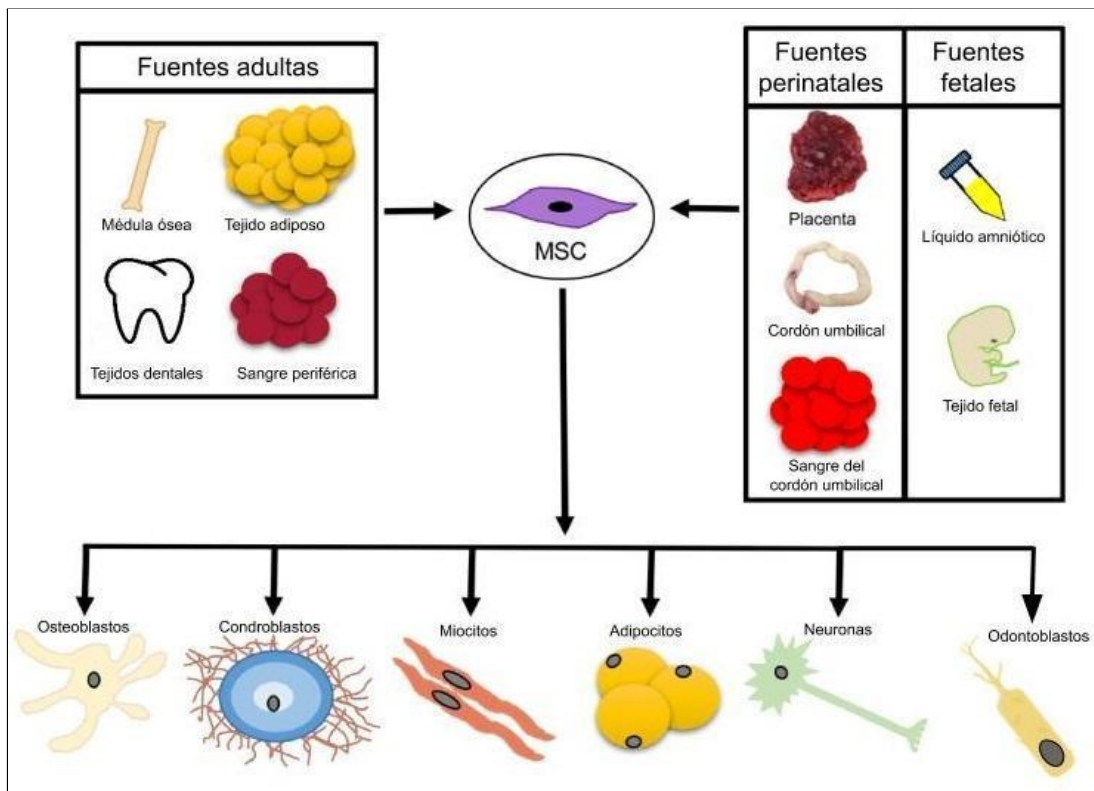
#### **1.5.1 Nombre**

Se han propuesto varios nombres para lo que se conoce como células troncales mesenquimales: *células estromales*, *células estromales multipotentes*, *células estromales medulares*, *células mesodérmicas*, *células estromales mesenquimales*<sup>11</sup>; incluso un nombre comercial de uso en el mundo de habla hispana: “*células madres*”<sup>69</sup>. Sin embargo, dadas la heterogeneidad que exhiben las distintas poblaciones de MSC, las diferencias fenotípicas observadas *in situ* y en cultivos<sup>15</sup>, y a que aún no está clara su función en los tejidos de origen<sup>1</sup>, es que algunos autores han propuesto que el término sea revisado<sup>10,70</sup>. Se ha planteado que las MSC no serían verdaderas células troncales, incluso que serían un artefacto de cultivo<sup>71</sup>. Caplan, quien introdujo el término MSC, propuso su reemplazo por el de “*células de señalización medicinal*”, aludiendo a su mecanismo de acción terapéutica más que a su incierta función biológica<sup>10,11</sup>.

#### **1.5.2 Terapias no reguladas**

Pese a los aspectos aún desconocidos de la biología de estas células, han surgido gran cantidad de tratamientos que dicen usar MSC, muchos de los cuales no están registrados como ensayos clínicos, ni usan protocolos aprobados<sup>71</sup>, pudiendo resultar en serios daños para la salud de los

pacientes<sup>72</sup>. La reparación y regeneración de tejidos son procesos complejos y no es seguro, ni ético comercializar tratamientos con MSC asegurando que resolverán los problemas de los pacientes de forma eficaz y segura. El nivel de conocimientos acerca de las MSC aún no es suficiente para su uso generalizado, para definir riesgos y beneficios de estos tratamientos, es necesaria más investigación básica y evidencia clínica que permita producir información sistemática<sup>1,70</sup>.



**Figura 2:** Fuentes de MSC humanas y su potencial de diferenciación. Adaptado de Brown et al., 2019

## **2. Dientes permanentes**

### **2.1 Generalidades**

La dentición humana se caracteriza por ser difiodonte, posee dos generaciones de dientes, una primaria temporal o decidua, compuesta por 20 dientes y una dentición definitiva, compuesta por 32 dientes<sup>73,74</sup>. Otra característica es la heterodoncia, es decir, la existencia de dientes con distinta morfología<sup>75</sup>. Los dientes humanos son unidades de dentina protegida por esmalte en la corona y con un complejo sistema de inserción al hueso alveolar. La dentina encierra la pulpa, un tejido conectivo vascularizado y altamente innervado por aferencias sensoriales de presión, temperatura y dolor<sup>76</sup>.

### **2.2 Odontogénesis y desarrollo radicular**

El proceso de formación de las denticiones temporal y permanente se conoce como odontogénesis<sup>75</sup>. Se inicia aproximadamente en la séptima semana de desarrollo, en la cavidad oral del embrión y su descripción se realiza en etapas que reciben sus nombres de acuerdo a la morfología que adquiere el diente en formación<sup>74,77</sup> (Fig. 3):

#### **2.2.1 Inducción**

La odontogénesis comienza cuando una banda de células del epitelio oral sobre las mandíbulas prolifera y se engrosa, formando la lámina dental. Las células de la lámina dental inducen a la capacidad odontogénica de las células mesenquimales derivadas de la cresta neural, las que se condensan<sup>78</sup>. El intercambio recíproco de señales conocido como inducción epitelio-mesenquimática se mantiene en todo momento y es crucial para regular los cambios de transcripción necesarios para la proliferación, migración y diferenciación de las células<sup>74,77</sup>.

#### **2.2.2 Brote**

El epitelio comienza a invaginarse, formando un brote en el interior del ectomesénquima, alrededor del cual se condensan las células, ambos tipos de células continúan proliferando y la densidad celular aumenta, proceso

conocido con el nombre de condensación del ectomesénquima. En la transición entre brote y capuchón comienzan a definirse las diferencias morfológicas entre los gérmenes de los distintos tipos de dientes<sup>74-78</sup>.

### **2.2.3 Capuchón**

La invaginación del epitelio comienza a generar una concavidad que va envolviendo una porción del ectomesénquima, pasando a formarse dos estructuras: El órgano del esmalte que deriva del epitelio y va a formar el esmalte; y la papila dental, derivada del ectomesénquima y que va a dar origen a la dentina y la pulpa. Otra porción del ectomesénquima se mantiene condensada por fuera del órgano del esmalte, recibe por nombre folículo dental y da origen a los tejidos de soporte del diente. A su vez, en el órgano del esmalte se forman tres zonas: El epitelio externo del esmalte, ubicado en la periferia, en contacto con la lámina dental; el epitelio interno, en el interior, separado de la papila dental por una lámina basal; y el retículo estrellado, entre ambos epitelios, una acumulación de matriz extracelular y células del órgano del esmalte que adquieren una forma estrellada<sup>74</sup>. Durante la etapa de capuchón aparecen en el centro del epitelio los nudos de esmalte, que controlan la morfogénesis de la cúspides y juegan un papel en la regulación de la forma y el tamaño de los dientes, aunque todos los dientes tienen nudos de esmalte, estos solo son visibles en los molares<sup>77</sup>.

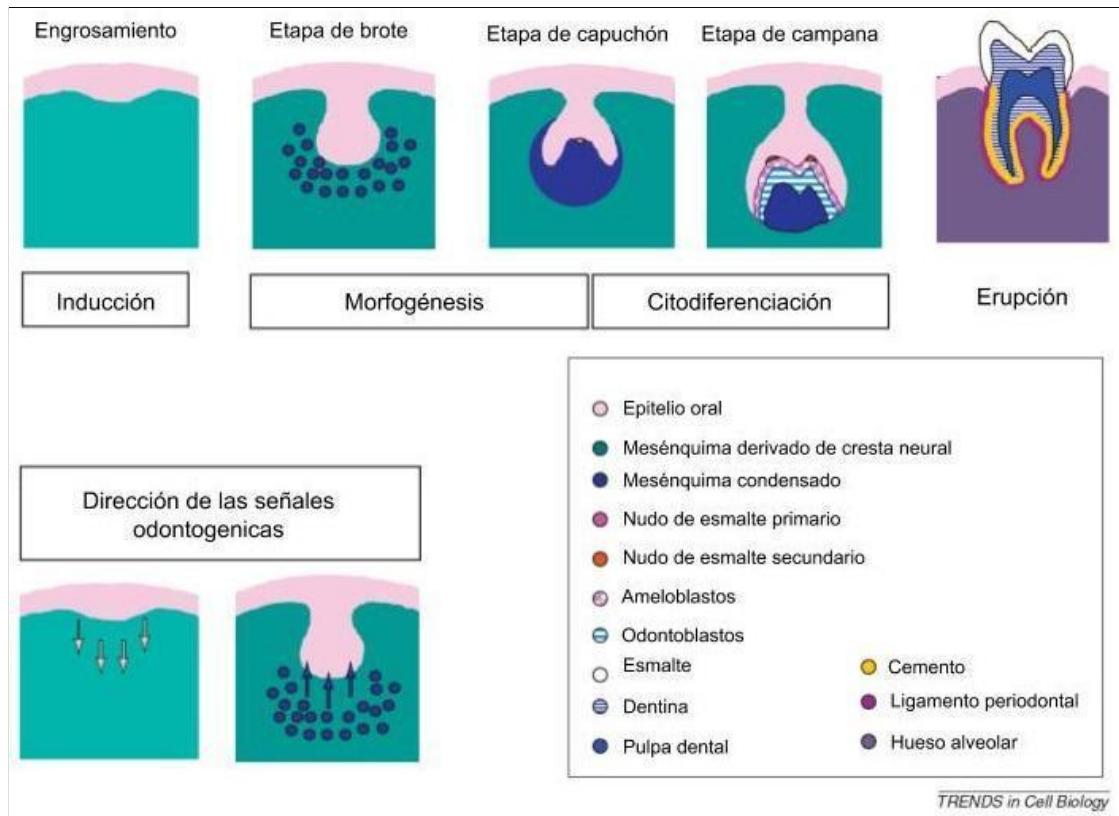
### **2.2.4 Campana**

Los ameloblastos y odontoblastos, células que darán origen al esmalte y la dentina respectivamente adquieren su fenotipo definitivo. Los ameloblastos se diferencian a partir de las células del epitelio interno y comienzan a formar esmalte, el cual es secretado hacia la zona de la lámina basal produciendo una inversión en la polaridad de la célula. Los odontoblastos se diferencian desde las células de la papila dental y forman la dentina, la cual también es secretada hacia la zona de la lámina basal, por lo que a medida que ambos tejidos se van formando las células se van separando. Una vez que esto

ocurre la papila dental pasa a formar la pulpa dental quedando establecida la forma final de la corona. Los ameloblastos van a producir esmalte hasta la erupción del diente momento en que sufren apoptosis. La producción de dentina continua durante toda la vida de los odontoblastos<sup>74</sup>.

### **2.2.5 Desarrollo radicular**

La formación radicular consiste en la formación de un cono de dentina cubierto por cemento. Comienza cuando las células del órgano del esmalte proliferan apicalmente rodeando la pulpa, esta proliferación de células recibe el nombre de vaina epitelial de Hertwig. Las células de la vaina epitelial son las encargadas de inducir a los restos más apicales de la papila dental a diferenciarse en odontoblastos. Los tejidos de soporte del diente, el cemento y el ligamento periodontal, se forman a partir de células que se diferencian a partir del folículo dentario a medida que la raíz se va extendiendo hacia apical<sup>74</sup>. La formación radicular tarda años, cuando un diente definitivo se encuentra erupcionado, pero su formación radicular aún no ha concluido recibe el nombre de diente inmaduro<sup>4</sup>.



