



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE
JALISCO, A.C.**



**“Efecto de la astaxantina en la diferenciación de células troncales
de pulpa dental y medula ósea hacia células β pancreáticas
productoras de insulina”**

TESIS

**Para obtener el grado académico de
Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica**

P R E S E N T A

Lic. QFB. Laura Susana Villa García Torres

Dirección: M. en C. Flor Yohana Flores Hernández

**Co-Dirección: Dra. Nahomy Marino Marmolejo
Dr. Jorge Gaona Bernal**

**Asesor: Dr. Jorge Bravo Madrigal
Dra. Sanghamitra Kandhual**

Guadalajara, Jal. Enero 2018



Guadalajara, Jalisco a 06 de Noviembre de 2017

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante **Laura Susana Villa García Torres**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “EFECTO DE LA ASTAXANTINA EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES DE PULPA DENTAL Y MÉDULA ÓSEA HACIA CÉLULAS β PANCREÁTICAS PRODUCTORAS DE INSULINA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica con especialidad en Biotecnología Médica y Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 10 del mes de noviembre del año 2017.

M. C. Flor Yohana Flores Hernández
Director de tesis/tutor académico

Dr. Jorge Bravo Madrigal
Asesor/Asesora

Dra. Nahomy Marino Marmolejo
Co-director de tesis/tutor en planta

Dra. Sanghamitra Kandhual
Asesor/Asesora

Dr. Jorge Gaona Beltran
Co-director de tesis/tutor en planta

Director de tesis

M.C. Flor Yohana Flores Hernández
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco, A.C

Co-director

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco, A.C.

Co-director

Dr. Jorge Gaona Bernal
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco, A.C

Asesor

Dr. Jorge Bravo Madrigal
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco, A.C

Asesora

Dra. Sanghamitra Kandhual
Biotecnología Industrial
Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco, A.C

Jurado de Examen de Grado**Presidente**

Dr. Jorge Bravo Madrigal
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco, A.C

Secretario

Dr. Luis Alberto Castillo Díaz
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco, A.C

Vocal

M.C. Flor Yohana Flores Hernández
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco, A.C

La presente tesis de maestría se llevó a cabo gracias a la beca CONACYT otorgada a la QFB. Laura Susana Vila García Torres Reg. No. Y al proyecto 233146, SS/IMSS/ISSTE-CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente por la vida y la fuerza.

A Israel mi esposo por su apoyo, amor, comprensión e impulso para continuar con mis estudios.

A mis padres Susy y Gerardo, así como a mis hermanos por su amor, apoyo incondicional y su respaldo en todo momento.

A mi Directora de Tesis, M.C. Flor por su confianza, paciencia y respaldo.

A la Dra. Nahomy por su apoyo moral, científico y práctico en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Gaona por su paciencia, apoyo práctico y asesoría en todo momento.

Al Dr. Jorge Bravo por sus valiosas aportaciones en asesoría para la realización de esta tesis.

A la Dra. Mita por su apoyo y asesoría.

A cada una de las valiosas personas que me apoyaron y participaron conmigo en la realización de este trabajo, Eli, Gleira y a todo el equipo de trabajo, gracias.

DEDICATORIA

A Dios primeramente por la vida.

A cada integrante de mi familia por su apoyo, comprensión y respaldo para impulsarme a continuar con mis estudios alentándome en cada momento de desesperación.

A mi esposo Israel por su amor e impulso en esta etapa de preparación, por alentarme a desarrollar conocimiento en el área de las ciencias y apoyarme en crecimiento profesional.

A cada integrante de mi comité tutorial, por sus valiosas aportaciones, su respaldo y confianza.

RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica degenerativa definida como un trastorno en la utilización de glucosa por una falta absoluta o relativa de insulina. Se estima que 8.2% de la población mexicana padece DM, significa que existen de cinco a seis millones de personas con este padecimiento en nuestro país.

La principal terapia es la administración de insulina exógena, puesto que este padecimiento se caracteriza por presentar daño en las células β (beta) del páncreas, la mayoría de personas que padecen DM requieren de la hormona para regular sus niveles de glucosa sanguínea, sin embargo no es posible contar con un control adecuado de la glucosa en el organismo puesto que es necesario que las células β cumplan su función, es decir, excretar la cantidad de insulina precisa y en el momento adecuado, además de ello y de que existen terapias alternativas para controlar esta enfermedad así como los hipoglucemiantes orales, el trasplante total de páncreas en conjunto con el de riñón, se requiere de donadores compatibles, cirugía mayor y hospitalización prolongada del paciente, por lo cual en muchos casos estas terapias no tienen el alcance de curar la enfermedad.

Es por ello que se ha generado gran interés en la terapia celular, que consiste en la búsqueda de substitutos de células productoras de insulina, a través de procesos de diferenciación de células troncales mesenquimales para obtener células productoras de insulina; sin embargo no se han encontrado protocolos que ofrezcan una eficiencia suficiente en la obtención de células β funcionales para proveer células que produzcan insulina para reemplazo, actualmente el objetivo de la investigación en esta área está dirigido a la búsqueda de moléculas cuyo efecto permita obtener un mayor rendimiento de células diferenciadas. Por otra parte, se sabe que la astaxantina es un carotenoide con alto potencial antioxidante, tiene la capacidad de prevenir la oxidación lipídica de las membranas celulares, se ha reportado que tiene actividad inmunomoduladora, antiinflamatoria, entre otras, se

RESUMEN

conocen efectos protectores de las células β pancreáticas contra los niveles altos de glucosa en el organismo y aumenta la respuesta para la producción de insulina. Otros estudios de interés han reportado que la astaxantina favorece la expresión del gen NeuroD1, cuya función se relaciona a la formación de células progenitoras neuronales, en estudios de diferenciación de células humanas pluripotentes inducidas hacia progenitores neuronales se reportó que la astaxantina potencializa la obtención de esta estirpe celular. Por otra parte, se sabe que el gen NeuroD1 es indispensable para la subsecuente expresión del gen Neurogenina3, cuya función está implicada en la función endocrina de las células pancreáticas.

Por lo cual en este trabajo se probó el efecto de la astaxantina *in vitro* en un protocolo de diferenciación de células troncales de pulpa dental obtenidas de cultivos primarios y de línea celular de médula ósea hacia células β pancreáticas productoras de insulina, con el fin de establecer procedimientos más eficientes para obtener células β . Se observó que el tratamiento con la astaxantina antes y durante la transición secundaria del proceso de diferenciación propicia que la biomasa de células productoras de insulina obtenidas sea hasta tres veces mayor que las obtenidas colocando la astaxantina en otras etapas del proceso o sin ella, además se observó que la producción de insulina obtenida por las células ofrece un rendimiento elevado.

ÍNDICE

Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Lista de abreviaturas	xi

Contenido

1. ANTECEDENTES	1
1.1. DIABETES MELLITUS	1
1.1.1. DEFINICIÓN	1
1.1.2. CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE DM.....	1
1.1.3. EPIDEMIOLOGÍA	2
1.2. TERAPIA CELULAR EN DIABETES MELLITUS.	5
1.3. PÁNCREAS Y CÉLULAS B	6
1.3.1. PÁNCREAS.....	6
1.3.2. ORGANOGÉNESIS DEL PÁNCREAS ENDÓCRINO Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE LO REGULAN.....	7
1.4. CÉLULAS TRONCALES.....	15
1.4.1. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL Y MÉDULA ÓSEA.....	16
1.5. MOLÉCULAS DE DIFERENCIACIÓN EN MODELOS <i>IN VITRO</i> PARA LA FORMACIÓN DE CÉLULAS BETA.....	19
1.5.1. ACTIVINA A	20
1.5.2. FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGF).....	22
1.5.3. CHIR99021	23
1.5.4. DORSOMORFINA	24
1.5.5. FORSKOLINA.	25
1.5.6. NICOTINAMIDA	26
1.5.7. ÁCIDO RETINOICO (AR)	27
1.5.8. NOGGINA.....	28
1.5.9. IGF Y GLP-1.	28
1.5.10. TAURINA.....	28
1.5.11. INDUCCIÓN GÉNICA DE LAS MOLÉCULAS DE DIFERENCIACIÓN.....	29
1.6. ASTAXANTINA	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. HIPÓTESIS.....	38
5. OBJETIVOS.....	39
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	39
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
• <i>Generar un procedimiento estandarizado para el aislamiento, cultivo y conservación de células troncales mesenquimales a partir de tejido pulpar dental.</i>	<i>39</i>
• <i>Generar un protocolo de diferenciación con la adición de astaxantina.....</i>	<i>39</i>
• <i>Confirmar la diferenciación y la funcionalidad de las células obtenidas.....</i>	<i>39</i>
6. METODOLOGÍA.....	40
6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	40
6.2. EN LA FIGURA 7 SE MUESTRA EL DIAGRAMA EXPERIMENTAL, DONDE SE ILUSTRA EL PROCESO LLEVADO A CABO.....	41
6.3. MATERIAL Y MÉTODOS	42