**Figura 3:** Diagrama representativo del proceso de Odontogénesis. Adaptado de Volponi *et al.*, 2010

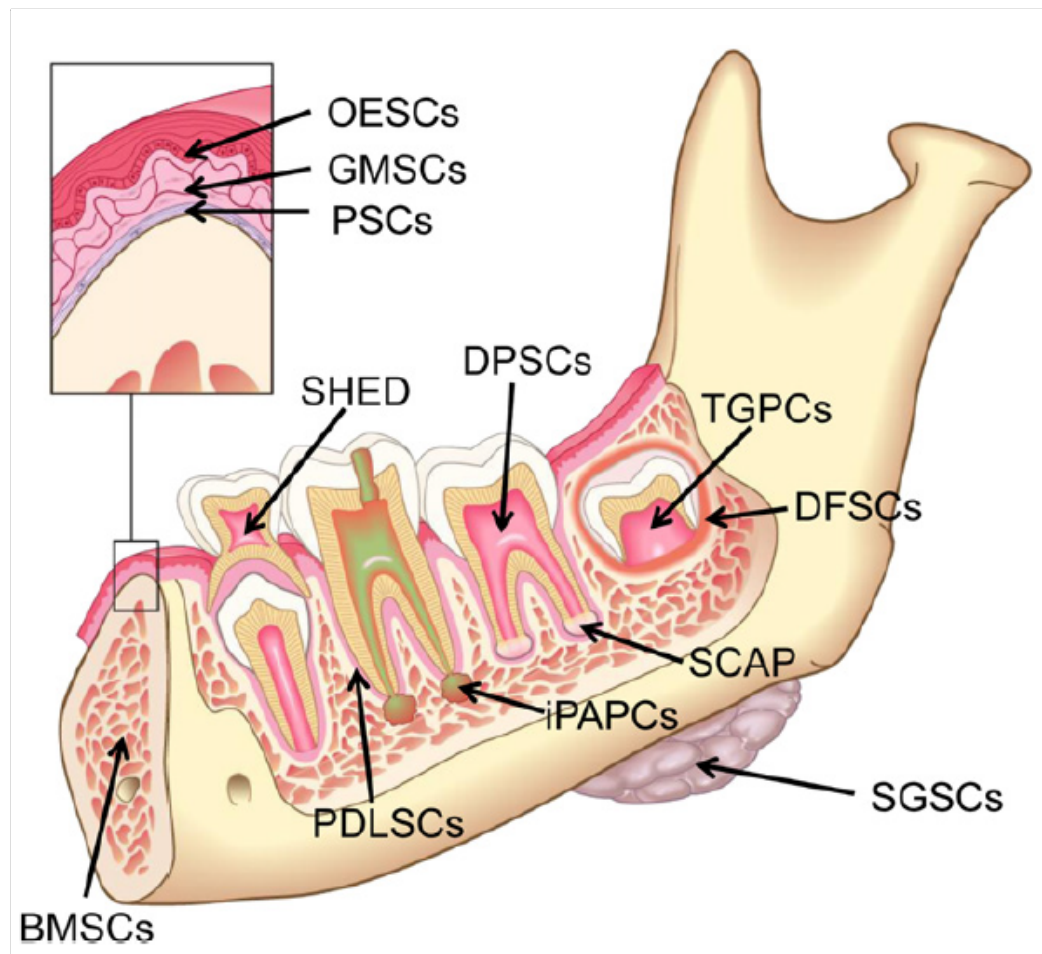
### 2.3 Células troncales en dientes permanentes

En los dientes humanos y sus tejidos de soporte, se ha descrito la presencia de distintos tipos de células con características de MSC. Aunque muy similares entre sí, estas poblaciones también albergan diferencias importantes en sus propiedades funcionales y fenotípicas<sup>79-80</sup>.

Las células troncales de la pulpa dental fueron Caracterizadas por Gronthos *et al.*,<sup>82</sup> en 2002, estas células tienen un perfil fenotípico similar a las BMSC, poseen gran potencial de inmunomodulación, proliferación y formación de colonias. Son capaces de diferenciarse *in vitro* en una gran cantidad de células como odontoblastos, adipocitos, osteoblastos, condrocitos, neuronas, miocitos, melanocitos, y hepatocitos. Por otra parte, la implantación *in vivo* en modelos animales ha reportado la generación de tejido calcificado similar a la dentina, adipocitos, condrocitos e incluso neuronas<sup>2-78</sup>. Se cree que las DPSCs habitan en un nicho perivascular desde donde pueden migrar y diferenciarse en células similares a odontoblastos cuando la pulpa

sufre alguna noxa y pueden ser obtenidas fácilmente de terceros molares y otros dientes definitivos sanos con indicación de exodoncia<sup>78</sup>.

Desde que se describió la existencia de MSC en la pulpa dental se han reportado más de una decena poblaciones de células similares en los distintos tejidos orales tal como lo ilustra la figura 4, la mayoría en dientes permanentes<sup>3,81,82</sup>:

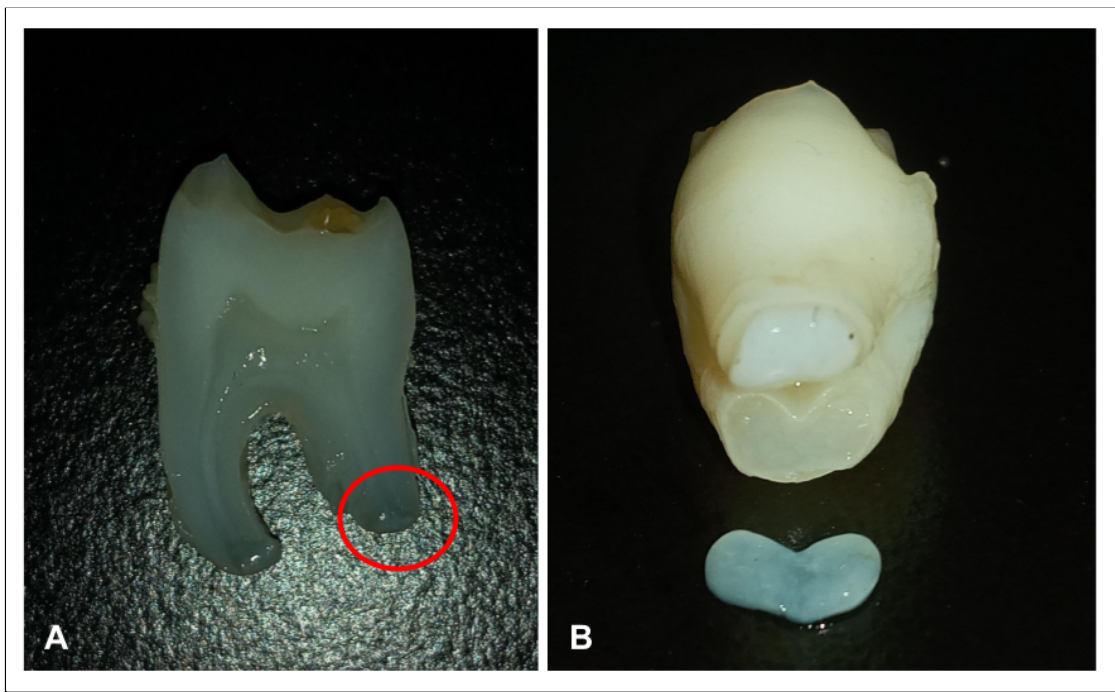


**Figura 4:** Poblaciones de MSC descritas en los tejidos orales: BMSCs: Células troncales de la médula ósea; DFSCs: Células troncales del folículo dental; DPSCs: Células troncales de la pulpa dental; GMSCs: Células troncales mesenquimales de la encía; iPAPCs: Células progenitoras de periapices inflamados; OESCs: Células troncales del epitelio oral; PDLSCs: Células troncales del ligamento periodontal; PSCs: Células troncales del periostio. SCAP: Células troncales de la papila apical; SGSCs: Células troncales de las glándulas salivales; SHED: Células troncales de dientes deciduos exfoliados humanos; TGPCs: Células progenitoras del germen dental. Tomado de Hargreaves *et al.*, 2013.

### 3. Papila apical

#### 3.1 Características

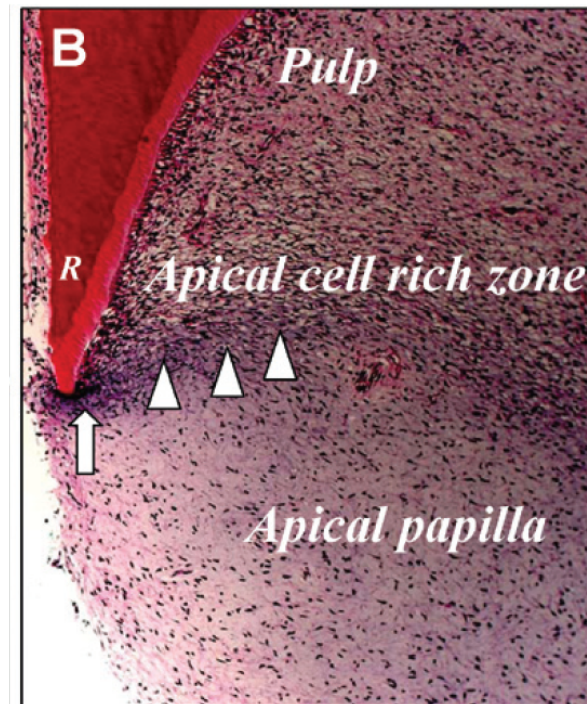
La papila apical es un tejido precursor derivado de la papila dental, que se ubica en el extremo más apical de la raíz de un diente definitivo inmaduro, posee una densidad celular menor que la pulpa dental (Fig. 5), de la cual se encuentra separada por una zona rica en células y puede ser fácilmente desprendida del diente con la ayuda de unas pinzas<sup>4</sup>.



**Figura 5:** Macromorfología de la papila apical. **(A)** La papila apical es un tejido blando, de aspecto blanquecino, ubicado en el ápice de la raíz de dientes inmaduros (círculo rojo). **(B)** La papila apical puede ser desprendida de la raíz con facilidad con ayuda de unas pinzas.

Durante la formación de la corona, la papila dental queda encerrada por la dentina que está comenzando a ser formada por los odontoblastos y forma la pulpa dental. Una porción de la papila dental no queda encerrada por la dentina y se ubica en la zona apical de la corona, originándose así la papila apical, allí recibe desde la vaina epitelial de Hertwig, señales que inducen a las células de la papila apical a diferenciarse para formar los odontoblastos que forman la dentina de la raíz y las células de la pulpa radicular<sup>4,79-82</sup>. A medida que la raíz del diente se va formando, la

papila apical va disminuyendo su tamaño hasta virtualmente desaparecer, por lo que puede obtenerse de dientes de individuos jóvenes<sup>78</sup>. Su ubicación apical a la pulpa y al diafragma epitelial y la irrigación colateral en la zona del periápice le permiten sobrevivir a procesos de necrosis pulpar y periodontitis apical<sup>5</sup>.



**Figura 6: (B)** Visión microscópica del ápice de un diente inmaduro, se aprecian 3 zonas histológicas; la pulpa, una zona rica en células (puntas de flecha) y la papila apical menos densa celularmente, el diafragma epitelial, que delimita la dentina se indica con la flecha. Tomado de Sonoyama *et al.*, 2008.

La papila apical fue inicialmente descrita por Sonoyama *et al.*, en 2006, y hasta hoy la evidencia sobre sus características biológicas es relativamente escasa. Se cree que la papila apical constituye un nicho de MSC que tienen características diferentes al resto de las MSC de origen dental<sup>5,6</sup>. Sin embargo, no se han realizado estudios histológicos y moleculares detallados de la papila.

### 3.2 Células troncales de la papila apical

El aislamiento y cultivo de las células de la papila apical revela que corresponden a una población de células troncales mesenquimales, estas células han sido llamadas células troncales de la papila apical (SCAP)<sup>7</sup>, poseen particulares características

fenotípicas y de diferenciación<sup>14,83</sup>, también se han reportado propiedades inmunomoduladoras<sup>2</sup>.

### 3.2.1 Caracterización fenotípica

Se ha reportado que estas células aisladas y cultivadas expresan los marcadores CD73, CD90 y CD105<sup>7</sup>, el análisis de expresión de estos marcadores en cortes histológicos de la papila apical revela la expresión en bajas cantidades de CD73 y CD105, y la expresión abundante de CD90<sup>6</sup>.

Otro marcador utilizado en la caracterización de las SCAP en cultivos es CD24, el cual no se ha reportado en otras células troncales de origen dental<sup>14</sup>. Este marcador, que parece indicar indiferenciación, disminuye su expresión a medida que los cultivos aumentan sus pasajes<sup>14</sup>. Reportándose además su abundante expresión en papilas normales e inflamadas<sup>84</sup>.

CD271 y Nestin son otros marcadores que se han identificado en cultivos de SCAP, aunque en bajos porcentajes, su presencia resulta interesante dado que revelan el origen de las SCAP en las células derivadas de la cresta neural<sup>85</sup>.

También se ha descrito la existencia de subpoblaciones celulares en cultivos de SCAP. Estas consisten en una población CD146 (+)/ STRO-1 (+), una población CD146 (-)/ STRO-1 (+), una población CD146 (+)/ STRO-1 (-), y una población que no expresó ninguno de los dos marcadores<sup>85</sup>. Los porcentajes de cada una de estas poblaciones respecto a la población total de células, así como sus propiedades clonogénicas y de diferenciación difieren entre los autores<sup>14,86</sup>. Tanto CD146 como STRO-1 se han reportado en otros tipos de células troncales de origen dental y se asocian a células perivasculares<sup>86</sup>, sin embargo, no se ha reportado este fenómeno *in situ*, por lo tanto, aún requiere ser explorado<sup>86</sup>. La evidencia parece indicar que la papila apical es un nicho de células que se comportan como MSC, y por lo tanto tiene un fuerte rol modulador sobre los perfiles de expresión fenotípica de las células<sup>15</sup>.

Para los estudios realizados en cultivos, se debe tener en cuenta que este proceso puede alterar la identidad molecular de las células, al emular el proceso de activación de las células troncales, las que se encuentran en su nicho en estado inactivo<sup>6</sup>. Las células incluso expresan distintos perfiles antigénicos cuando se trata de células aisladas recientemente o de cultivos derivados de varios pasajes<sup>15</sup>. Por esta razón, el estudio de las células *in situ* cobra gran importancia.

La bajo metabolismo de oxígeno, que fue mencionado dentro de las características de los nichos de MSC, es otro de los factores que podría alterar los perfiles de expresión de las células. La hipoxia parece modular las propiedades de las SCAP en cultivos y algunos autores han propuesto a la papila como un tejido hipóxico<sup>87</sup>. Esto último se vería apoyado por la función precursora de la papila en la formación de la raíz<sup>5</sup>, la hipoxia tiene un rol importante en el desarrollo, gran parte del desarrollo embrionario ocurre en condiciones de oxígeno menores a 5%<sup>66</sup>, sin embargo, la expresión de HIF-1 $\alpha$  no se ha reportado en la papila.

### **3.2.2 Proliferación y diferenciación**

Las SCAP *in vitro* exhiben mayor tasa de proliferación que las DPSCs<sup>7</sup>, así como buenas tasas de diferenciación hacia células de distintos linajes. Se ha reportado un fuerte potencial de diferenciación osteo/dentinogénica tanto *in vitro* como *in vivo*, este potencial se describe como comparable al de las DPSCs e incluso superior al de las BMSCs<sup>80</sup>. Por otra parte se describe un débil potencial adipogénico, en comparación con otras MSC como las BMSCs<sup>14</sup>, la diferenciación condrogénica también se ha descrito<sup>86</sup>.

Llama la atención el potencial de estas células para diferenciarse hacia linajes más allá de los tres linajes clásicos<sup>14</sup>, se ha descrito que las SCAP pueden diferenciarse hacia linajes hepato, angio y neurogénicos<sup>86</sup>, de la cuales se ha

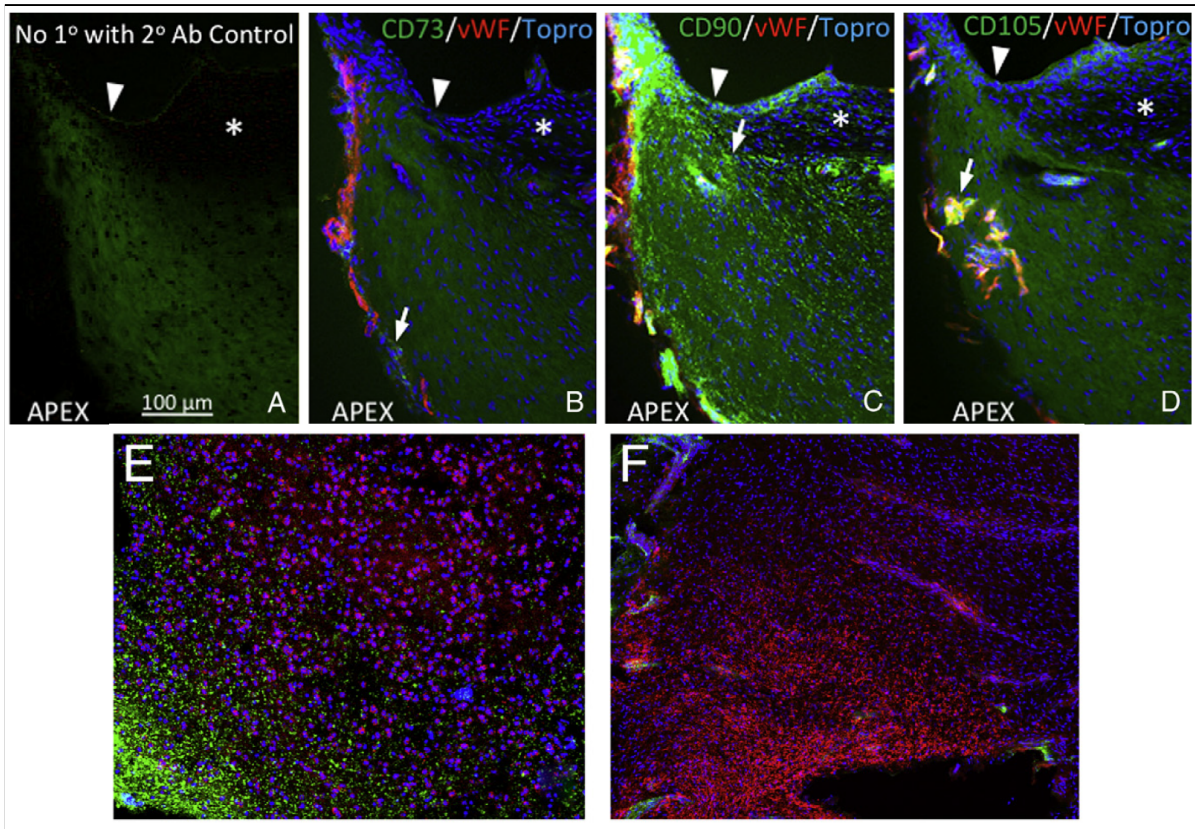
puesto especial atención en la capacidad angio y neurogénica de estas células, dado la importancia de la neurovasculatura en los procesos de regeneración tisular<sup>14</sup>.

Se han reportado marcadores angiogénicos en SCAP; VEGF, bFGF, endostatina y Angiopoietina-1. La generación de vasculatura *in vitro* también se ha reportado<sup>89</sup>. La capacidad angiogénica de las SCAP es una de las características que permite el éxito de los tratamientos de endodoncia regenerativa, tratamientos que también son llamados “revascularización”<sup>14</sup>.

También se ha reportado la capacidad de diferenciación neurogénica de las SCAP<sup>90</sup>, este potencial es común a las células troncales de origen dental, lo que las hace prometedoras para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y la regeneración de tejido neural<sup>14</sup>. En esta misma línea, se ha reportado la regulación al alza de marcadores neurales en cultivos sometidos a condiciones de hipoxia<sup>87</sup>. En un estudio publicado en 2015 se aplicaron células derivadas de la papila apical de terceros molares humanos en médula espinales seccionadas de ratones inmunosuprimidos, los resultados mostraron que el ratón consiguió recuperar parte de la movilidad, la recuperación fue mejor en los casos en que la papila apical fue aplicada directamente en la herida, apoyando aún más el rol modulador de la papila sobre las células<sup>16</sup>.

### **3.2.3 Inmunomodulación**

Se han reportado las propiedades inmunosupresoras sobre linfocitos, así como una baja inmunogenicidad<sup>2</sup>, también se reporta que las SCAP obtenidas de dientes con procesos inflamatorios exhiben mayores tasas de proliferación y diferenciación hacia linajes osteogénicos. Se plantea que la capacidad de estas células de sobrevivir a procesos inflamatorios de la pulpa también puede estar relacionada con sus propiedades inmunomoduladoras<sup>14</sup>.



**Figura 7:** Inmunofluorescencia de papila apical: **(A)** La papila exhibe una tinción de fondo inespecífica para el anticuerpo secundario 488 (verde). **(B - D)** Expresión de marcadores clásicos de MSC en papila apical (verde), la tinción con vWF (rojo) revela la baja vasculatura de este tejido. **(E/F)** expresión de CD24 (rojo) en papilas inflamada y sana respectivamente. Adaptado de Ruparel *et al.*, 2013 y Chrepa *et al.*, 2007

### 3.3 Endodoncia regenerativa

En los últimos años han surgido una serie de tratamientos agrupados bajo el nombre de “endodoncia regenerativa”, estos tratamientos consisten en utilizar los principios de la ingeniería de tejidos para conseguir la revascularización de dientes inmaduros con procesos de inflamación o necrosis pulpar, permitiendo además la conclusión de la maduración de la raíz por lo que se perfila como una mejor opción clínica que la apexificación<sup>3-18</sup>. Estos procedimientos al parecer tendrían su fundamento en las propiedades de las SCAP, las cuales son estimuladas y transportadas al conducto donde se diferencian y estimulan la reparación de la pulpa<sup>5</sup>.

### **3.3.1 Procedimientos**

Aunque existen varios protocolos<sup>91</sup>, todos los tratamientos de endodoncia regenerativa consisten en realizar una desinfección acabada del conducto, que debe ser principalmente química y con mínima instrumentalización<sup>92-93</sup>. Posteriormente con un instrumento endodóntico se induce el sangrado del ápice, proceso que al parecer transporta las SCAP al conducto, mientras que el coágulo actúa como andamiaje<sup>3</sup>. Este paso puede implicar el uso de matrices extracelulares sintéticas o derivadas del mismo paciente como fibrina o plasma rico en plaquetas. Posteriormente se realiza un sellado coronario (Fig. 7), con algún material biocompatible como MTS<sup>18</sup>.

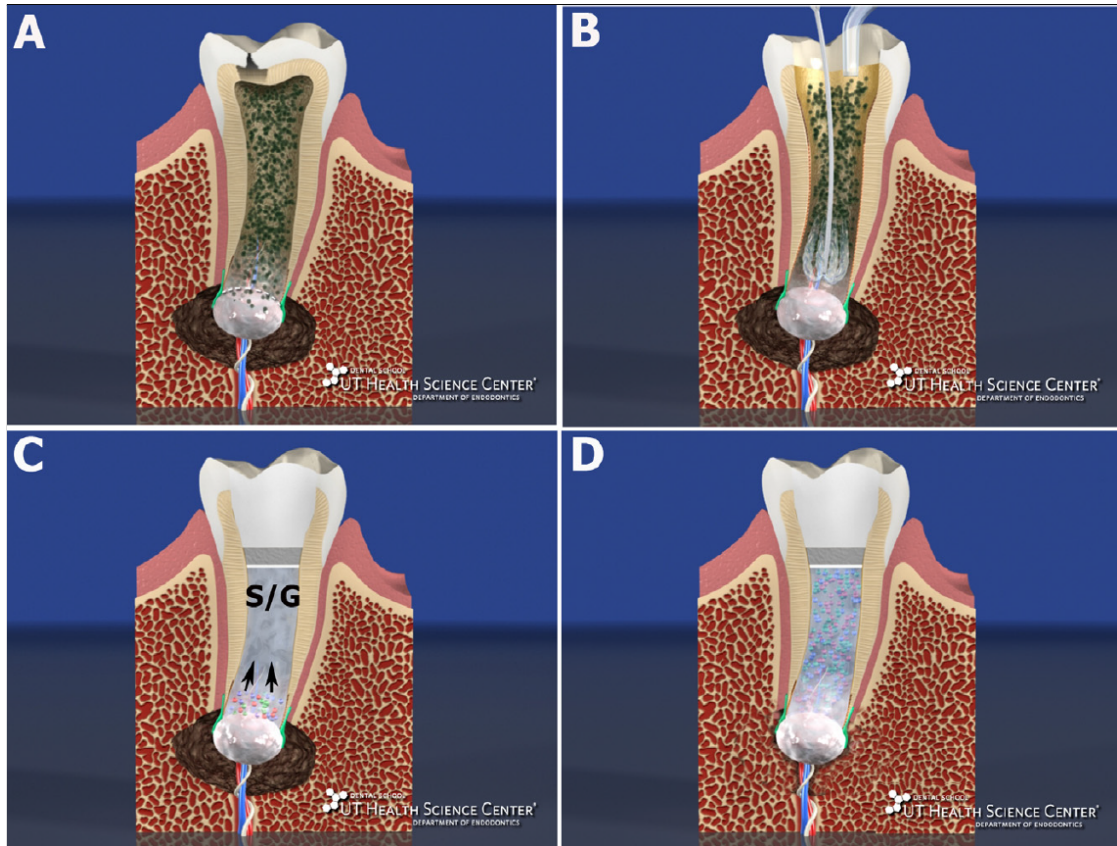
### **3.3.2 Resultados**

Existe controversia acerca de los resultados de los procedimientos de endodoncia regenerativa. La regeneración implica la presencia de una capa odontoblástica limitando la dentina, el restablecimiento de la inervación, los fibroblastos intersticiales, las células troncales residentes en la pulpa, así como la arquitectura misma del tejido. Por otra parte la revascularización implica sólo el restablecimiento de la vasculatura pulpar<sup>18</sup>.

Los tratamientos de endodoncia regenerativa suelen resultar en la resolución del proceso inflamatorio, la recuperación de la funcionalidad del diente, el término de la maduración de la raíz y niveles variables de respuesta pulpar a test de sensibilidad<sup>92-93</sup>. Los análisis histológicos de algunos dientes sometidos a tratamientos de endodoncia regenerativa revelan la formación de un tejido conectivo de reparación<sup>94</sup>, que si bien incluye elementos vasculares, neurales e incluso la presencia de odontoblastos que generan un tejido similar a la dentina reparativa<sup>95</sup>, dista mucho de ser tejido pulpar regenerado.

Dos décadas de evidencia clínica indican que los tratamientos de endodoncia regenerativa parecen ser seguros y exitosos en la resolución de la patología

inflamatoria<sup>92</sup>, sin embargo, la poca evidencia acerca de la papila apical, la incierta biología de las MSC y las mismas limitaciones de este tipo de procedimientos son un llamado a la calma respecto a la promoción de tratamientos regenerativos y al surgimiento de nuevos protocolos.