ÍNDICE

6.3.1.	LÍNEA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA	42
6.3.1.1.	CULTIVO Y PROPAGACIÓN	42
6.3.2.	OBTENCIÓN DE ÓRGANOS DENTARIOS	42
6.3.3.	OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS DE PULPA DENTAL	43
6.3.4.	CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE PULPA DENTAL OBTENIDAS	44
6.3.4.1.	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN RECEPTORES DE MEMBRANA ESPECÍFICOS DE CÉLULAS TRONCALES.	44
6.3.4.2.	POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN MULTI-LINAJE DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL	46
6.3.4.2.1.	TINCIÓN CON ROJO OLEOSO: CONFIRMACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN HACIA ADIPOCITOS.	46
6.3.4.2.2.	TINCIÓN CON AZUL ALCIANO: CONFIRMACIÓN DE CONDROBLASTOS	47
6.3.4.2.3.	TINCIÓN VON KOSSÁ: CONFIRMACIÓN DE OSTEOBLASTOS.	48
6.3.5.	PROCESO DE DIFERENCIACIÓN A CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA	48
6.3.6.	ANÁLISIS DE MARCADORES DE MEMBRANA DESPUÉS DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN.	50
6.3.7.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES	50
6.3.7.1.	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	50
6.3.7.2.	CUANTIFICACIÓN DE RNA	51
6.3.7.3.	SÍNTESIS DE CDNA.....	51
6.3.7.4.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	52
6.3.8.	ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN DE INSULINA.	53
6.3.8.1.	INSULINA INTRACELULAR.	53
6.3.8.2.	ANÁLISIS DE INSULINA LIBERADA AL MEDIO	55
6.3.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	57
7.	RESULTADOS	58
7.1.	CULTIVO Y EXPANSIÓN DE LA LÍNEA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA	58
7.2.	CRECIMIENTO CELULAR DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE LA PULPA DENTAL.	58
7.3.	CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE PULPA DENTAL.	60
7.3.1.	ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES HUMANAS (HMSC).	60
7.3.2.	POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN	62
7.4.	DIFERENCIACIÓN A CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA.	65
7.5.	ANÁLISIS GENÉTICO DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN.....	66
7.6.	EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESPECÍFICOS DE HMSC DESPUÉS DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN.....	68
7.7.	EXPRESIÓN DE INSULINA INTRACELULAR.....	69
7.8.	LIBERACIÓN DE INSULINA.....	73
8.	DISCUSIÓN	76
9.	CONCLUSIONES	85
10.	PERSPECTIVAS	86
11.	BIBLIOGRAFÍA	87
12.	ANEXOS.....	98
12.1.	PRODUCTOS ACADÉMICOS	98
12.2.	ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES PARA LA COLECTA DE LAS PIEZAS DENTALES	99
12.3.	CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE TRABAJO DEL ANÁLISIS DE RECEPTORES CARACTERÍSTICOS DE HMSC.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CRECIMIENTO DE MORTALIDAD POR DM POR CADA 100,000 HABITANTES.....	2
FIGURA 2. PROSPECTIVA DE DEFUNCIONES POR DM EN MÉXICO (1992-2020).....	3
FIGURA 3. PROYECCIONES DEL COSTO DEL TRATAMIENTO DE LA DIABETES EN NUESTRO PAÍS.....	4
FIGURA 4. UBICACIÓN DEL PÁNCREAS EN LA CAVIDAD ABDOMINAL.....	6
FIGURA 5. FACTORES TRANSCRIPCIONALES IMPORTANTES EN EL DESARROLLO DE LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA (TOMADO DE PAN & WRIGHT 2011).....	13
FIGURA 6. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ASTAXANTINA (3,3'-DIHIDROXI-B, B'-CAROTENO-4,4'-DIONA).....	32
FIGURA 7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	41
FIGURA 8. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA EN CRECIMIENTO. EL CULTIVO CORRESPONDE AL PASAJE 3 DE LA LÍNEA CELULAR, MUESTRAN MORFOLOGÍA FIBROBLASTOIDE Y SON ADHERENTES AL PLÁSTICO. LAS FOTOGRAFÍAS FUERON TOMADAS CON EL AUMENTO DE 40X.....	58
FIGURA 9. FOTOGRAFÍAS REPRESENTATIVAS DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE PULPA DENTAL. A) CÉLULAS EN CRECIMIENTO CON AMPLIACIÓN 10X. B) CÉLULAS EN CULTIVO PRIMARIO CON AMPLIACIÓN DE 40X.....	59
FIGURA 10. ANÁLISIS MORFOLÓGICO. LAS CÉLULAS DE PULPA DENTAL PRESENTAN UN TAMAÑO SIMILAR A LAS CÉLULAS TRONCALES DE MÉDULA ÓSEA, LA GRANULARIDAD O COMPLEJIDAD CELULAR SE APRECIA DE FORMA SIMILAR A PESAR DE QUE LAS CÉLULAS DE MO PRESENTAN UNA LIGERA DISPERSIÓN.....	60
FIGURA 11. EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESPECÍFICOS DE HMSC.....	62
FIGURA 12. ADIPOCITOS.....	63
FIGURA 13. CONDROBLASTOS.....	64
FIGURA 14. OSTEÓBLASTOS.....	65
FIGURA 15. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LOS CULTIVOS DE MSC EN DIFERENCIACIÓN A CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA.....	66
FIGURA 16. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES POR RT-PCR DURANTE LAS TRES ETAPAS DE DIFERENCIACIÓN.....	67
FIGURA 17. ESQUEMA DE LA EXPRESIÓN DE GENES CARACTERÍSTICOS DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES HACIA CÉLULAS BETA.....	68
FIGURA 18. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DESPUÉS DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN.....	69
FIGURA 19. CÉLULAS DIFERENCIADAS PROVENIENTES DE PULPA DENTAL MARCADAS CON ANTI-INSULINA.....	70
FIGURA 20. CÉLULAS DIFERENCIADAS PROVENIENTES DE MÉDULA ÓSEA MARCADAS CON ANTI-INSULINA.....	71
FIGURA 21. PORCENTAJE DE POBLACIÓN DE DPSC Y MO CON INSULINA INTRACELULAR PRESENTE.....	73
FIGURA 22. CONCENTRACIONES DE INSULINA EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRINCIPALES FUNCIONES DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INDISPENSABLES PARA LA MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS BETA.	9
TABLA 2. MARCAJE CON ANTICUERPOS.	45
TABLA 3. SE DESCRIBEN LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO PARA LA DIFERENCIACIÓN.	49
TABLA 4. CONDICIONES DE RETROTRANSCRIPCIÓN PARA LA SÍNTESIS DE CDNA.	52
TABLA 5. MIX DE PCR PARA UNA REACCIÓN.	52
TABLA 6. TEMPERATURAS ÓPTIMAS.	52
TABLA 7. CONDICIONES DE LA PCR PARA EL ANÁLISIS DE LOS GENES DE INTERÉS.	52
TABLA 8. SECUENCIAS DE LOS OLIGOS UTILIZADOS.	53
TABLA 9. GRUPOS DE TRABAJO ESTABLECIDOS PARA EL ANÁLISIS DE INSULINA INTRACELULAR.	55
TABLA 10. CULTIVO DE CÉLULAS A PARTIR DE LOS ÓRGANOS DENTARIOS.	59
TABLA 11. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MEMBRANA EN LAS CÉLULAS AISLADAS DE LA PULPA DENTAL.	61
TABLA 12. TABLA COMPARATIVA DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE MEMBRANA ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN.	69
TABLA 13. EXPRESIÓN DE INSULINA INTRACELULAR EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON LA ASTAXANTINA.	72
TABLA 14. INSULINA LIBERADA AL MEDIO.	74

1. ANTECEDENTES

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Definición

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica degenerativa definida como un trastorno en la utilización de la glucosa por una falta absoluta o relativa de la insulina o por la resistencia a la acción periférica de esta hormona (ADA-OMS, 2014). La DM se describe como un síndrome metabólico caracterizado por la aparición de hiperglucemia, este padecimiento es de etiología multifactorial. Las personas que padecen esta enfermedad, tienen una mala calidad de vida e incrementan el riesgo de padecer otras afecciones, como enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal, ceguera, infarto cerebral, por mencionar las principales (ADA-OMS, 2014; Tébar M. *et al.*, 2009).

1.1.2. Clasificación y tipos de DM

La DM se ha clasificado principalmente en dos tipos:

Tipo 1: se presenta cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina, de manera que se produce una citotoxicidad debido a las altas concentraciones de glucosa en circulación, por otra parte, se genera un ataque del sistema inmune en donde las células T y los macrófagos se infiltran en los islotes de Langerhans y secretan citocinas como IL-1, IFN- γ y TNF- α (Olvera-Granados. *et al.*, 2008). El daño inicia con una hiperplasia de las células pancreáticas inducida por citocinas, puede estar mediada por los intermediarios de las especies reactivas de oxígeno, como el O₂, H₂O₂ y HO-, y por parte de las especies reactivas de nitrógeno se encuentra el NO, todo en conjunto, llevan a la célula a un estado oxidativo posteriormente se pierde la capacidad para secretar insulina, produciendo en el organismo un estado de glucotoxicidad debido a que esta alteración provoca que la célula β modifique su fenotipo por cambios en la expresión de proteínas como la del transportador GLUT2, la glicerol fosfato deshidrogenasa (GFDH) y la piruvato descarboxilasa, que se encargan de mantener el grado de especialización de las

células β . Estos procesos estimulan la activación de genes apoptóticos y proapoptóticos, de esta forma se autodestruyen las células β del individuo y es posible que se desarrolle DM tipo 1. (Olvera-Granados. *et al.*, 2008).

Por otra parte la DM tipo 2 es el tipo más frecuente, el 90-95% de diabéticos es de este tipo, se caracteriza por la presencia de resistencia a la acción periférica de la insulina, secreción de insulina insuficiente o ambas, es de etiología multifactorial con ausencia de destrucción autoinmune de células β , se han encontrado algunos factores genéticamente involucrados con el desarrollo de esta enfermedad, como la obesidad y síndromes metabólicos de compuestos hidrocarbonados (Tébar M. *et al.*, 2009).

1.1.3. Epidemiología

Debido a su constante incremento, actualmente la DM se considera un problema de salud pública a nivel mundial. México tiene la mayor contribución a la mortalidad por diabetes del continente americano y una de las más altas tasa de mortalidad del mundo (Figura 1). El Instituto Nacional de Salud Pública implementó en el 2015 un estudio representativo de la Ciudad de México en el cual encontró que 13.9% de la población adulta tiene diabetes. Nuestro país ocupa el 6^{to} lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes, el 1^{er} lugar en mortalidad en América Latina y el 3^{er} lugar en el mundo, (PNS 2013-2018; OCDE 2016).

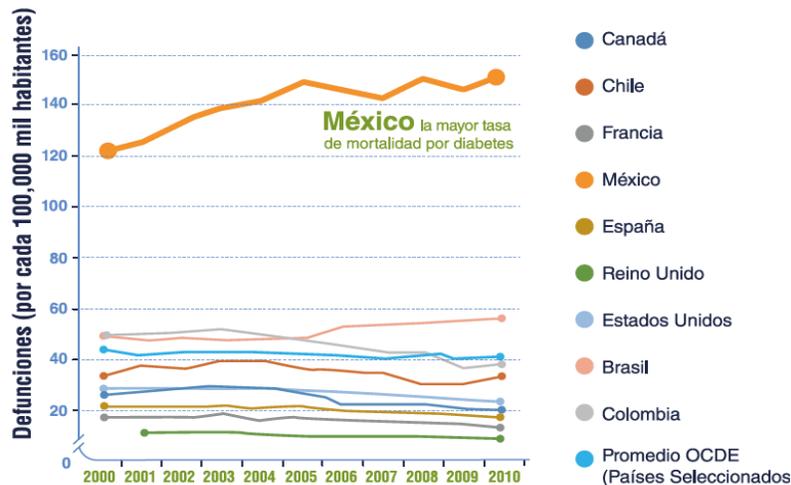


Figura 1. Crecimiento de mortalidad por DM por cada 100,000 habitantes

ANTECEDENTES

13.9% de la población adulta tiene diabetes. Nuestro país ocupa el 6^{to} lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes.