**Figura 8:** Esquemización de un procedimiento de endodoncia regenerativa. Un premolar inmaduro con necrosis pulpar y lesión apical (A), es desinfectado tanto mecánica como físicamente y su papila es traspasada con un instrumento endodóntico (B). Posteriormente se introduce un andamiaje libre de células en combinación con factores de crecimiento lo que estimula la migración y diferenciación de las células de la papila apical, y se sella el diente con un material biocompatible (C), consiguiendo la formación de tejido reparativo y revascularización del diente (D). Tomado de Diogenes *et al.*, 2013.

## **Pregunta de investigación**

¿Existen en la papila apical de dientes inmaduros células troncales mesenquimales en condiciones de hipoxia?

## **Objetivos**

### **General**

Caracterizar las células troncales mesenquimales de la papila apical, su metabolismo de oxígeno y su relación con los componentes neurovasculares mediante inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia.

### **Específicos**

- Caracterizar la expresión de marcadores de diferenciación de células troncales mesenquimales en la papila apical mediante microscopía de fluorescencia.
- Evaluar el metabolismo de oxígeno de las células de la papila apical mediante la determinación de la expresión de HIF-1 $\alpha$  con inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia.
- Caracterizar los componentes neuro-vasculares de la papila apical y su asociación con las células troncales mediante inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia.

## **Hipótesis**

Los nichos de MSC son microambientes que preservan la identidad celular de las células troncales, se ha descrito que algunos nichos mantienen a las células en hipoxia, condición que se caracteriza por la expresión del factor de transcripción HiF-1 $\alpha$ .

Como hipótesis de trabajo se plantea que **la papila apical de dientes permanentes inmaduros alberga una población de células troncales mesenquimales en condiciones de hipoxia.**

Para probar esta hipótesis se evaluará la expresión de HiF-1 $\alpha$ , así como otros marcadores de células troncales mesenquimales descritos para la papila apical mediante microscopía de fluorescencia.

### **Diseño Metodológico**

Se realizará un estudio descriptivo observacional, de las características de las células troncales de la papila apical de dientes humanos inmaduros.

## **Materiales y métodos**

### **Universo**

Dientes humanos inmaduros con indicación de exodoncia, donados mediante consentimiento informado escrito y asentimiento verbal del paciente al Banco de muestras del Laboratorio de Microscopía avanzada de la Universidad de Valparaíso.

### **Criterios de inclusión y exclusión**

#### **Inclusión**

- Pacientes sistémicamente sanos.
- Pacientes con dientes definitivos inmaduros con indicación de exodoncia.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado o cuyos apoderados lo firmen y deseen participar en el estudio.

#### **Exclusión**

- Dientes con necrosis pulpar, pulpitis irreversible y restos radiculares.
- Dientes afectados con reabsorción radicular interna o externa
- Dientes que hayan presentado trauma dentoalveolar o avulsionados.
- Dientes con fijación deficiente

## **Muestras**

**Aprobación del estudio y Consentimiento informado:** En proceso de aprobación

**Tamaño muestral:** 31 dientes humanos inmaduros

**Forma de selección:** Muestreo no probabilístico. Los dientes fueron recolectados en la clínica odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Las muestras se obtuvieron de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión.

**Unidad de estudio:** Células de la papila apical de dientes permanentes inmaduros humanos.

## **Definición de las variables a estudiar**

**Papila apical:** (Cualitativa, nominal) Tejido precursor ubicado en el ápice de la raíz de los dientes definitivos inmaduros, se evaluará la expresión de marcadores de diferenciación en sus células.

**Marcadores diferenciación celular:** (Cualitativa, nominal) Corresponden a anticuerpos monoclonales contra moléculas celulares, su expresión (+) o (-) se evaluará mediante inmunohistoquímica.

**Marcadores de MSC:** CD73, CD90, CD105, CD146 y STRO-1

**Marcadores vasculares:** CD31,  $\alpha$ -SMA.

**Marcadores neurales:** -Tubulina III.

**Marcador de hipoxia:** HIF-1 $\alpha$ .

## **Proceso de recolección y procesamiento de las muestras**

Los pacientes con dientes inmaduros con indicación de exodoncia que decidieron participar en el estudio fueron atendidos en la clínica odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Previo al procedimiento se les explicó a los pacientes (o a sus apoderados en caso de los menores de edad) en qué consistía la participación en el estudio por medio de una hoja informativa que contenía los objetivos, características y relevancia de la investigación. Se resolvieron dudas cuando fue necesario y se entregó el consentimiento informado (Anexo 1), el cual debió estar firmado para proceder con la exodoncia. En el caso de los pacientes menores de edad se les explicó el procedimiento y se solicitó el asentimiento antes de comenzar.

La exodoncia de los dientes se realizó bajo anestesia local (Lidocaína al 2%) y con el instrumental indicado para cada caso en particular, una vez extraídos los dientes fueron examinados por el investigador presente y con la ayuda de unas pinzas depositados en un tubo cónico de muestras con 10 ml de paraformaldehído tamponado al 4% con ácido pícrico al 0,5% durante 6 horas para su fijación.

Cumplido el tiempo las muestras fueron depositadas cada una en un frasco con EDTA al 4,3% (pH 7,2) para su desmineralización, la solución fue cambiada cada una semana, repitiendo este proceso durante aproximadamente 4 meses hasta que cada muestra estuvo lista para su posterior criosección y análisis.

## **Secciones de tejido para inmunohistoquímica**

Una vez desmineralizadas las muestras fueron hidratadas con una solución buffer fosfato-salina (PBS) por 2 horas. Posteriormente fueron criopreservadas 2 horas en una solución de sacarosa al 15% y al 30%. Luego las muestras fueron montadas en medio de congelación para tejidos (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) y congeladas a -25°C. Se realizaron cortes de 25 µm en un criostato (Leica CM-1900), los cortes fueron montados en portaobjetos previamente impregnados con poli-L-lisina.

## **Inmunohistoquímica**

Las secciones de tejido fueron rehidratadas realizando 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno e incubadas durante 1 hora con una solución de bloqueo compuesta por 1% de albúmina de suero bovino (BSA), 1% suero de cabra, y 0,3% Tritón X-100.

Posteriormente se agregaron los anticuerpos primarios (Tabla I), diluidos en solución de bloqueo y se incubaron toda una noche a 4°C. Se realizaron 5 lavados con PBS de 10 minutos cada uno para eliminar excesos del anticuerpo primario y se procedió a agregar los anticuerpos secundarios, diluidos en solución de bloqueo y se incubaron durante 1 hr. a temperatura ambiente; se repitieron los lavados con PBS y se marcaron los núcleos con DAPI, que se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un nuevo lavado con PBS y se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (Dako Industries, Carpinteria, CA, USA). Las muestras se conservaron en cajas plásticas para portaobjetos a 4°C.

Anticuerpo primario	Dilución	Fabricante	Hospedero*	Anticuerpo secundario
Anti - CD73	1:100	Miltenyi Biotec	Ms	Cy2 - Anti - Ms IgG
Anti - CD90	1:100	Miltenyi Biotec	Ms	Cy2 - Anti - Ms IgG
Anti - CD105	1:100	Miltenyi Biotec	Ms	Cy2 - Anti - Ms IgG
Anti - CD146	1:100	Invitrogen	Rb	Cy2 - Anti - Rb IgG
Anti - STRO-1	1:100	Invitrogen	Ms	Cy2 - Anti - Rb IgG
Anti - HIF-1 $\alpha$	1:200	Abcam	Ms	Cy3 - Anti - Ms IgG
Anti - $\alpha$ -Tubulin III	1:500	Invitrogen	Ms	Cy2 - Anti - Ms IgG
Anti - CD31	1:100	DAKO	Ms	Cy3 - Anti - Ms IgG
Anti - $\alpha$ SMA	1:200	Sigma Aldrich	Ms	Cy2 - Anti - Ms IgG
DAPI	1:1000	DAKO	-	-

**Tabla I:** Panel de anticuerpos primarios y moléculas fluorescentes utilizadas. Todos los anticuerpos secundarios se utilizaron en dilución 1:500. \* Ms: Mouse (Ratón), Rb: Rabbit (Conejo).

### Microscopía Confocal

Las muestras fueron observadas y analizadas por medio de un microscopio confocal Nikon C1 Plus, equipado con una fuente de excitación de tres láseres de distintas longitudes de onda de emisión (405, 488 y 555 nm), tres fotomultiplicadores que permiten la detección simultánea de tres canales de fluorescencia y canal adicional de transmisión con contraste diferencial. Las imágenes generadas fueron capturadas y almacenadas mediante el software *Nis-Element Viewer* y convertidas a formato Adobe Acrobat para su análisis.

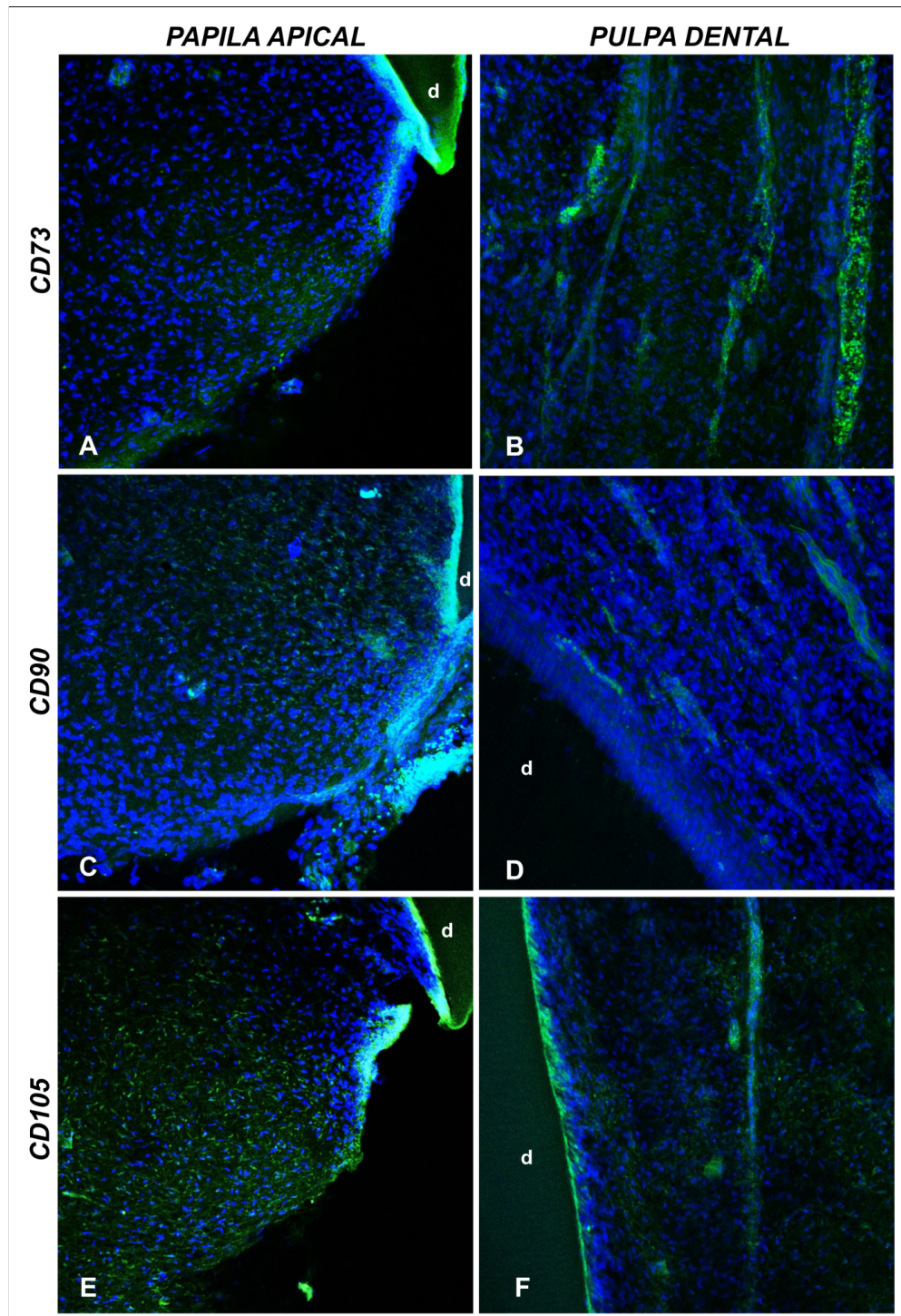
## **Resultados**

En la papila apical se evidencia la expresión de los marcadores de diferenciación celular clásicamente asociados a células troncales mesenquimales CD73, CD90 y CD105, estos marcadores también se expresan en la pulpa dental adyacente a la papila.