En México, la mortalidad por diabetes mellitus se ha incrementado constantemente desde 1998, llegando hasta las 94,029 defunciones en el 2014 (Figura 2), y se posicionó como la causa número uno de mortalidad a nivel nacional, según datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Historia (INEGI 2016) desde 2013. Estas cifras también indican ritmos de crecimiento muy acelerados; por ejemplo, de 1998 a 2008 la cifra de muertes por esta enfermedad casi se había duplicado (OCDE 2016).

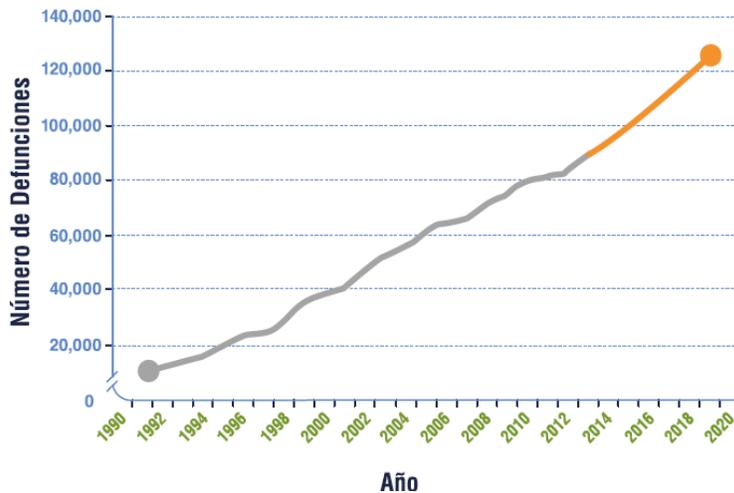


Figura 2. Prospectiva de defunciones por DM en México (1992-2020).

De mantenerse constante la tasa de crecimiento de defunciones, en el año 2020 habrá aproximadamente 126,000 mil muertes por diabetes mellitus, cifra cinco veces mayor que la registrada en 1990 (OCDE 2016).

Por otra parte, los costos económicos asociados al tratamiento de la diabetes y sus complicaciones representan una grave carga para los servicios de salud y para los pacientes, el principal costo de la diabetes recae en el tratamiento de sus complicaciones, como retinopatías, enfermedades cardiovasculares, neuropatía diabética, entre otras. De manera aproximada el gasto de bolsillo dentro del sistema nacional de salud en México es aproximadamente del 50%, por lo que padecer diabetes se puede convertir en una presión financiera en el sistema público de salud. El costo anual para los hogares mexicanos con un paciente diabético es en promedio \$80,000.00 por persona al año, por lo que se requieren

ANTECEDENTES

aproximadamente 48 mil millones de pesos para el manejo de este padecimiento (OCDE 2016).

El Instituto Mexicano para la competitividad A.C. (IMCO) calcula que a causa de la diabetes cada año se pierden un promedio de 312 horas laborales. En la figura 3 se muestran las proyecciones del costo del tratamiento de la diabetes.

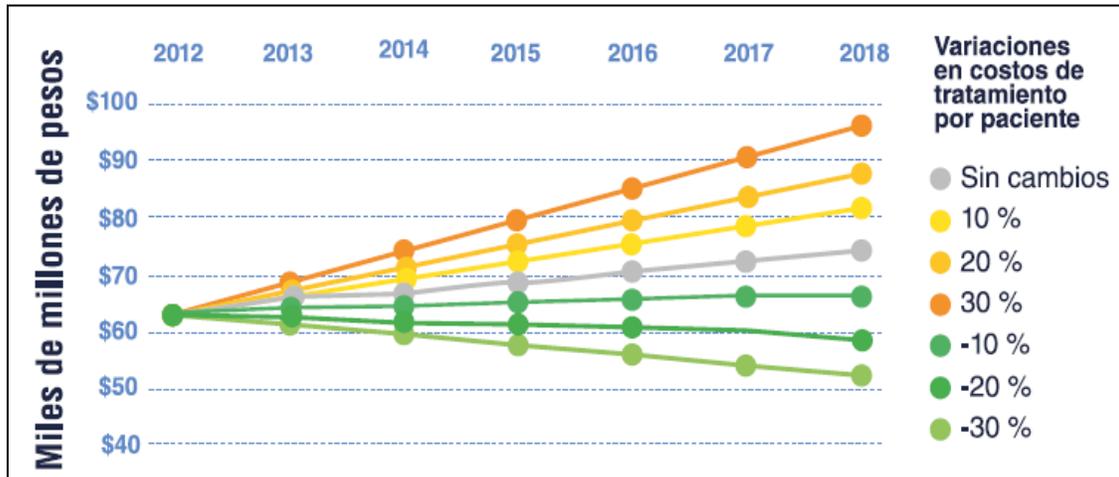


Figura 3. Proyecciones del costo del tratamiento de la diabetes en nuestro país.

El costo de los tratamientos por paciente aumenta alrededor de un 10% al año, el 90% de estos gastos recaen en el hogar de la persona que padece DM (OCDE 2016).

El IMCO realizó una prospectiva del gasto ocasionado por una persona sin seguridad social, y que, por el mal control de la diabetes, enfrenta complicaciones derivadas, esta persona tendría que pagar \$93,000 pesos al año si es diagnosticado con prediabetes, sin embargo, el costo aumenta cuando el paciente tiene diabetes tipo 2 y complicaciones, ascendiendo a casi 2 millones de pesos al año por el tratamiento requerido (OCDE 2016).

Por ello nuevas alternativas que mejoren la posibilidad de disminución de estas cifras son un blanco de investigación de interés, una de estas alternativas se basa en la terapia celular, sin embargo, para comprender en qué consiste esta posibilidad de tratamiento primeramente es indispensable conocer el funcionamiento del organismo, en específico el funcionamiento del páncreas y las

células beta, las cuales son imprescindibles para la presencia de insulina en el organismo.

1.2. Terapia celular en Diabetes mellitus.

La terapia celular es la restauración de órganos y tejidos dañados como consecuencia de lesiones traumáticas o enfermedades crónico-degenerativas mediante la utilización de células madre para el reemplazo celular y tisular, se han utilizado células pluripotentes en enfermedades cardiovasculares, Parkinson y Diabetes mellitus entre otras (Champeris S *et al.*, 2010; Mata-Miranda *et al.*, 2014).

El propósito de este tipo de terapia es reemplazar células dañadas por células funcionales. En el caso particular de la Diabetes, la generación de las células β a partir de células madre humanas *in vitro* puede ser una fuente renovable por células de reemplazo que restituyan la función normal de los tejidos u órganos de forma más eficiente que a través de terapias convencionales como son los trasplantes, las terapias farmacológicas y los tratamientos con proteínas recombinantes (Mata-Miranda *et al.*, 2014), ya que estos tratamientos no han mostrado la suficiente eficacia y rentabilidad que mejore las condiciones de salud de la población diabética (Schiesser V. y Wells M. 2014) y aunque ya se han obtenido células β *in vitro* a partir de células madre humanas, no se ha encontrado un rendimiento basto en la producción de insulina, para ser propuestas como candidatas en terapia celular (Schiesser V. y Wells M. 2014; Masthan K. *et al.*, 2013) por lo que el objetivo de los estudios de diferenciación que se han llevado a cabo ha sido identificar cómo los nuevos enfoques podrían utilizarse para mejorar el rendimiento y la funcionalidad de las células β pancreáticas obtenidas *in vitro* (Schiesser V. y Wells M. 2014).

1.3. Páncreas y Células β

1.3.1. Páncreas

El páncreas es el órgano encargado de la producción de insulina por las células beta que se encuentran en los islotes de Langerhans, por lo general cualquier clase de anomalía en la funcionalidad de éste órgano se relaciona con el desarrollo de DM. Este órgano se encuentra situado detrás del estómago en el abdomen y se inserta en el duodeno (figura 4); es una glándula mixta compuesta por tejido endocrino y exocrino.

En el exocrino se encuentran las células acinares que secretan el jugo pancreático que contiene enzimas para la descomposición de las proteínas, carbohidratos y lípidos, el jugo pancreático se transporta a través de una red de conductos que liberan el jugo en el duodeno; por otro lado el tejido endócrino está formado por grupos de células, llamadas islotes de Langerhans, que contienen cinco tipos de células: las células α (alfa) son productoras de glucagón representan el 20%, las células β (beta) productoras de insulina representan el 70%, las células δ (delta) producen somatostatina representan entre 5 a 10%, las células productoras de PP (polipéptido pancreático) y células productoras de grelina que juntas representan el 2% de la población celular. En el páncreas se encuentran aproximadamente un millón de islotes de Langerhans distribuidos por toda la glándula y rodeados por una abundante red capilar (Sastre. J *et al.*, 2005).

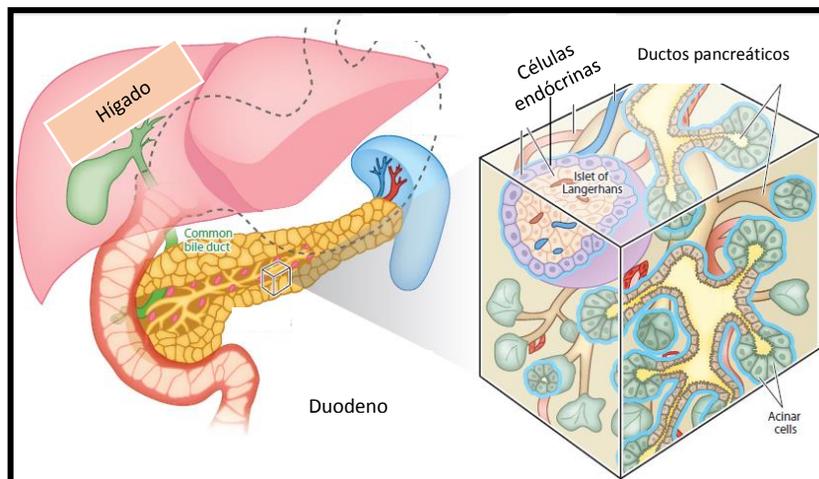


Figura 4. Ubicación del páncreas en la cavidad abdominal.