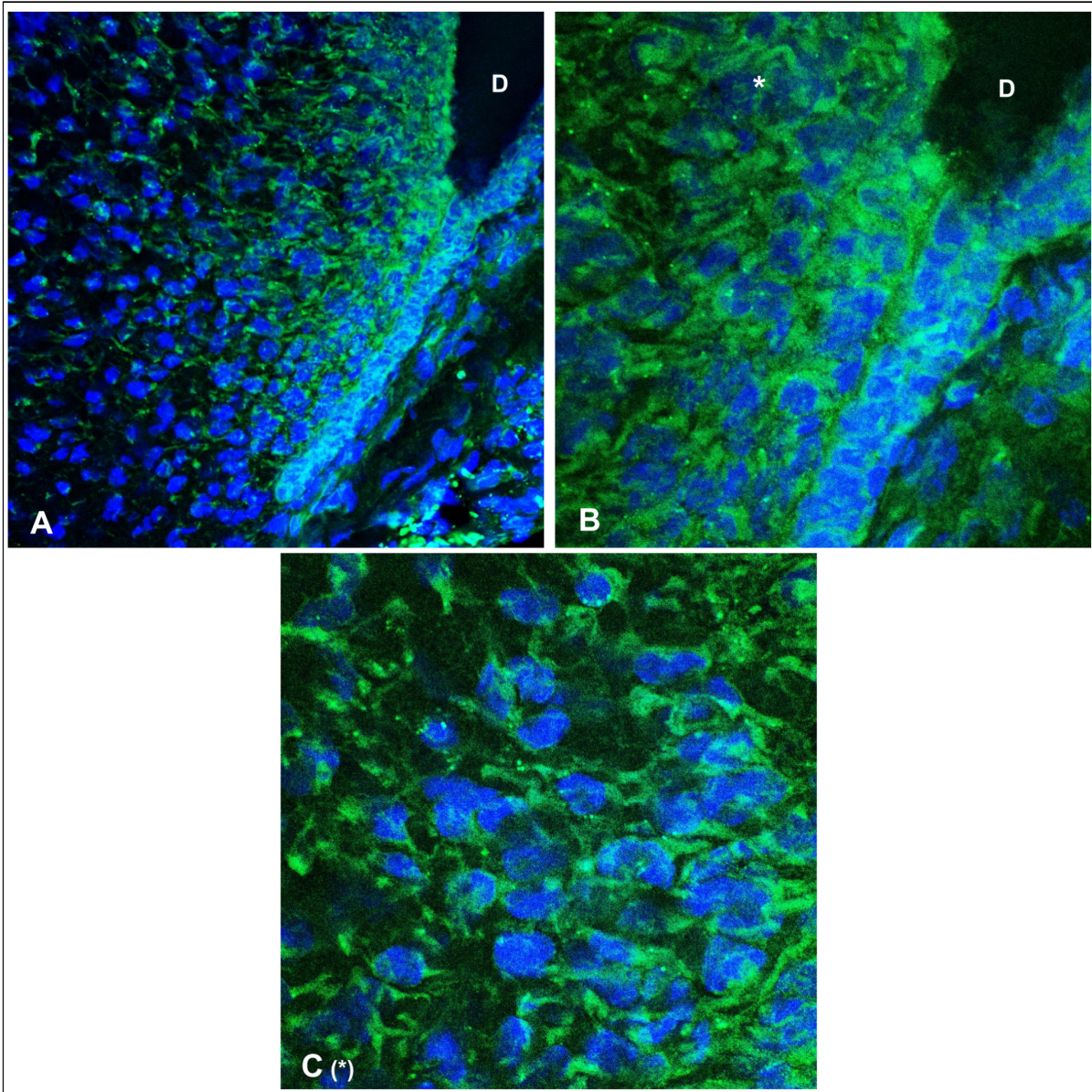
La expresión de CD73 en la papila apical es reducida, distinguiéndose en unas pocas células en el centro de la papila, a diferencia de la pulpa, donde se evidencia una expresión abundante asociada a vasos sanguíneos (Fig. 9). La expresión de CD90 es abundante en la papila apical, distinguiéndose como una marca más concentrada en las zonas laterales de la papila, mientras que en la pulpa la expresión es perivascular (Figs. 9-10). La expresión de CD105 también es abundante en la papila, apreciándose una marca más concentrada en la zona central del tejido, en la pulpa también es posible observar una gran cantidad de células positivas para este marcador (Fig. 9).

Los marcadores CD146 y STRO-1, también asociados a células troncales mesenquimales, se expresan en la papila apical y en la pulpa.

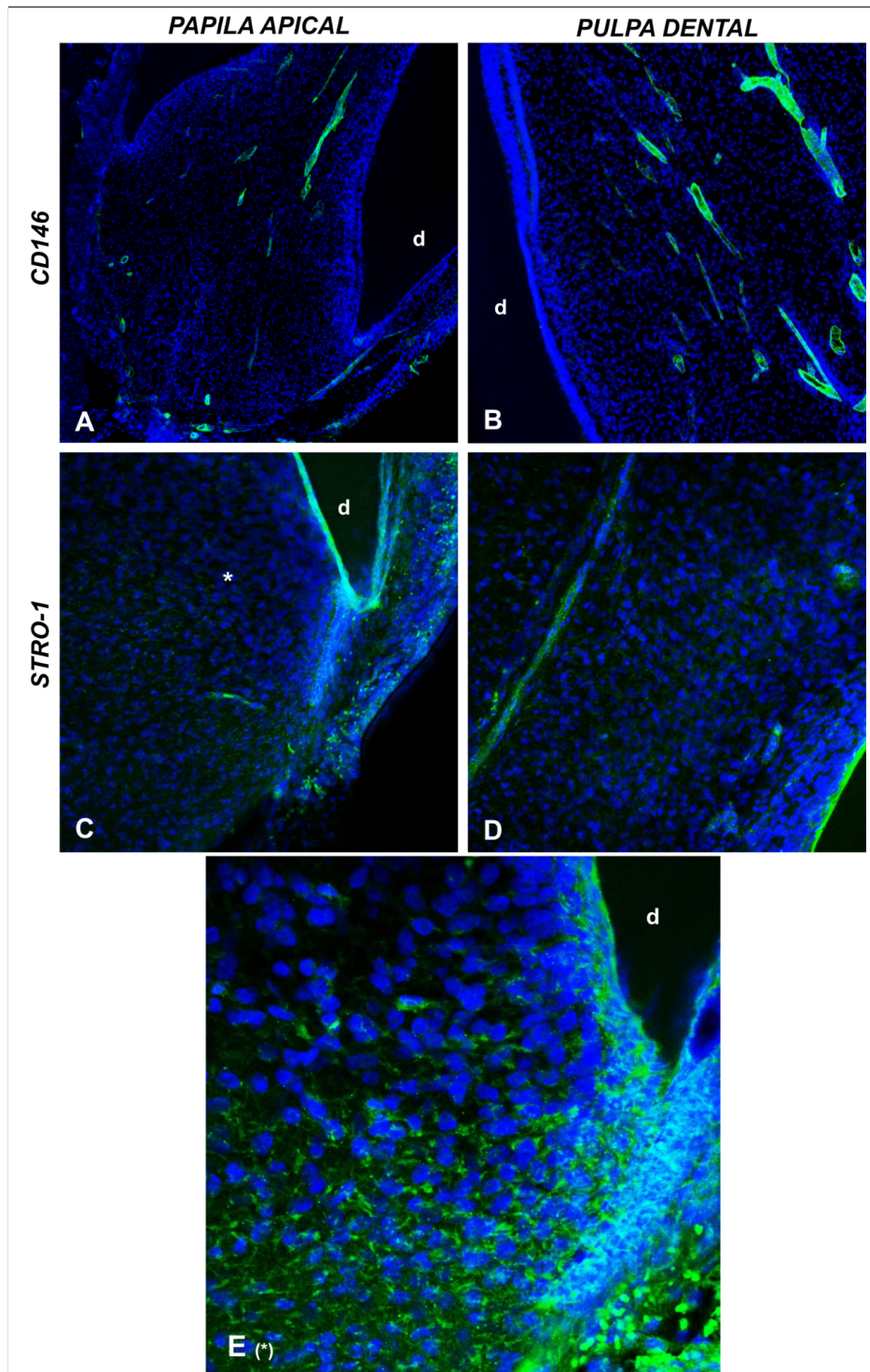
CD146 se expresa en ambos tejidos en una ubicación perivascular, sin embargo en la papila apical hay una menor cantidad de células CD146 positivas en comparación con la pulpa, donde la expresión es abundante. Por otra parte STRO-1 se expresa en abundancia en las zonas laterales de la papila, de manera similar a CD90, mientras que en la pulpa su expresión fue principalmente perivascular (Fig. 11).



**Figura 9:** Expresión de marcadores de MSC en la papila apical y pulpa dental. **CD73** (Verde): **(A)** Papila Apical donde se aprecia una expresión mínima del marcador y **(B)** Pulpa dental, donde la expresión es abundante y perivascular. **CD90** (Verde): **(C)** Papila Apical en la que se observa una expresión abundante, concretada en las zonas laterales y **(D)** Pulpa dental en que la expresión es perivascular. **CD105** (Verde): **(E)** Papila Apical, tejido en el cual la expresión es abundante y ampliamente distribuida y **(F)** Pulpa dental, donde al igual que los marcadores anteriores la expresión es perivascular. d :Dentina. Todas las imágenes obtenidas con el objetivo x20.

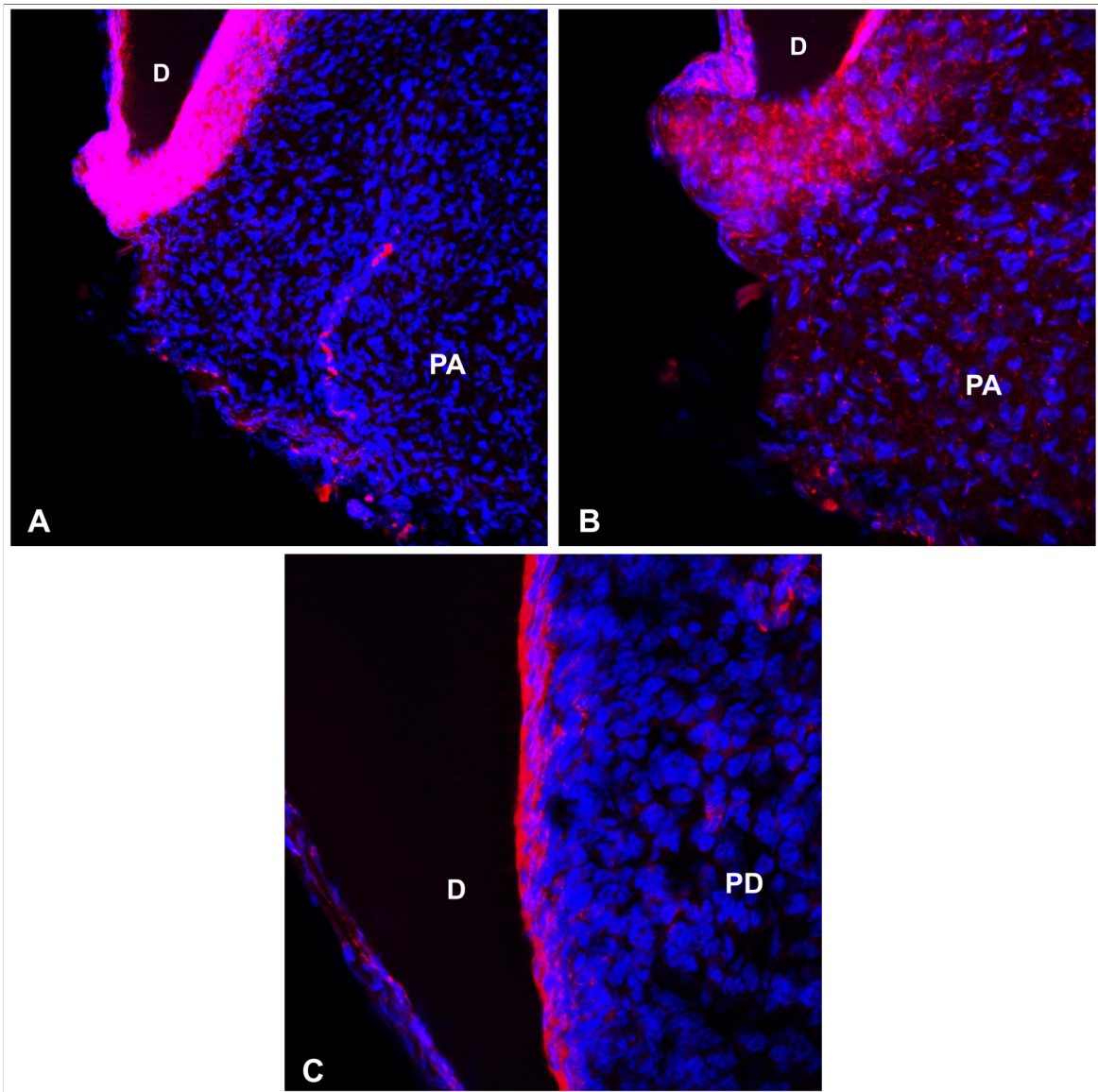


**Figura 10:** Detalle de la expresión de CD90 (Verde). **(A)** Expresión de CD90 en las zonas laterales de la Papila apical (x40). **(B)** Una vista en mayor aumento permite distinguir una marca intensa, además es posible distinguir las células de la vaina epitelial de Hertwig, que también expresan el marcador (x60). **(C)** Vista con aumento de la zona marcada por (\*) en la imagen (B), (x100). D: Dentina.