El estómago se ilustra con la línea punteada y el duodeno se muestra como una vista en corte. El páncreas está situado en la región superior y posterior izquierda del abdomen. Las células que lo conforman están clasificadas en acinares y células endócrinas (Tomado de Ping S., Wang y A. Sander. M, 2013).

Los dos tipos de tejidos se agrupan formando lóbulos macroscópicamente visibles y separados entre sí por septos de tejido conjuntivo que contienen vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Sastre. J *et al.*, 2005).

1.3.2. Organogénesis del páncreas endócrino y factores de transcripción que lo regulan.

Como ya se mencionó, las células β del páncreas se encuentran en los islotes de Langerhans dispuestas en agregados celulares endócrinos, su principal función es la secreción de la hormona insulina (D'Amour., *et al.*, 2006).

La formación del brote pancreático dorsal es regulada por señales extrínsecas a partir de células endoteliales. Las yemas pancreáticas (dorsal y ventral) se desarrollan a partir de las regiones del endodermo del intestino anterior que se encuentran en contacto directo con el endotelio de la aorta dorsal y las venas, respectivamente (D'Amour., *et al.*, 2006).

La expansión y diferenciación de los precursores endodérmicos hacia los distintos linajes pancreáticos son el resultado de una secuencia altamente regulada de señales extracelulares y de cambios en programas de expresión génica; Dichos cambios son dirigidos por una cascada de factores de transcripción cuyas activaciones e inactivaciones coordinadas permiten la progresión del precursor pluripotente hacia la célula pancreática diferenciada. (Gasa R. 2009).

Entre los primeros factores de transcripción que marcan la formación de la región dorsal y ventral son Pdx1 (homeobox pancreático y duodenal), Ptf1a (factor de transcripción específico pancreático 1a), Sox9, GATA4/6, FoxA1/2 (proteína A1 y 2 de Fox), tcf2, Onecut-1/2 (gen de un corte), Hes1, Prox1 y Mnx1; se expresan también en el dominio pre-pancreático, pero su expresión se presenta de manera tardía en todo el intestino anterior y tejido endodérmico (Gittes *et al.*, 2009, Pan &

Wright., 2011; Seymour y Sander; 2011). Estos factores de transcripción son vitales en el proceso de organogénesis pancreática, esto se demuestra en los ratones que carecen de cualquiera de estos factores muestran diversos grados de hipoplasia o agenesia del páncreas; sin embargo, todavía muestran brotes de páncreas, lo que indica que la ausencia de un solo factor no evita completamente la iniciación de la formación de este órgano (Seymour y Sander; 2011).

Las interacciones del mesénquima son importantes para el crecimiento pancreático temprano, sin embargo, recientemente se han comenzado a entender cómo las señales mesenquimales pueden controlar el crecimiento del páncreas temprano (Rai S., *et al.*, 2013). La vía mejor entendida que transmite las señales pro-proliferativas del mesénquima al epitelio es la señalización de la ruta FGF, durante la transición primaria, FGF10 es altamente expresado en el mesénquima del páncreas, mientras que su receptor FGFR2 se expresa en todo el epitelio (Seymour *et al.* 2012b). FGF10 estimula la proliferación de células progenitoras y es necesario para el crecimiento inicial de las yemas de páncreas (Baumgartner, B., *et al.*, 2014).

Poco después de la transición primaria, las yemas de páncreas incipientes aún no han adquirido la morfología macroscópica y estructural característicos del órgano maduro, ni han formado los tipos de células diferenciadas necesarias para sus funciones. En cambio, están compuestas casi en su totalidad de las células progenitoras multipotentes (Hung Ping., *et al.*, 2013).

La maduración de estas yemas es un proceso de varios pasos. Durante este tiempo, el órgano en desarrollo continúa creciendo rápidamente, al mismo tiempo, el epitelio pancreático sufre cambios estructurales dinámicos, lo que resulta en múltiples brotes salientes que forman los bordes. Estas estructuras, se caracterizan por la expresión de Ptf1a, c-Myc (protooncogén MYC) y Cpa, que están presentes en los dominios de la sección de la punta del páncreas; por el contrario, las células internas que representan el dominio del tronco se identifican por la expresión de Nkx6.1/6.2 (gen homeobox 6.1 y 6.2), Sox9, TCF2 (factor de

ANTECEDENTES

transcripción 2), Onecut-1, Prox1, Hes1, Is-1 (ISL LIM homeobox 1), Pax6, (Pax duodenal 6), Nng3 (Neurogenina 3), Glut2 (Familia de transportadores de soluto 2 miembro 2) e Ins (gen Insulina) las principales funciones de estos genes se describen en la tabla 1 (Hung Ping., *et al.*, 2013).

Tabla 1. Principales funciones de los factores de transcripción indispensables para la maduración de las células beta.

NOMBRE	FUNCIÓN
Pdx-1	La proteína codificada por este gen es un activador de la transcripción de varios genes, incluyendo la insulina, la somatostatina, la glucoquinasa, polipéptido amiloide de los islotes, y transportador de glucosa tipo 2. La proteína codificada en el núcleo está implicada en el desarrollo temprano del páncreas y juega un papel importante en regulación de la glucosa dependiente de la expresión de gen de la insulina.
Isl-1; Islet-1	Este gen codifica un miembro de la familia / homeodominio LIM de factores de transcripción. La proteína codificada se une a la región potenciadora del gen de la insulina, entre otros, y puede desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión del gen de insulina. La proteína codificada es fundamental para el desarrollo de los linajes de células pancreáticas y también puede ser necesaria para la generación de las neuronas motoras.
Pax 6	Este gen codifica una proteína que contiene un dominio de bases apareadas que se une al ADN y funcionan como un regulador de la transcripción durante las primeras etapas del desarrollo del páncreas y se limita a los subconjuntos celulares del linaje endocrino. Pax6, se puede detectar durante el desarrollo del páncreas, se expresa en todas las células endocrinas.
Ngn3	La proteína codificada por este gen es un factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico (bHLH) que participan en la neurogénesis. La proteína codificada probablemente actúa como un heterodímero con otra proteína bHLH. Los defectos en este gen son una de las causas de la malabsorción congénita 4. En el desarrollo pancreático sus niveles relativos pueden determinar si una célula progenitora adoptará la identidad endocrina.
Glut2; SLC2A2	Este gen codifica una glicoproteína de membrana integral plasmática del hígado, las células beta de los islotes, el intestino, y el epitelio renal. La proteína codificada facilitó el transporte bidireccional de glucosa. Debido a su baja afinidad por la glucosa, se ha sugerido como un sensor de glucosa. Las mutaciones en este gen están asociadas con la susceptibilidad a enfermedades, incluyendo el síndrome de Fanconi-Bickel y diabetes mellitus no insulino-dependiente (NIDDM).
Ins	Después de la eliminación del precursor del péptido señal, la proinsulina se escinde después de la traducción en tres péptidos: la cadena B y A de la cadena de péptidos, que están vinculados covalentemente a través de dos enlaces disulfuro para formar la insulina y péptido C. La unión de la insulina al receptor de insulina (INSR) estimula la captación de glucosa. Una multitud de alelos mutantes con efectos fenotípicos han sido identificados. Hay un gen lectura a través, INS-IGF2, que se solapa con este gen en la región 5 'y con el gen IGF2 en la región 3'. Resultado de <i>splicing</i> alternativo en múltiples variantes de la transcripción.

Tomado de la base de Datos NCBI; enero 2017.

Cuando los factores de transcripción endodérmicos como Pdx1 se expresan, la molécula de señalización extracelular Sonic hedgehog es reprimida, esto permite que las futuras células pancreáticas tomen un camino hacia la formación de endodermo pre pancreático y no intestinal. Mientras tanto Ptf1 se requiere para la especificación del páncreas ventral, mientras que el factor de transcripción HLXB9 (Gen Hb9 pancreático), se requiere para la especificación del páncreas dorsal.

Tanto células exocrinas y células endocrinas del páncreas se derivan de un puñado de células endodérmicas que expresan Pdx1 (Desgraz R., *et al.*, 2009) y Ptf1a, así

como Hes1, gen llamado protodiferenciador de progenitores pancreáticos (tabla 1) (Deutsch G., *et al.*, 2001). La importancia de Pdx-1 en el desarrollo pancreático ha sido confirmada en estudios recientes de linaje celular que han demostrado que todas las células pancreáticas derivan de células positivas para Pdx-1. La expresión de Pdx-1 y Hb9 decae después del día 10.5 pero vuelve a reaparecer en las células β ya diferenciadas (Gasa R. 2009).

La expresión de estos factores de transcripción lleva a cabo cambios morfológicos que marcan el inicio de una compleja secuencia de reordenamientos celulares (Villaseñor *et al.* 2010), resultando en la maduración de la estructura del órgano. La sección del tronco pancreático da lugar predominantemente a los linajes de células endocrinas y células ductales, mientras que las puntas están restringidas a un destino acinar (Deutsch G., *et al.*, 2001).

Los factores de transcripción Nkx6.1/6.2 y Pdx-1 actúan como reguladores maestros durante este proceso. Estos factores se co-expresan inicialmente en los progenitores pancreáticos, sin embargo, mantienen sus dominios o regiones de expresión las cuales se presentan totalmente durante la formación de la compartimentación de las secciones de la punta y el tronco; Nkx6.1/6.2 promueven la identidad del tronco y desvían células mesenquimales para la formación de la punta (Hung Ping *et al.*, 2013).

Mecánicamente, este proceso es iniciado por represión transcripcional entre Nkx6.1 / 6.2 y Ptf1a o Pdx-1 (Schaffer *et al.*, 2013). Se sabe que los factores de transcripción del desarrollo pueden regular diferentes procesos dependiendo del contexto celular. Los estudios genéticos han proporcionado información sobre las vías de señalización que regulan la generación de las secciones de la cabeza y el tronco; la vía de señalización de Notch juega un papel esencial en la promoción de la identidad de las células que formarán el tronco pancreático (Afelik *et al.* 2013). Mientras que las células de la punta están destinadas a convertirse en células acinares, el dominio del tronco es bipotencial y produce células ductales y células endocrinas (Kopinke *et al.* 2013, Kopp *et al.* 2011).