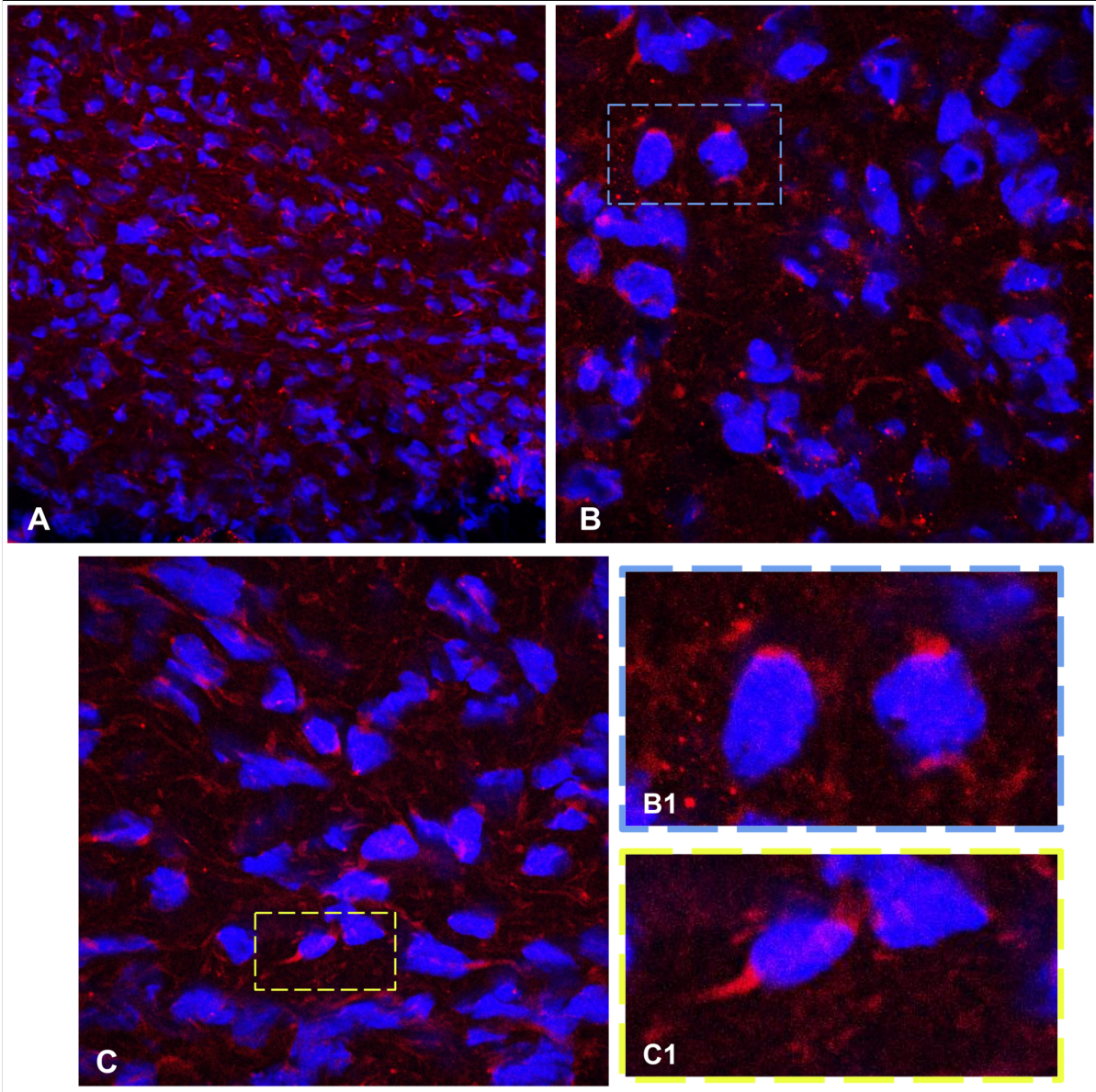


**Figura 11:** Expresión de CD146 (A y B) y STRO-1 (C, D y E) en la papila apical y la pulpa dental. **(A)** La expresión de CD146 (Verde) en la papila tiene una ubicación perivascular (Flechas), no expresándose en otras zonas del tejido. **(B)** En la pulpa la expresión de CD146 también es perivascular y más abundante que en la papila. **(C)** Expresión de STRO-1 en la papila apical, concentrada en la zona lateral y con expresión perivascular. En la pulpa dental **(D)** la expresión es perivascular. **(E)** Detalle (x40) de la expresión de STRO-1 en la papila apical. d: Dentina.

La caracterización del metabolismo de oxígeno de las células de la papila apical a través de la expresión de HIF-1 $\alpha$  muestra que estas se encuentran en estado de hipoxia (Fig. 12). En las células de la papila apical la expresión del factor de transcripción se observa como una marca de intensidad variable de ubicación perinuclear que se extiende por el citoplasma de acuerdo a la variación de intensidad (Fig. 13). En la pulpa dental adyacente también es posible encontrar algunas células que expresan HIF-1 $\alpha$  (Fig. 12).

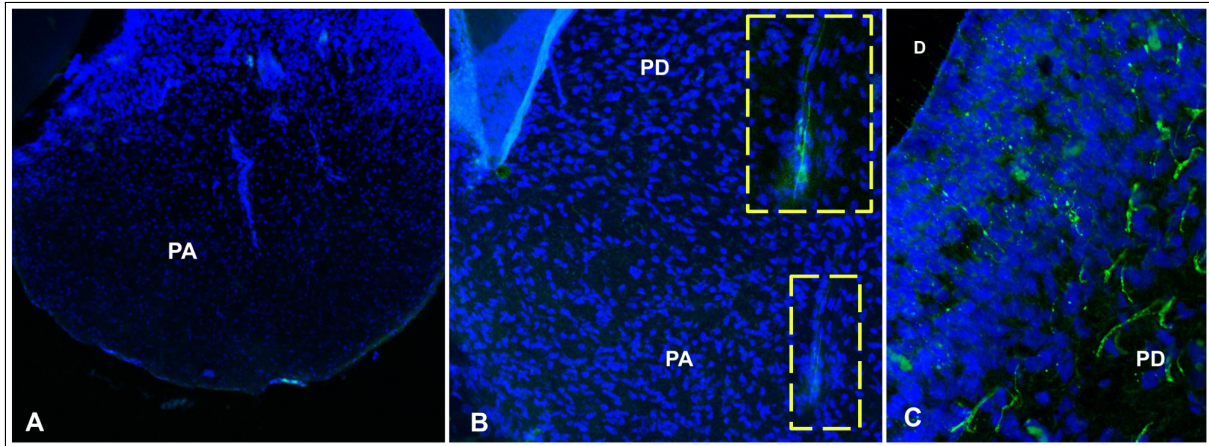


**Figura 12:** Expresión de HIF-1 $\alpha$  en la papila apical (A) y (B) HIF-1 $\alpha$  se expresa en gran parte de la papila apical, siendo más intensa en la zona lateral. (C) Algunas zonas de la pulpa dental adyacente a la papila también expresaron el marcador. PA: Papila Apical. PD: Pulpa dental. D: Dentina.

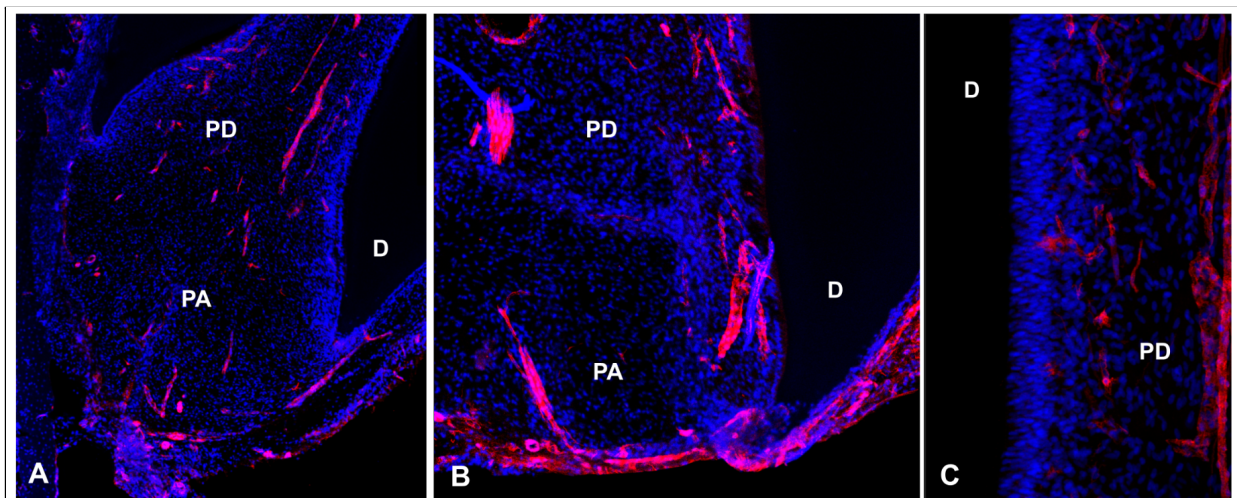


**Figura 13:** Detalle de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en la papila apical. **(A)** Amplia zona de expresión de HIF-1 $\alpha$  en el centro de la papila apical (x60). **(B)** Una visión más aumentada nos permite apreciar la ubicación perinuclear del marcador. Una vista ampliada del detalle de la zona marcada **(B1)** muestra dos células expresando el marcador en la zona perinuclear (x100). **(C)** La expresión del factor inducido por hipoxia adquiere un patrón difuso, que varía en intensidad y permite distinguir algunos citoplasmas alargados de las células de la papila apical, tal como se muestra en la zona marcada **(C1)** (x100). PA: Papila Apical. PD: Pulpa dental.

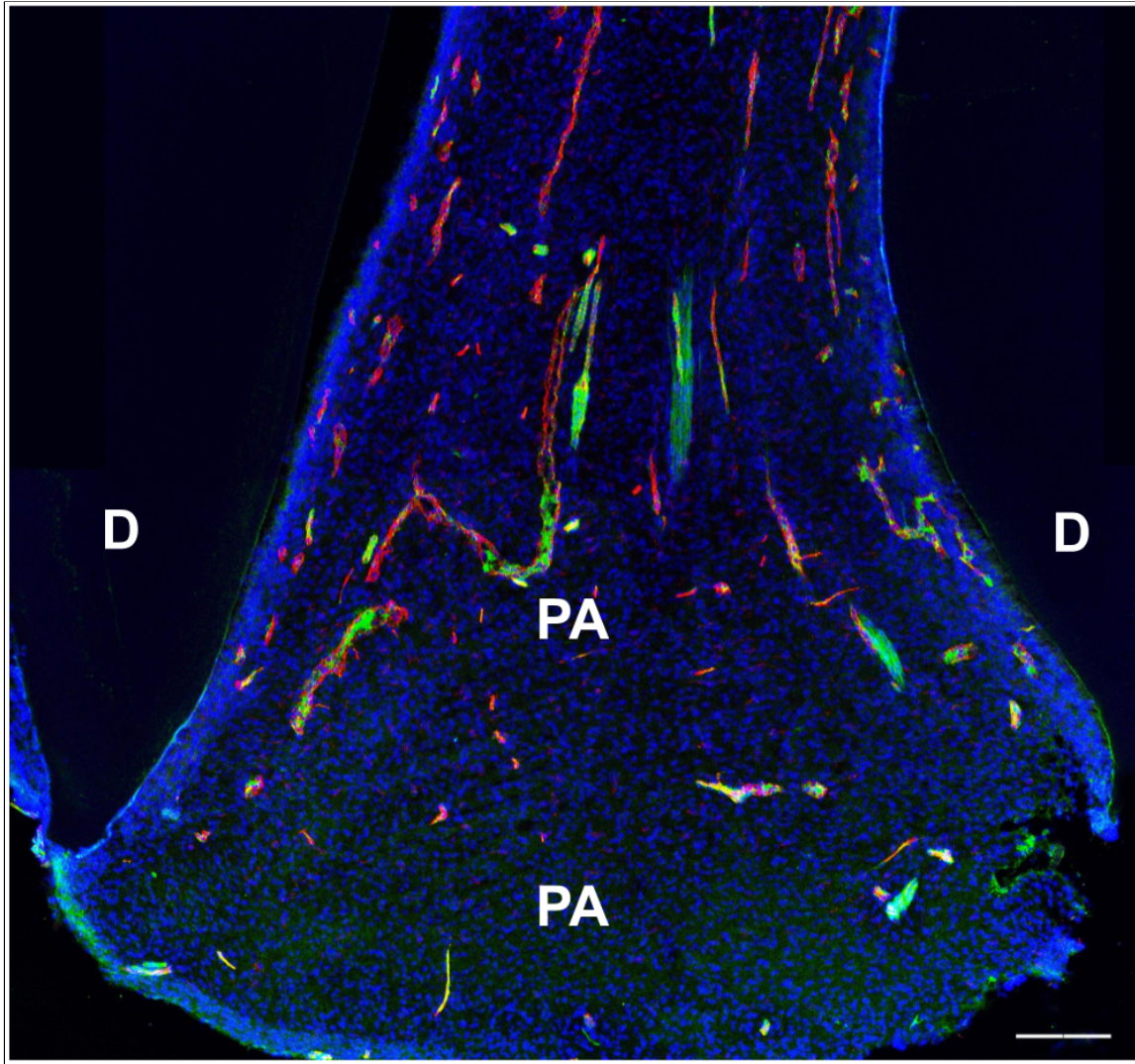
La caracterización de los componentes neurovasculares de la papila apical con microscopía confocal confirma que la papila apical es un tejido pobremente innervado y vascularizado; el inmunomarcaje contra  $\beta$ -Tubulina III revela pocas fibras nerviosas en la papila apical (Fig. 14). Por otra parte, la presencia de vasculatura es escasa; la expresión positiva de los marcadores  $\alpha$ SMA (Fig. 15) y CD31 (Fig. 16) revela pocas células endoteliales y de músculo liso.