Después de que los dominios de la punta y el tronco del páncreas se han separado, alrededor de los 12.5 días, las células del tronco son sometidas a cambios morfogénicos para formar una red 3D de los túbulos revestidos por una sola capa de células polarizadas (Villaseñor *et al.*, 2010). Las células epiteliales forman una red de túbulos llamados conductos primitivos o cordones progenitores y es el epitelio que da la altura de las células endocrinas pancreáticas (Kopp *et al.* 2011).

Durante la transición secundaria, un subconjunto de células en los cordones progenitores inician la expresión del factor de transcripción Ngn3, que marca el inicio de la diferenciación de células endocrinas (Schwitzgebel *et al.* 2000). Mientras que las células destinadas a un cause epitelial no expresan Ngn3 y finalmente contribuyen a la formación del árbol ductal. Por lo tanto, se requiere de un control preciso de la expresión de Ngn3 ya que este es el factor clave para el equilibrio de la diferenciación endocrina frente a la decisión del destino celular ductal (Beucher *et al.* 2012).

A diferencia del desarrollo de las células ductales, la diferenciación endocrina se ha estudiado impulsado por la esperanza de que tal conocimiento pueda ayudar a

implementar una terapia celular al obtener células β de reemplazo como terapia para la diabetes.

En diversos estudios se han dilucidado factores de transcripción que también controlan el desarrollo ductal, como Sox9, HNF1B, Glis3 (Dedo de zinc de la familia GLIS 3) y Onecut-1, son necesarios para la inducción de la expresión de Ngn3 (Seymour et al. 2008a, Jiang 2011), lo que indica que las funciones de estos factores están presentes en el desarrollo de ambos linajes. Sin embargo, solamente se expresa Ngn3 en un subconjunto de las células dentro de los conductos primitivos, lo que plantea la cuestión de que su expresión se encuentra reprimida en la mayoría de las células ductales embrionarias. La evidencia bioquímica y genética sugiere que el factor de transcripción Hes1 juega un papel importante en la represión de la transcripción de Ngn3 y actúa evitando la activación generalizada de dicho factor de transcripción (Ahnfelt-Ronne *et al.* 2012).

En los progenitores endócrinos la señalización de Notch esta reprimida; al reducir la actividad de Notch, se promueve la expresión de Sox9, lo que permite la activación de Ngn3, de este modo, se lleva a cabo la activación selectiva de Ngn3 y los cordones progenitores adquieren diferentes niveles de actividad de Notch (Desgraz y Herrera 2009). Las células que expresan Ngn3, son encaminadas a formar precursores endócrinos, es decir, formarán cinco grupos de células diferentes, células beta, alfa, delta, células productoras de péptido C y células productoras de grelina (Desgraz y Herrera 2009).

Se sabe que en el desarrollo de cada tipo celular existe una competencia de precursores endócrinos para producir estos diferentes tipos de células y ésta competencia se controla temporalmente por la vía de Notch (Jiang J. 2007).

Se han realizado estudios de diferenciación *in vitro* donde se ha observado que los precursores endócrinos Ngn3+ pueden diferenciarse en células productoras de

ANTECEDENTES

hormonas, es decir, precursores endocrinos y estos son sometidos a cambios dinámicos en la expresión génica, lo que resulta en la activación de la transcripción de Ngn3 dependiente de factores como: PAX4, Arx, RFX6, NeuroD1, Pax6, Isl1, y IA2 entre otros; estos genes controlan muchos aspectos del desarrollo endocrino, incluyendo la diferenciación celular, el mantenimiento de células especializadas, y controlan la identidad celular para formar islotes pancreáticos posteriormente (Figura 5.); NeuroD1/BETA2 es una diana directa de Ngn3 y comparte con su activador la capacidad de promover el destino endocrino en ambientes permisivos (Mfopou, J. *et al.*, 2010; Millman, J. *et al.*, 2016).

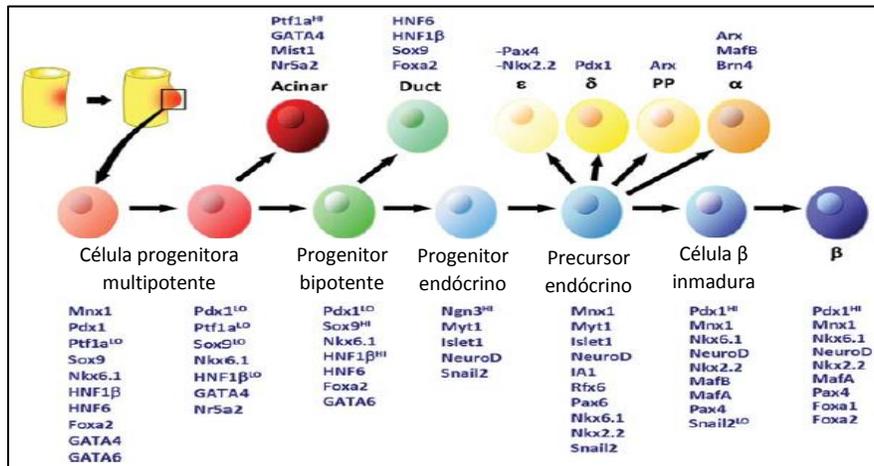


Figura 5. Factores transcripcionales importantes en el desarrollo de la célula beta pancreática (Tomado de Pan & Wright 2011).

Se muestran las transiciones de maduración de las células beta pancreáticas que se efectúan de manera natural y ordenada en el desarrollo embrionario, sin embargo, se sabe que cualquier alteración en la expresión de la cascada génica puede propiciar padecimientos crónicos.

También los factores Nkx2.2 y Nkx6.1 juegan un papel relevante en la determinación del linaje beta. Animales “knock-out” para Nkx2.2 no tienen células positivas para insulina, sin embargo, tienen células endocrinas con otros marcadores de células β y expresan la hormona grelina. La ausencia de Nkx6.1, por su parte, es la causa de que no se produzca neogénesis de células β durante la transición secundaria (Gasa R. 2009).

Las células beta maduras derivan de células que nunca expresaron glucagón, y viceversa. El conjunto de datos disponibles hasta el momento sugiere que la decisión sobre el subtipo endocrino se toma en etapas iniciales del proceso de diferenciación y antes de la expresión de hormonas. El modelo vigente establece que la acción concertada de distintos factores de transcripción, que funcionan en paralelo con Ngn3 o por debajo de la misma, es la responsable de determinación de linaje endocrino específico. Así, Pax4 y Arx son necesarios para la especificación de los linajes beta y alfa, respectivamente. La ausencia simultánea de los dos factores resulta en la pérdida total de células β y α y en el aumento de células δ (Gasa R. 2009).

El desarrollo de los linajes endocrinos especializados está dado de manera altamente regulada por la expresión de factores de transcripción que otorgan la capacidad supervivencia o estimulación de la proliferación celular durante su desarrollo, esta clase de factores de transcripción también les permiten a las células ser capaces de producir una sola hormona específica a cada tipo celular, los primeros en la cascada son: NeuroD, Is-1 INMS-1, y RFX-6. Estos genes son blancos directos de Ngn3 (Pan y Wrihgt 2011).

Por otra parte los genes de la familia Nkx (6.1 y 6.2) tienen un papel importantes ya que se ha estudiado que en ratones genoanulados para este factor de transcripción, se reduce la cantidad de células Ngn3+, por lo cual se cree que Nkx actúa antes de Ngn3, estos estudios también proponen que los Nkx también promueven la especificación de cada tipo celular, se ha postulado que Nkx6.1 afecta el número de células progenitoras endócrinas (Pan y Wrihgt 2011).

Los factores de transcripción que se activan después son denominados, factores de asignación de linaje endócrino específico, como son NKX2.2, Pax4, Arx, y Pdx1 (Pan y Wrihgt 2011).

La expresión de Pdx-1 además de su papel en la derivación inicial de las células primitivas formadoras de tejido pancreático, es también requerido para la especialización de las células β , la eliminación de este gen conduce a una disminución de la población de células β , y ayuda a promover el desarrollo en proporciones adecuadas de los distintos subtipos endócrinos (Pan y Wrihgt 2011). Por último, son necesarios los denominados factores de maduración, estos controlan aspectos posteriores a la especificación fisiológica. Estos genes incluyen la insulina, Pdx1, GLUT2, Nkx6.1, SLC30A8 (transportador de zinc) y G6pc2 (glucosa-6-fosfatasa subunidad catalítica de proteínas 2) (Hung P., *et al.*, 2013).

1.4. Células troncales

Las células madre o también llamadas troncales (SC, del inglés *stem cells*), son células autorrenovables y capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas y cuando reciben estímulos específicos pueden dividirse indefinidamente. La diferenciación de estas células puede dar como resultado una población con características morfológicas y funcionales estables (Tébar Massó *et al.*, 2009) logrando obtener células especializadas.

Las SC se han clasificado en tres grupos por su potencial de diferenciación en totipotenciales (embrionarias), pluripotenciales, y multipotenciales (adultas), dentro del grupo de células troncales mesenquimales adultas, las células provenientes de origen hematopoyéticas han sido las más estudiadas desde los años 50's, y en la actualidad se ha incursionado en la investigación sobre células troncales provenientes de otros tejidos. Las células troncales mesenquimales fueron denominadas así por provenir del estroma medular, sin embargo, aunque se han aislado de distintos tejidos como adiposo, cordón umbilical, pulpa dental, entre otros, por poseer características fenotípicas similares se han denominado dentro de este grupo (Mata-Miranda M *et al.*, 2014; Gimeno L *et al.*, 2011; González A *et al.*, 2012);

Se sabe que pueden ser utilizadas como herramientas en la investigación de nuevos fármacos o en el desarrollo de terapia celular y medicina regenerativa (Takeuchi H. *et al.*, 2014).

1.4.1. Células troncales mesenquimales de pulpa dental y médula ósea.

Las células troncales de pulpa dental y médula ósea se clasifican dentro de las células madre mesenquimales adultas (CMM), denominadas así por y por su capacidad adherente es fácil hacer una expansión en cultivo para inducir diferenciación con distintos estímulos hacia un linaje determinado (Arévalo-Romero *et al.*, 2007).

Los progenitores mesenquimales son un grupo de células madre adultas que fueron caracterizadas por primera vez por Friedenstein en 1960, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide que pueden ser utilizadas para diferenciarse a condrocitos, adipocitos, osteocitos entre otros linajes, las células aisladas fueron inicialmente denominadas como mecanocitos estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos.

En la década de los 80's varios grupos de investigación se dieron a la tarea de caracterizar las células aisladas de médula ósea capaz de originar el estroma medular, hueso y cartílago, durante esta etapa los investigadores en la biología de las células troncales mesenquimales, demostraron que las células de médula ósea contienen progenitores de fibroblastos, que podían ser trasplantados junto con las células hematopoyéticas y años más tarde, en 1987, se desarrollaron metodologías que permitían cultivar y trasplantar células mesenquimales humanas provenientes de médula ósea (Arévalo-Romero *et al.*, 2007).

Así, las células troncales de médula ósea fueron las primeras en utilizarse como terapias celulares exitosas (Rai S. *et al.*, 2015), por ejemplo, los trasplantes de medula ósea, ya que en ella se encuentran células madre hematopoyéticas;

además, la médula ósea es la principal fuente de aislamiento de CMM (Arévalo-Romero *et al.*, 2007; Pérez, J. *et al.*, 2007).

Las células troncales de pulpa dental (DPSCs por sus siglas en inglés) son células mesenquimales adultas que se caracterizan por tener alta capacidad proliferativa y plasticidad; se encuentran principalmente en las crestas y en la cámara pulpar dental, y bajo estímulos específicos, pueden diferenciarse hacia distintos tipos de células que pueden incluir adipocitos, condrocitos, neuronas y tejido vascular cardíaco entre otros (Gioventu. S *et al.*, 2012).

Las DPSCs se pueden encontrar tanto en adultos como en niños, disminuyendo en número a mayor edad del individuo; en el humano existen 20 piezas temporales y 32 permanentes de las cuales pueden aprovecharse la presencia de DPSCs minimizando los conflictos éticos que otras fuentes de células troncales pueden causar como por ejemplo las células madre embrionarias. Las DPSCs son fáciles de coleccionar, sin causar ningún efecto secundario al paciente debido a que las extracciones dentales son consideradas un procedimiento de cirugía menor en el caso de las personas adultas, mientras que en el caso de los menores las piezas dentales temporales empiezan a caerse después de los cinco años por lo que son fáciles de recolectar (Gioventu. S *et al.*, 2012).

Las células madre de pulpa dental humana se han obtenido por métodos basados en diversos experimentos e investigaciones, (Aljamie M 2016) entre ellos encontramos el reportado por Raof y colaboradores en el año 2014 (Raof, M. 2014), el aislamiento y cultivo de las DPSCs se realizó mediante disgregación enzimática del tejido, ellos reportaron que estos cultivos crecieron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 20% de suero bovino fetal (FBS) a 37°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad en la incubadora de CO₂, (Aljamie M 2016; Raof, M. 2014).

ANTECEDENTES

Por otra parte, Lin y colaboradores (Aljamie M 2016; Lin, S.L., 2015) en el mismo año reportaron otro método de aislamiento en el que las células madre de la pulpa dental humana fueron extraídas de piezas dentales, se congelan y después se almacenan a -196°C en tanque de nitrógeno líquido durante 24 h. Durante la congelación, las células se suspendieron en medio de cultivo que contenía 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), los resultados reportados sobre esta metodología fueron que cuando el medio de congelación no contenía DMSO las tasas de supervivencia de DPSCs aumentaba una vez que se descongelaban y se cultivaban nuevamente (Aljamie M 2016; Raoof, M. 2014).

Dos años atrás, Gioventù y colaboradores (Aljamie M. 2016; Gioventu S. 2012) reportaron una metodología en la que estudiaron 4 dientes humanos enteros, que criopreservaron haciendo micro canales en el diente con la ayuda de rayo láser para ser almacenados a -80°C . Este método ahorra tiempo en el aislamiento de células madre de pulpa dental antes de la crio preservación y por lo tanto reduce los costos iniciales y la carga de trabajo del procesado de las piezas dentales.

Para verificar la identidad de las células aisladas, se realizan usualmente técnicas de selección clonal, como la citometría de flujo, detectando poblaciones celulares en función de los marcadores de superficie acoplados a fluorocromos (Arévalo-Romero *et al.*, 2007).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT por sus siglas en inglés (Internacional Society Cellular Therapy) propuso desde el 2006 que las CMM deberían expresar los marcadores CD73, CD90 y CD105; el conjunto de estos marcadores es una característica de células indiferenciadas, se espera que la población de células troncales mesenquimales expresen estos marcadores al menos en un 95% y ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B, menor a un 2% (Arévalo-Romero *et al.*, 2007).

Es por esto que para la detección de DPSCs así como CMM de médula ósea pueden realizarse estudios con anticuerpos marcados con fluoresceína dirigidos contra sus antígenos de superficie; por lo tanto, se requiere la determinación de varios marcadores en las mismas, ya que suelen confundirse morfológicamente con otras células de apariencia similar; un ejemplo de ello es que se han realizado estudios donde se ha encontrado que las células madre mesenquimales derivadas de las crestas neurales o células del mesodermo forman parte de las células que contribuyen a la formación y desarrollo de células dentales, timo y células mesenquimales de la médula ósea desde la etapa fetal a la etapa adulta, por lo que se sabe que las CMM se encuentran en tejidos de diferentes orígenes, pero poseen propiedades similares en cada órgano (Pérez, J *et al.*, 2007).

Por otra parte, la ISCT menciona que las células troncales mesenquimales deben contar con el potencial de diferenciarse hacia linajes celulares específicos de las tres distintas capas germinales, mesodermo, endodermo y ectodermo, para probar la capacidad de la célula troncal aislada en cultivo primario de diferenciarse hacia osteoblastos (linaje proveniente de ectodermo), adipocitos (linaje proveniente de mesodermo) y condroblastos (linaje meso-endodérmico) y estas diferenciaciones pueden ser corroboradas a través de tinciones (Yukiya K *et al.*, 2012).

Recientemente se han encontrado marcadores adicionales que se han considerado característicos de células troncales mesenquimales puesto que se han encontrado en conjunto con una presencia superior al 95%, tales como STRO-1 y CD-44, por lo que se han incluido a la lista de características que describen el fenotipo de una célula troncal mesenquimal para su identificación (Masthan. K. *et al.*, 2013).

1.5. Moléculas de diferenciación en modelos *in vitro* para la formación de células beta.

Existen moléculas que juegan un papel importante en cada etapa de diferenciación de las células β ; se han utilizado en diversos protocolos para

provocar la diferenciación dirigida de células pluripotentes a células que sean capaces de suplir la necesidad de la producción de insulina (Shih, H., *et al.*, 2013).

Se sabe que las células troncales mesenquimales pueden transdiferenciarse hacia células beta, utilizando diversas proteínas, moléculas y factores de crecimiento entre otros, por ejemplo, pequeñas moléculas como CHIR99021 y grandes moléculas como Activina A, EGF, FGF etc. El estudio para comprender las funciones específicas de cada una de estas moléculas tienen por objetivo el obtener protocolos eficientes en la diferenciación celular; con ellos se puede lograr una diferenciación por etapas en el orden siguiente: endodermo pancreático definitivo, desarrollo de progenitores pancreáticos o endocrinos y el desarrollo de las células beta maduras, cada etapa se caracteriza por la expresión de diversos factores de transcripción, apegándose al desarrollo pancreático embrionario natural (Shih, H., *et al.*, 2013).

1.5.1. Activina A

Es una citocina no glicosilada que pertenece a la familia TGF β y esta activamente involucrada en varios procesos biológicos, incluyendo la reparación de heridas, la hematopoyesis y diferenciación (Woodruff, T.K *et al* 1995).

Debido a sus propiedades únicas, activina A juega importantes roles funcionales en diversos sistemas biológicos; estas funciones incluyen la diferenciación pancreática, mesodérmica, neuronal, eritroide y de células de la pituitaria. Se ha considerado el uso sistémico de activina A para el desarrollo pancreático, lo que implica específicamente la formación de endodermo definitivo (Totsuka *et al.*, 1988; Bilezikjian L., *et al.*, 1990).

Activina A es un homodímero de dos subunidades beta y alfa que normalmente no se expresa en la fase de gastrulación del embrión.

La función específica de la activina A se muestra en su especificación de la línea primitiva de la región anterior del meso-endodermo en una etapa inicial, cuando las células son cultivadas en presencia de Wnt3a y FGF2 (Rezania A., *et al.*, 2011).

La activina induce la expresión de señales a través del mismo complejo receptor que nodal, ésta es una proteína morfogénica ósea que se expresa en altos niveles en el nodo. Varios investigadores trataron de mejorar la producción de insulina usando activina A junto con Wnt3a, añadiendo ambas al medio de cultivo de hESCs (células troncales embrionarias humanas) y encontraron una mejor formación del estado meso-endodérmico durante la primera etapa de la diferenciación del páncreas (D'Amour *et al.*, 2006).

La función de la activina A en el protocolo de diferenciación que se llevó a cabo es promover la señalización requerida para la formación de células meso-endodérmicas (D'Amour *et al.*, 2006).

Las moléculas que aumentan la producción de insulina son buscadas mediante un continuo cribado de moléculas que puedan constituir un complemento de activina A durante la inducción de endodermo. Por otra parte, se sabe que activina A, junto con la adición de ácido retinoico, promueve la expresión del gen PDX1 en más del 70% de las células en cultivo. Otro punto de interés en esta molécula es en el desarrollo de protocolos que se han centrado en la inducción de endodermo (Jiang J *et al.*, 2007; Cai J. *et al.*, 2010).

El foco de la investigación se ha desplazado en gran medida al desarrollo de un protocolo altamente eficiente y escalonado para dirigir la diferenciación de páncreas utilizando una combinación de activina A y algunas otras moléculas para inducir la formación endodermo definitivo. La exposición sostenida de las SC a altos niveles de activina A induce la formación endodermo (Zhang D., *et al.*, 2009).