**Figura 14:** Inmunomarcaje contra  $\beta$ -Tubulina III (Verde) en la papila apical **(A)** (x10) y **(B)** (x20) apenas revela la presencia de fibras nerviosas en la zona central de la pulpa (detalle de la zona marcada). **(C)** La pulpa dental adyacente exhibe una alta cantidad de fibras nerviosas (x40). PA: Papila Apical. PD: Pulpa dental



**Figura 15:** Inmunomarcaje contra  $\alpha$ -SMA (Rojo) en un diente inmaduro permite vislumbrar una baja cantidad de vasos sanguíneos en la papila apical, principalmente en la periferia y en el centro en dirección a la pulpa **(A)** (Reconstrucción). **(B)** Detalle de la vasculatura en la papila apical, mostrando la ubicación de los vasos en dirección a la pulpa dental (x10). **(C)** Expresión de  $\alpha$ -SMA en la pulpa dental, se aprecia un marcaje abundante en comparación con la papila (x10). D: Dentina. HA: Hueso alveolar. PA: Papila Apical. PD: Pulpa dental.



**Figura 17:** Doble inmunomarcaje contra componentes vasculares y de MSC (CD31 rojo; CD146 verde). La papila apical se aprecia como un tejido poco vascularizado en comparación con la pulpa (x10). D: Dentina; PA: Papila Apical; PD: Pulpa dental. Barra de escala: 200  $\mu$ m

## Discusión

La papila apical es un tejido ubicado en el ápice de un diente inmaduro, que alberga una población de células indiferenciadas que dan origen a los odontoblastos y las demás células de la pulpa radicular<sup>4</sup>, estas células al ser aisladas y cultivadas exhiben propiedades de MSC y han sido denominadas SCAP<sup>7</sup>, estos datos sugieren que la papila apical podría ser considerada un nicho; un microambiente especializado y dinámico en que habitan las células troncales<sup>59</sup>. Una de las características que comparten varios nichos de células troncales, es que son sitios con baja presión de oxígeno, condición que sería clave en la mantención del estado indiferenciado de las células y su potencial de diferenciación multilineaje<sup>17</sup>, por lo que investigar estas formas de control y modulación de las propiedades de las MSC puede ser crucial en el desarrollo de tratamientos basados en MSC de origen dental. En el presente estudio se utilizó inmunohistoquímica y microscopía confocal para caracterizar las células de la papila apical, su estado metabólico y sus componentes neurovasculares. Los datos obtenidos sugieren que en la papila apical habita una población heterogénea de células troncales mesenquimales, las cuales se encuentran en hipoxia, además es un tejido con una escasa vasculatura y prácticamente carente de terminaciones nerviosas, además aportamos con imágenes de buena calidad de la papila apical.

Aquí reportamos que las células de la papila apical expresan CD73, CD90 y CD105, marcadores de diferenciación celular cuya expresión en conjunto es usada para caracterizar MSC<sup>24</sup>. La expresión de estos marcadores ya había sido reportada en la papila y en cultivos derivados de la misma<sup>6,7</sup>, por lo que nuestros datos refuerzan la idea de que este tejido alberga células troncales mesenquimales. Nuestros resultados también fueron consistentes con lo reportado por Ruparel *et al.*, en 2013 en cuanto que la distribución de los marcadores en la papila no es uniforme, encontrándose más densamente poblada por células CD90 positivas, mientras que las células CD73 y CD105 positivas parecen ser menores<sup>6</sup>, fenómeno no reportado en cultivos, junto con ser evidencia de la alteración fenotípica que las células experimentan al ser cultivadas, este hecho podría indicar un compromiso hacia

determinados linajes celulares durante el desarrollo radicular; por ejemplo la expresión de CD90 fue abundante en las zonas laterales de la papila incluyendo la vaina epitelial de Hertwig y la zona de transición entre la papila y la pulpa, por lo que CD90 podría indicar células con un potencial de diferenciación hacia linajes odontoblasticos, mientras que CD73 y CD105 hacia linajes perivasculares. Este fenómeno también podría explicarse por variaciones en el estado metabólico de las células, la difusión de factores tróficos desde la vaina epitelial de Hertwig y la pulpa, así como los fenómenos de comunicación intercelular entre las células de la papila.

También reportamos por primera vez la expresión de CD146 y STRO-1 en la papila apical, la expresión de estos marcadores sólo se había reportado en cultivos, siendo utilizada para caracterizar la existencia de subpoblaciones celulares entre las SCAP<sup>85</sup>. Nuestras imágenes muestran que en la papila apical CD146 se expresa en células perivasculares, mientras que STRO-1 tuvo una expresión más heterogénea, marcando células perivasculares y las células de forma alargada que habitan en la papila. Este fenómeno apoyaría la existencia de subpoblaciones entre las SCAP y sus causas pueden ser las mismas que se discutieron para los marcadores anteriores, de la misma forma que este hecho también evidencia la alteración en la identidad fenotípica que sufren las células al ser liberadas de la papila y cultivadas. Todos estos marcadores también se expresaron en la pulpa dental adyacente a la papila, en una ubicación perivascular, situación que ya se había reportado<sup>40,82</sup>, en la pulpa las MSC tienen una ubicación perivascular, lo que les permite activarse y participar en procesos de reparación al recibir un estímulo, como la caries dental.

Reportamos por primera vez la expresión de HIF-1 $\alpha$  en la papila apical, HIF-1 es un factor de transcripción formado por una subunidad alfa y una subunidad beta, que se encarga de regular la respuesta celular a bajas concentraciones de oxígeno. Dado que la subunidad alfa es degradada en condiciones de normoxia, su presencia en la célula depende de una baja en la cantidad de oxígeno que esta recibe y por lo tanto su presencia es un indicador de que las células se encuentran en hipoxia<sup>64</sup>. La papila apical expresa ampliamente HIF-1 $\alpha$  por lo que podemos

afirmar que es un tejido eminentemente hipóxico. Las imágenes más detalladas permiten distinguir que en las células HIF-1 $\alpha$  se concentra principalmente en la zona perinuclear, desde donde se extiende por el citoplasma, variando en intensidad; la ubicación perinuclear de la marca es propia de un factor de transcripción, mientras que la variación en intensidad puede explicarse por diferencias en el suministro de oxígeno que cada célula recibe, y que es inversamente proporcional a la expresión HIF-1 $\alpha$ <sup>67</sup>. Se ha reportado que varios nichos de células troncales son microambientes bajos en oxígeno, la hipoxia celular sería fundamental para la mantención del estado indiferenciado de las MSC, así como la modulación de varias de sus propiedades como la potencialidad y el compromiso de destino hacia determinados linajes celulares<sup>97</sup><sup>17</sup>. También se ha reportado que la hipoxia tiene un rol importante en el desarrollo, fundamentalmente el de los mamíferos, en los cuales gran parte del desarrollo embrionario ocurre en bajas cantidades de oxígeno<sup>64</sup>, sin embargo el rol de la hipoxia en el desarrollo dental en humanos no está investigado.

Se ha reportado que en condiciones de hipoxia los cultivos de SCAP mejoran sus propiedades de diferenciación hacia ciertos linajes celulares, así como la capacidad de continuar proliferando durante más pasajes que las células cultivadas en normoxia, además la hipoxia parece modular la expresión los marcadores de diferenciación clásicos de MSC, queda por ver si existe un mecanismo molecular que pueda estar mediando las diferencias en la expresión de marcadores de MSC observadas. Los reportes contradictorios respecto a si la tasa de proliferación mejora o no en condiciones de hipoxia, pueden atribuirse a las diferentes concentraciones de oxígeno utilizadas en los experimentos<sup>87</sup><sup>88</sup>. Proponemos que la hipoxia, a través de la expresión de HIF-1 $\alpha$  juega un rol en la modulación de las propiedades de diferenciación de las células de la papila apical durante la formación de la raíz, así como en la mantención del estado indiferenciado de las células. Además su detección en la pulpa dental sugiere que la hipoxia puede tener un rol en el proceso de angiogénesis que da origen a la abundante vasculatura reportada en la pulpa dental ().

Respecto a la caracterización de los componentes neurovasculares de la papila apical mediante inmunomarcaje contra  $\alpha$ -Tubulina III, detectamos pocas nerviosas en la papila apical, siendo detectables apenas unas fibras en el centro del tejido, aparentemente en dirección a la pulpa y sin entregar inervación terminal a la papila. Exploraciones más acabadas en busca de caracterizar posibles elementos nerviosos en la papila apical no se han realizado, sin embargo, al ser la papila apical un tejido que desaparece al concluir la formación radicular, la ausencia de inervación no es extraña.

Por otra parte, utilizando CD31,  $\alpha$ SMA y considerando también la expresión del marcador CD146, reportamos que los componentes vasculares de la papila apical son escasos. CD31 es un marcador también conocido como molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias (PECAM-1)<sup>96</sup>, la expresión de esta proteína en la papila y en la pulpa indica la presencia de células endoteliales. Por otra parte, la expresión de  $\alpha$ SMA, que evidencia la capacidad contráctil de los vasos sanguíneos, también es escasa en la papila. Estos datos parecen indicar que la papila apical carece de irrigación terminal, dado que los vasos que la atraviesan van en dirección a la pulpa, y son evidencia secundaria de que las células en la papila tienen un suministro bajo de oxígeno.

Los hallazgos analizados, en conjunto con la evidencia obtenida en estudios anteriores, apoyan la hipótesis de que la papila apical es un nicho de células troncales mesenquimales, constituyendo un microambiente fundamental para la mantención del estado indiferenciado de las células y la modulación sus propiedades de diferenciación hacia los distintos linajes celulares que forman la raíz de un diente maduro. En este contexto, el metabolismo de oxígeno de las células de la papila, específicamente el estado de hipoxia, caracterizado por la expresión del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , parece jugar un rol preponderante en la biología de las células troncales y esperamos que esta investigación sea un punto de partida para la realización de investigaciones sobre su rol en la odontogénesis, las células troncales derivadas de tejidos orales y la biología oral en general.

El estudio de condiciones que mejoren las propiedades de las células puede traer mejoras en los tratamientos ya disponibles o ser usados en el desarrollo de nuevos tratamientos. En esta línea, el rol regulador de la hipoxia sobre las células de la papila apical se debe considerar a la hora de desarrollar y aplicar tratamientos basados en las propiedades de las células de la papila apical, como los tratamientos de endodoncia regenerativa. Debemos tener en cuenta que aún existe mucha controversia acerca de la biología de las MSC y por lo tanto son necesarias más investigaciones que profundicen en sus características antes de avanzar en su uso clínico en humanos.

Dentro de las limitaciones de este estudio está la cantidad de anticuerpos que pudimos pesquisar al mismo tiempo, tanto por las características propias del microscopio confocal, como por las características de los anticuerpos disponibles, casi todos incubados en el mismo hospedero. Otra limitación fue la imposibilidad de conseguir muestras de papila apical de dientes que no fueran terceros molares.

## **Conclusiones**

La presente investigación tiene como principal objetivo caracterizar las células troncales mesenquimales de la papila apical, su metabolismo de oxígeno y su relación con los componentes neurovasculares mediante el uso de inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia, considerando los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La evaluación de la expresión de marcadores de MSC en la papila apical confirma que esta alberga células troncales mesenquimales.
- La evaluación del metabolismo de oxígeno de las células de la papila apical mediante la expresión de HIF-1 $\alpha$  demuestra que se encuentran en hipoxia.
- La caracterización de los elementos neurovasculares demuestra que la papila apical es un tejido escasamente innervado y cuya vasculatura es escasa, esto último refuerza los hallazgos respecto a la expresión de HIF-1 $\alpha$ .

## Sugerencias

Para futuras investigaciones sugerimos emplear co-marcaje de anticuerpos contra MSC, lo que podría permitir pesquisar la existencia de distintas subpoblaciones celulares en la papila. Utilizar distintas combinaciones de anticuerpos también puede ser útil para estudiar la relación entre la hipoxia celular y procesos como la angiogénesis y la expresión de marcadores de diferenciación de MSC. En esta misma línea, exploraciones más detalladas de la microarquitectura de la papila requerirían el uso de reconstrucciones tridimensionales a partir de cortes histológicos seriados. También sugerimos la utilización de *Western blot*, un método analítico clásico, para cuantificar la expresión de HIF-1 $\alpha$  en una muestra de papila apical.

Además, se sugiere avanzar hacia un enfoque experimental en los estudios sobre las células troncales de la papila apical, lo que puede ser llevado a cabo mediante el uso de cultivos celulares, en los cuales puede evaluarse el rol modulador de la hipoxia en la identidad fenotípica de las MSC, así como en otras de sus propiedades reportadas. La inducción de hipoxia puede realizarse mediante el cultivo de las células en bajas condiciones de oxígeno, así como mediante la inducción química. Estudios como estos pueden aportar al conocimiento sobre la biología de las células troncales, así como al desarrollo de mejores tratamientos de revascularización de la pulpa.

## **Referencias bibliográficas**

1. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. NPJ Regenerative medicine. 2019 Dec 2;4(1):1-5.
2. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, *et al.* Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. Stem cells. 2015 Mar;33(3):627-38.
3. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. J Endod. 2013 Mar;39(3 Suppl):S30-43.
4. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. Journal of endodontics. 2008 Feb 1;34(2):166-71.
5. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. J Endod. 2008 Jun;34(6):645-51.
6. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. J Endod. 2013 Mar;39(3):357-63.
7. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PloS one. 2006 Dec 20;1(1):e79.
8. Musiał-Wysocka A, Kot M, Majka M. The pros and cons of mesenchymal stem cell-based therapies. Cell transplantation. 2019 Jul;28(7):801-12.

9. Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature biotechnology*. 2014 Aug;32(8):795-803.
10. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name!. *Stem cells translational medicine*. 2017 Jun;6(6):1445-51.
11. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells*. 2019 Jul;37(7):855-64.
12. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, Drela K. Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells International*. 2019 Apr 9;2019.
13. Martens W, Bronckaers A, Politis C, Jacobs R, Lambrichts I. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clin Oral Investig*. 2013 Dec;17(9):1969-83.
14. Nada OA, El Backly RM. Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2018;6.
15. Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell stem cell*. 2015 Mar 5;16(3):239-53.
16. De Berdt P, Vanacker J, Ucakar B, Elens L, Diogenes A, Leprince JG, *et al*. Dental Apical Papilla as Therapy for Spinal Cord Injury. *J Dent Res*. 2015 Nov;94(11):1575-81
17. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell stem cell*. 2010 Aug 6;7(2):150-61.

18. Pulyodan MK, Mohan SP, Valsan D, Divakar N, Moyin S, Thayyil S. Regenerative endodontics: A paradigm shift in clinical endodontics. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2020 Aug 1;12(5):20.
19. Kang J, Fan W, Deng Q, He H, Huang F. Stem cells from the apical papilla: a promising source for stem cell-based therapy. *BioMed Research International*. 2019 Jan 29;2019.
20. Somorjai IM, Lohmann JU, Holstein TW, Zhao Z. Stem cells: a view from the roots. *Biotechnology journal*. 2012 Jun;7(6):704-22.
21. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974 Apr 1;17(4):331-40.
22. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*. 1991 Sep;9(5):641-50.
23. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011 Feb;12(2):126-31.
24. Dominici ML, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Jan 1;8(4):315-7.
25. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, *et al*. CD nomenclature 2015: human leukocyte differentiation antigen workshops as a driving force in immunology. *The Journal of Immunology*. 2015 Nov 15;195(10):4555-63.
26. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, *et al*. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *The Journal of experimental medicine*. 2004 Dec 6;200(11):1395-405.
27. Ode A, Schoon J, Kurtz A, Gaetjen M, Ode JE, Geissler S, *et al*. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic

differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater.* 2013 Jan 8;25(3).

28. Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR, *et al.* A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem cell research & therapy.* 2016 Dec;7(1):1-4.

29. Maleki M, Ghanbarvand F, Behvarz MR, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *International journal of stem cells.* 2014 Nov;7(2):118.

30. Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M, Martín F. CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PloS one.* 2013 Oct 4;8(10):e76979.

31. Mark P, Kleinsorge M, Gaebel R, Lux CA, Toelk A, Pittermann E, *et al.* Human mesenchymal stem cells display reduced expression of CD105 after culture in serum-free medium. *Stem Cells International.* 2013 Oct;2013.

32. Ramos TL, Sánchez-Abarca LI, Muntión S, Preciado S, Puig N, López-Ruano G, *et al.* MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Communication and Signaling.* 2016 Dec;14(1):1-4.

33. Rolandsson S, Sjöland AA, Brune JC, Li H, Kassem M, Mertens F, *et al.* Primary mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells. *BMJ open respiratory research.* 2014 May 1;1(1).

34. Consentius C, Mirenska A, Jurisch A, Reinke S, Scharm M, Zenclussen AC, *et al.* In situ detection of CD73+ CD90+ CD105+ lineage: Mesenchymal stromal cells in human placenta and bone marrow specimens by chipcytometry. *Cytometry Part A.* 2018 Sep;93(9):889-93.

35. Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer letters.* 2013 Apr 28;330(2):150-62.

36. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells.* 2014 Jun;32(6):1408-19.

37. Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schütz B, Ehinger M, *et al.* CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2011 May 12;117(19):5067-77.
38. Ranga Rao S, Subbarayan R. Passage-dependent expression of STRO-1 in human gingival mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry.* 2019 Mar;120(3):2810-5.
39. Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF, *et al.* Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem cells and development.* 2011 Oct 1;20(10):1747-52.
40. Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A, *et al.* Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of  $\alpha$ -smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochemistry and cell biology.* 2012 Oct 1;138(4):583-92.
41. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, *et al.* Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2014 Apr 1;71(8):1353-74.
42. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell.* 2008 Sep 11;3(3):301-13.
43. Mills SJ, Cowin AJ, Kaur P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. *Cells.* 2013 Sep;2(3):621-34.
44. Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacology & therapeutics.* 2015 Jul 1;151:107-20.
45. Crisan M, Corselli M, Chen WC, Péault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2012 Dec;16(12):2851-60.
46. Caplan AI. All MSCs are pericytes?. *Cell stem cell.* 2008 Sep 11;3(3):229-30.
47. Yianni V, Sharpe PT. Perivascular-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research.* 2019 Sep;98(10):1066-72.

48. Smyth LC, Rustenhoven J, Scotter EL, Schweder P, Faull RL, Park TI, Dragunow M. Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2018 Oct 1;92:48-60.
49. Corselli M, Chen CW, Sun B, Yap S, Rubin JP, Péault B. The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2012 May 20;21(8):1299-308.
50. Teixeira FG, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: current trends and future challenges. *Neural regeneration research*. 2020 Jan;15(1):75.
51. Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. *Stem cells international*. 2018 Oct;2018.
52. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of immunology research*. 2015 Oct;2015.
53. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*. 2019 Aug;8(8):784.
54. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, *et al.* Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2019 Sep;13(9):1738-55.
55. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*. 2019 Aug;8(8):886.
56. O'brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*. 2011 Mar 1;14(3):88-95.
57. De Luca M, Aiuti A, Cossu G, Parmar M, Pellegrini G, Robey PG. Advances in stem cell research and therapeutic development. *Nature cell biology*. 2019 Jul;21(7):801-11.
58. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*. 2011 Feb;20(1):5-14.
59. Singh A, Yadav CB, Tabassum N, Bajpeyee AK, Verma V. Stem cell niche: Dynamic neighbor of stem cells. *European Journal of Cell Biology*. 2019 Jun 1;98(2-4):65-73.

60. Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell stem cell*. 2010 Feb 5;6(2):103-15.
61. Picoli CC, Costa AC, Rocha BG, Silva WN, Santos GS, Prazeres PH, *et al*. Sensory nerves in the spotlight of the stem cell niche. *Stem cells translational medicine*. 2020 Oct 28.
62. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014 Aug 1;1840(8):2506-19.
63. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun;441(7097):1075-9.
64. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012 Feb 3;148(3):399-408.
65. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *Journal of cellular physiology*. 2009 May;219(2):271-5.
66. Semenza GL. The genomics and genetics of oxygen homeostasis. *Annual review of genomics and human genetics*. 2020 Aug 31;21:183-204.
67. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell stem cell*. 2011 Oct 4;9(4):298-310.
68. Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell stem cell*. 2012 Nov 2;11(5):596-606.
69. Betancourt Gamboa K, Barciela Calderón J, Guerra Menéndez J, Cabrera Carballo N. Uso de células madre en el complejo bucofacial. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2012 Oct;16(5):651-61.
70. Robey P. "Mesenchymal stem cells": fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000Research*. 2017;6.
71. Murray IR, Péault B. Q&A: mesenchymal stem cells—where do they come from and is it important?. *BMC biology*. 2015 Dec;13(1):1-6.

72. Wang Y, Han ZB, Song YP, Han ZC. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem cells international*. 2012 Oct;2012.
73. Tucker AS, Fraser GJ. Evolution and developmental diversity of tooth regeneration. In *Seminars in cell & developmental biology* 2014 Jan 1 (Vol. 25, pp. 71-80). Academic Press.
74. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology-e-book: development, structure, and function*. Elsevier Health Sciences; 2017 Aug 15.
75. Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *International journal of biological sciences*. 2009;5(3):226.
76. Couve E, Lovera M, Suzuki K, Schmachtenberg O. Schwann cell phenotype changes in aging human dental pulp. *Journal of dental research*. 2018 Mar;97(3):347-55.
77. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nature Reviews Genetics*. 2004 Jul;5(7):499-508.
78. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in cell biology*. 2010 Dec 1;20(12):715-22.
79. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, *et al*. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics*. 2008 Feb 1;34(2):166-71.
80. Huang GJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*. 2009 Sep;88(9):792-806.
81. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016 Jul 1;143(13):2273-80.
82. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, *et al*. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*. 2002 Aug;81(8):531-5.
83. Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *Journal of endodontics*. 2010 May 1;36(5):781-9.

84. Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A. Survival of the apical papilla and its resident stem cells in a case of advanced pulpal necrosis and apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2017 Apr 1;43(4):561-7.
85. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Comparative characterization of STRO-1neg/CD146pos and STRO-1pos/CD146pos apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Archives of oral biology*. 2013 Oct 1;58(10):1556-68.
86. Kang J, Fan W, Deng Q, He H, Huang F. Stem cells from the apical papilla: a promising source for stem cell-based therapy. *BioMed Research International*. 2019 Jan 29;2019.
87. Vanacker J, Viswanath A, De Berdt P, Everard A, Cani PD, Bouzin C, *et al*. Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. *Journal of endodontics*. 2014 Sep 1;40(9):1410-8.
88. Rémy M, Ferraro F, Le Salver P, Rey S, Genot E, Djavaheri-Mergny M, *et al*. Isolation and Culture of Human Stem Cells from Apical Papilla under Low Oxygen Concentration Highlight Original Properties. *Cells*. 2019 Dec;8(12):1485.
89. Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Gervois P, Wolfs E, Lambrechts I. The angiogenic potential of DPSCs and SCAPs in an in vivo model of dental pulp regeneration. *Stem cells international*. 2017 Sep 5;2017.
90. Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell biology international*. 2012 Oct;36(10):927-36.
91. Lin LM, Kahler B. A review of regenerative endodontics: current protocols and future directions. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*. 2017;51(3 Suppl 1):S41.
92. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics*. 2013 Mar;28(1):2-3.
93. Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a way forward. *The Journal of the American Dental Association*. 2016 May 1;147(5):372-80.

94. Lui JN, Lim WY, Ricucci D. An Immunofluorescence Study to Analyze Wound Healing Outcomes of Regenerative Endodontics in an Immature Premolar with Chronic Apical Abscess. *Journal of Endodontics*. 2020 Mar 2.
95. Austah O, Joon R, Fath WM, Chrepa V, Diogenes A, Couve E, *et al.* Comprehensive characterization of 2 immature teeth treated with regenerative endodontic procedures. *Journal of Endodontics*. 2018 Dec 1;44(12):1802-11.
96. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Current opinion in hematology*. 2016 May;23(3):253.

## Anexos



### CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONACIÓN DE DIENTE

#### **Donación al Banco de Muestras del LabME (BM-LabME)**

El Laboratorio de Microscopía Electrónica (LabME), Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, realiza estudios en dientes sanos y dañados, con el propósito de alcanzar una mejor comprensión de la biología dental normal y patológica. Los estudios están orientados a entender funciones celulares normales y capacidades de respuesta celular en condiciones de lesiones de caries.

Para estos propósitos el LabME mantiene un Banco de Muestras (BM-LabME) de dientes extraídos por indicaciones clínicas y aportados voluntariamente. Todas las muestras recepcionadas requieren del Consentimiento Informado escrito u oral del donante.

Las muestras recibidas en el BM-LabME son procesadas en forma anónima, conservando registros de: N° de Muestra, Fecha, Edad y Sexo del Donante. Además de señalar indicaciones de carácter clínico relevante, como sintomatología y diagnóstico consignados por el profesional responsable tratante. Toda la información es confidencial. Las muestras se conservan fijadas y forman parte de estudio de biología dental.

Investigador Responsable del BM-LabME  
Eduardo Couve Montané (Cirujano-Dentista)  
Profesor Titular  
Laboratorio de Microscopía Electrónica (LabME)  
Proyecto Fondecyt N° 1141281  
Instituto de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Valparaíso  
32-250-8077  
Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso

*(del Paciente)*

---

### CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONACIÓN DE DIENTE

Manifiesto haber sido informado y comprendo que el (los) diente (s) que he aceptado donar al banco de muestras LabME de la Universidad de Valparaíso, será(n) utilizado(s) en estudios que ayudarán a comprender mejor cómo funcionan las células de dientes sanos y dañados. Acepto que se registre mi edad y sexo, entendiéndolo que son datos confidenciales e importantes para la investigación:

Fecha: N° Muestra

Diente  
Edad  
Información Clínica Relevante

Nombre del Donante  
RUT

Firma Responsable

*(del BM-LabME)*

---

**Anexo 1:** Consentimiento informado de donación de diente para el Banco de muestras del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Valparaíso, el cual fue utilizado para la recolección de muestras.