Se ha concluido que la activina A juega un papel importante en la formación de endodermo y será útil para la ingeniería de células troncales (Norrman K *et al.*, 2013).

1.5.2. Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

FGF regula la diferenciación, la migración y la promoción de la proliferación durante el desarrollo embrionario (Böttcher R. *et al.*, 2005). La concentración óptima de FGF, combinada con la de otras moléculas, no sólo conduce a la diferenciación, también aumenta el número de células troncales que se diferencian a células β (Ornitz *et al.*, 1996).

FGF promueve una relación estrecha entre el desarrollo del páncreas y otros órganos, como el hígado, tiroides y pulmón. Las señales de FGF desde el mesodermo cardíaco a la raíz ventral promueven el crecimiento del hígado, mientras que para la activación del destino pancreático en etapas posteriores a la formación de células meso endodérmicas pancreáticas es necesario la ausencia de FGF-2. Para lograr la especialización de los progenitores pre pancreáticos, el efecto de FGF sólo es insuficiente, pero la adición de una concentración óptima de FGF junto con un inhibidor del desarrollo hepático puede ofrecer resultados en la diferenciación del páncreas. Sin embargo, aunque FGF juega un papel vital en la formación de páncreas, la función de la vía de señalización no se entiende completamente. Existen dieciocho FGFs diferentes que se expresan e influyen los diversos factores de crecimiento implicados en la regulación del crecimiento de la célula pancreática (Hart A. *et al.*, 2003; Yamaoka T *et al.*, 2002).

La falta de FGFs en el medio de cultivo afecta fuertemente la diferenciación en el tejido pancreático de las células troncales. La expresión del factor de transcripción PDX1 disminuye cuando las vías de señalización de FGFR y MAPK son inhibidas (Angelis, D., *et al* 1999; Hart A., *et al.*, 2003).

FGF2 regula la especificación de células pluripotentes embrionarias derivadas de diferentes linajes del intestino anterior en una concentración dependiente de la expresión de esta molécula y de forma temporal. La especificación del endodermo del intestino medio se completa durante la diferenciación de órganos en niveles altos de FGF2. A bajas concentraciones de FGF2, la formación del hígado se promueve, mientras que, a concentraciones más altas, FGF2 reprime la expresión PDX1 y promueve la formación de pulmón. Por otro lado, la diferenciación de páncreas es promovida sólo por la adición de niveles óptimos de FGF. En ausencia de la señalización de FGFR, la expresión de PDX1 es drásticamente afectada (Arman E., *et al.*, 1998).

Los niveles intermedios de FGF pueden impulsar la expresión del factor de transcripción tales como PDX1 y Nkx6.1 (Chiang M., *et al.*, 2003).

El FGF10 tiene un efecto significativo sobre la diferenciación de las MSC en páncreas. Por lo que se ha concluido que las células deben exponerse a concentraciones adecuadas de FGF para obtener buenos resultados en la diferenciación (Norgaard G., *et al.*, 2003; Nakanishi, M., & Hamazaki., 2007).

1.5.3. CHIR99021

Es un arilimidazol eficaz inhibidor de la GSK-3 β (Glucógeno sintasa quinasa 3 β). En pacientes diabéticos reduce rápidamente los niveles de glucosa en sangre. Por otra parte, en modelos de roedores se ha observado que mejora el transporte de glucosa, así como propiciar la activación en el músculo esquelético resistente a la insulina de ratas diabéticas tipo 2 (Kramer T. *et al.*, 2012).

La inhibición de GSK-3 también promueve la auto-renovación de las células madre tanto de ratón como humanas. La autorrenovación es favorecida por la inhibición de GSK-3 ya que se ha reportado que probablemente regula vías como Wnt / β -catenina o PI-3K, al utilizar CHIR99021 se estimula la auto-renovación de células madre. Al mismo tiempo, la β -catenina aumenta su estabilidad por la inhibición de

la GSK-3, y refuerza la pluripotencia de las células a través de un mecanismo que aún debe dilucidarse (Kramer T. *et al.*, 2012).

En líneas de células madre embrionarias de ratón se ha reportado que CHIR99021 estimula la auto-renovación de las células a través de la estimulación de la expresión de múltiples factores río abajo tales como b-catenina y c-Myc, aunque estos datos no excluyen la posibilidad de que otras vías de señalización puedan estar contribuyendo a la auto-renovación de estas células (Ye S., *et al.*, 2012).

1.5.4. Dorsomorfina

La dorsomorfina se ha reconocido por su potencial para inducir la dorsalización en embriones del pez cebra, así como para inhibir las Smad, éstas son proteínas que constituyen funciones a nivel celular como segundos mensajeros propagando señales intracelulares que se traducen a señales extracelulares con la participación de ligandos del factor de crecimiento transformante dirigiéndose a los receptores de BMP tipo I ALK1, -2, -3 y -6 (Horbelt D. *et al.*, 2015).

La molécula dorsomorfina contiene en su estructura en grupo central de pirazolo-pirimidina. Es un promotor eficaz en la miogénesis funcional llevada a cabo *in vitro* en células C2C12 y células de mioblastos esqueléticos humanos (Horbelt D. *et al.*, 2015).

Se sabe que en la diferenciación de células primaria de mioblastos de humano un pretratamiento con dorsomorfina en una dosis de 0.5µM bloquea eficazmente las Smad2/3 inducida por la fosforilación de GDF8 (factor de crecimiento y diferenciación- 8). La dorsomorfina inhibe selectivamente la vía de las BMP's en los receptores de tipo I ALK2, ALK3 y ALK6 y por lo tanto bloquea SMAD1 / 5/8 mediada por BMP (Yu, P., *et al.*, 2009).

Fosforilación, transcripción génica diana y diferenciación osteogénica son los efectos de la dorsomorfina es incluso más potente que el de moléculas utilizadas como bloqueadores de las Smad, así como SB431542 (Horbelt D., *et al.*, 2015).

En la diferenciación de células madre a células beta es importante el uso de bloqueadores de las Smad para guiar a la célula a la formación de endodermo definitivo de tipo pancreático, de no bloquearse estas vías las células pueden formar linajes ectodérmicos y tubo intestinal primitivo.

1.5.5. Forskolina.

La forskolina (FSK) es un activador de la adenilato ciclasa, inhibe, en sistemas de expresión heterólogos, canales de potasio (K⁺) independientemente de la síntesis de adenosin monofosfato (AMPc). Este último se sabe que se ve incrementado por la acción de la adenilato ciclasa, siendo un segundo mensajero por excelencia en la señalización intracelular y en la modulación de procesos fisiológicos (Seamon, K. 1983).

Los canales de K⁺ son parte fundamental en la repolarización de potenciales de acción en sistemas excitables y el bloqueo de estos canales iónicos pueden ocasionar aumento o decremento de la excitabilidad celular, esto se traduciría en un aumento o disminución en el número de potenciales de acción generados por un estímulo dado, es decir, en cantidades de estímulos dados para provocar la actividad de una célula funcional según su especialización (Seamon, K. 1981).

La FSK puede activar la adenilato ciclasa directamente sin interferir con receptores hormonales o proteínas reguladoras de nucleótidos de guanina, esto lo convierte en un agente único ya que la activación que propicia es rápida y reversible, puesto que también tiene la capacidad de activar la adenilato ciclasa en células intactas, es decir, sin dañar membranas, dando lugar a aumentos de la actividad intracelular (Seamon, K. 1981).

La función de la FSK en la diferenciación de células madre a células beta es propiciar la excitabilidad de la célula a los sistemas de potencial de membrana para la adquisición de la capacidad de excreción de hormonas al exterior de la célula, puesto que el intercambio de iones es un requisito esencial para que la célula beta excrete gránulos de insulina (Seamon, K., 1981).

1.5.6. Nicotinamida

Los efectos de la nicotinamida a diferentes dosis se han estudiado en células pancreáticas endócrinas de feto humano y de adulto, se ha reportado que el tratamiento con nicotinamida a 10mM da lugar a generar una carga al triple del contenido de insulina contenida en las células. Esto se asoció con el desarrollo de células ft-1 positivas, es decir, células en diferenciación destinadas a la formación de células de tipo endócrinas (Otonkoski, T., 1993).

Se ha informado que las dosis medias-máximas con efectos mitogénicos son de 5 a 10 mM, respectivamente. Se han tratado con nicotinamida células en diferenciación para la formación de Islotes y se ha observado que las células responden a la estimulación con glucosa en un aumento bifásico de la liberación de insulina mientras que las células control no respondían a la glucosa (Otonkoski, T., 1993; Schwitzgebel, V., et al., 2000).

Estos reportes indican que la nicotinamida induce la diferenciación y maduración de las células de los islotes pancreáticos fetales (Otonkoski, T., 1993; Schwitzgebel, V., et al., 2000).

Por otra parte, se sabe que el tratamiento *in vivo* con nicotinamida previene el desarrollo de diabetes en animales de experimentación después de la administración de estreptozotocina y aloxano.

Este efecto se ha atribuido a la inhibición de la enzima nuclear Poli (ADP-ribosa) sintetasa que, si se activa durante la reparación del ADN, podría conducir a una disminución crítica en el nivel de NAD de las células; sin embargo, otros mecanismos que también propicia la nicotinamida son: la eliminación de radicales de oxígeno libres y la Inhibición de la expresión de antígeno de clase II de MHC en las células de los islotes (Otonkoski, T., 1993).

Se ha sugerido también que la nicotinamida posee un efecto estimulador sobre la regeneración de los islotes. Estas observaciones han promovido estudios clínicos prospectivos que están actualmente en curso (Huotari, M et al., 1998).

1.5.7. Ácido retinoico (AR)

Los retinoides juegan un importante papel como reguladores fisiológicos de un gran número de procesos biológicos, como desarrollo embrionario, visión, reproducción, diferenciación, proliferación y apoptosis.

El RA produce una parada de la proliferación en la fase G1 del ciclo celular. La detención del crecimiento es debida a un incremento de los niveles de p27 y una inhibición de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Lane, M. y Biley S., 2005).

Los heterómeros RAR-RXR en presencia de ácido retinoico, parece que reprimen la actividad de AP-1 (Jun/Fos) Fos y Jun son proteínas del componente AP-1 que a niveles elevados regulan negativamente la señal de los retinoides, esto implica que las células activen cambios de fenotipo y así comiencen un proceso de diferenciación. AP-1 regula gran cantidad de genes que aumentan la proliferación celular. Por el contrario, los retinoides generalmente inhiben la proliferación celular e inducen la diferenciación. Por tanto, se piensa que la interacción entre AP-1 y RAR-RXR provoca en las células un cambio de fenotipo proliferativo a diferenciado (Altucci 2001).

Otra conexión entre receptores nucleares y otras rutas de señalización se produce por la fosforilación de los propios receptores. De este modo múltiples cinasas activadas por señales extracelulares como las MAPKs, afectan la actividad de ciertos receptores nucleares y se desencadenan cascadas de señalización que beneficie la diferenciación celular (Masi, S 2016).

1.5.8. Noggina.

La noggina es una proteína secretada por la nodal, actúa como un inhibidor de las BMPs a su receptor. El papel de la noggina en la diferenciación aún es un objeto de estudio en humanos (Rifas, L. 2007).

La inhibición de las BMP's por noggina promueve el desarrollo pancreático en una etapa posterior de la diferenciación del endodermo pancreático. La expresión de noggina junto con FGF y ácido retinoico promueve la inducción de PDX1 y otros factores de transcripción, tales como FOXA2, HNF6 y SOX9.

La adición de noggina promueve la formación del páncreas porque suprime la expresión de factores de transcripción que dan origen a la formación del hígado (S. Kumar, S. 2014).

1.5.9. IGF y GLP-1.

IGF, así como GLP-1 entre otros factores de crecimiento, son factores importantes utilizados en el medio de diferenciación de células β . Se sabe que promueven significativamente la expansión de progenitores pancreáticos aumentando el número de células positivas a PDX1 hasta tres veces más.

Algunos investigadores optan por utilizar combinaciones de factores de crecimiento; por ejemplo, HGF o EGF sólo, otros casos usan EGF más IGF, y IGF con HGF; puesto que estos factores estimulan o promueven la diferenciación de células β durante la formación de progenitores pancreáticos (Kumar, S. 2014).

1.5.10. Taurina

La taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico) es un aminoácido que se expresa durante el desarrollo de los recién nacidos, especialmente en el cerebro, conforme el desarrollo progresa, los niveles disminuyen. Se sabe que, en modelos experimentales con ratones, la taurina altera el desarrollo de los islotes, además la administración de taurina durante el desarrollo temprano en el ratón provoca un

aumento en el número y tamaño de los islotes pancreáticos, sin afectar la porción exocrina del órgano, cuando se estudió las hormonas insulina, glucagón, y la somatostatina en el páncreas de estos ratones, se encontró un aumento significativo en los niveles de las tres (L'Amoreaux, W., et al., 2010).

El proceso bioquímico por el cual la taurina ejerce sus funciones a menudo no es bien conocido, existe una larga lista de enfermedades ligadas a una deficiencia de taurina o a algún defecto en las vías de señalización en las que participa. Un ejemplo es la diabetes mellitus, la taurina desempeña un papel importante en el proceso de la superación de la resistencia a la insulina y otros factores de riesgo en el caso de modelos murinos diabéticos.

Por otra parte, se ha demostrado que la administración de taurina previene la microangiopatía inducida por glucosa alta, es decir, la apoptosis de células endoteliales vasculares y en ratas alimentadas con fructosa, se ha encontrado que restaura las actividades enzimáticas metabolizadoras de glucosa y mejora la sensibilidad a la insulina modificando los post-receptores de la acción de la insulina (Ripps, H., & Shen, W.2012).

1.5.11. Inducción génica de las moléculas de diferenciación.

El descubrimiento de las señales necesarias para la formación del páncreas de manera normal ha permitido encontrar aplicaciones prácticas para el desarrollo de protocolos de diferenciación *in vitro* dirigidos al uso de células troncales, en los cuales se utilizan factores de inducción como RA (ácido retinoico), inhibidores de Shh (Sonic hedgehog) y BMP (Proteínas morfogénicas óseas) para inducir la identidad de páncreas *in vitro* (D'Amour., et al., 2006). La identificación de estos factores y de las relaciones existentes entre ellos es indispensable para llegar a comprender los procesos que culminan en la formación de las células del islote

La notocorda es una columna de células que se forma a partir del nódulo primitivo, ésta ejerce una función inductora para la formación del sistema nervioso central, emite señales para la formación de endodermo definitivo, entre otras, emite señales que reprimen la expresión de Sonic Hedgehog (Shh) en el endodermo

pre-pancreático dorsal, por lo cual es importante en la formación de las células β , así constituye un pre-requisito para la expresión de Pdx-1, el cual es un marcador específico de los progenitores endócrinos pancreáticos con los que se inicia la formación de las células beta (Olvera-Granados *et al.*, 2008; Nostro M. *et al.*, 2015).

La activina-b perteneciente a la familia de TGF β (factor de crecimiento transformante beta) y el FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) son dos de las moléculas secretadas por la notocorda y mediadoras de dicho efecto, además de colaborar en la ruta de señalización para la expresión de los factores que guían la correcta formación del páncreas como SOX-17, FOXA-2 y CXCR4 (Olvera-Granados *et al.*, 2008a).

Se han realizado estudios *in vitro* con células humanas pluripotentes inducidas expuestas a Activina A (que es una molécula análoga a la activina-b) y se ha reportado que se obtiene un efecto potenciador en la expresión de los marcadores pancreáticos SOX-17 y FOXA-2 ya que se reporta que el 37.3 \pm 8.5% del total de las células los expresaron, pero al combinar la Activina A con el factor Wnt3 se incrementó dicho valor hasta un 59.7 \pm 8.6% en la expresión de los marcadores genéticos celulares pancreáticos (Takeuchi H., *et al.*, 2014; Kunisada Y., *et al.*, 2012).

Continuando con la formación del páncreas, una vez iniciada la formación de los primordios pancreáticos, la proliferación y morfogénesis del epitelio pancreático depende de señales procedentes del mesénquima circundante, estas señales son determinantes para establecer la proporción de tejido exocrino y endocrino del páncreas (Bouwens L *et al.*, 2005).

Cuando se activa Pdx-1, regula junto con el factor de crecimiento fibroblástico la sensibilidad a la glucosa, expresando el transportador Glut2 y los procesos de conversión de la proinsulina; estos procesos pueden ser estimulados mediante la

aplicación de factores como CHIR99021 el cual es un glucógeno-sintasa cinasa (GSK3-b) que actúan de forma específica promoviendo la expresión de Pdx-1 (Takeuchi H. *et al.*, 2014).

La expresión del transportador Glut2 va aumentando después del nacimiento, contrariamente con las células ductales, en donde disminuye. Pdx-1 promueve la diferenciación de las células madre embrionarias humanas (CMEH) hacia células endocrinas y exocrinas bajo el control del factor Foxa2 (Olvera-Granados *et al.*, 2008a; Bouwens L. 2005).

Pdx-1 se une al promotor de insulina junto con los factores de transcripción Pax4 y Nkx2.2, permitiendo así la expresión de insulina expresando Pdx-11, se ha reportado que la estimulación de las células madre pluripotentes con Noggin o dorsomorfina, que son inhibidores de la proteína morfogénica ósea (BMP), potencializan la señalización junto con el ácido retinoico y factor de crecimiento de fibroblastos FGF-10 e inducen a las células a expresar Pdx-11 en un 5.1% más, a partir del endodermo definitivo formado (Kunisada Y. *et al.*, 2012).

La combinación de forskolina, dexametasona, Alk5 inhibidor II y nicotinamida, aumentan la expresión de INS, GCG y marcadores endocrinos pancreáticos necesarios para que las células beta produzcan insulina, incluyendo Ngn3, NKX2.2, PAX4 y NeuroD1, factores que culminan con la formación de las células beta pancreáticas en la cascada de señalización (Takeuchi H. *et al.*, 2014).

1.6. Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β' -caroteno-4,4'-diona) es un carotenoide xantófilo, contenido en *Haematococcus pluvialis*, *Zofingiensis* spp, *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Phaffia rhodozyma*, se acumula hasta el 3,8% en el peso seco en *H. pluvialis* (Ranga Rao *et al.*, 2014).

ANTECEDENTES

Este carotenoide tiene una estructura molecular con presencia de grupos hidroxilos y ceto (Figura. 6) en donde los restos de cada anillo inona son los responsables de su actividad antioxidante, su estructura molecular le permite permanecer tanto dentro como fuera de las membranas celulares, en forma de monodíéster puede aumentar la actividad biológica para ser absorbida fácilmente; además previene la oxidación lipídica y actúa como antiinflamatorio, tiene propiedades antitumorales, disminuye la mutagénesis y la carcinogénesis mediante la inhibición del daño oxidativo a las células (Ranga Rao *et al.*, 2014).

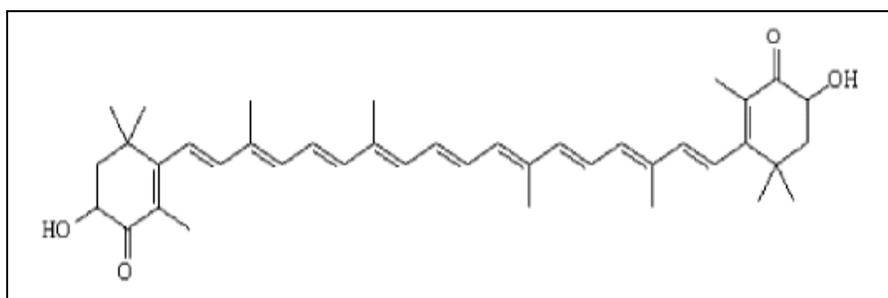


Figura 6. Estructura molecular de la astaxantina (3,3'-dihidroxi-β, β'-caroteno-4,4'-diona).

Investigaciones con modelos animales han comprobado que la astaxantina mejora la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa en una dieta con una alta cantidad de grasa y fructosa.

El aumento a la sensibilidad a la insulina está causado por la reducción del estrés oxidativo y la inflamación, pero también por medio de la activación de IRS, P13K, PKB (sustratos del receptor de insulina, fosfatidilinositol 3-quinasa, proteínas quinasa), la ruta de señalización del hígado y los músculos estriados (Ranga Rao *et al.*, 2014).

El uso de suplementos con astaxantina disminuyen el riesgo de que la resistencia a la insulina conduzca a la Diabetes mellitus tipo II gracias a su alto potencial antioxidante ya que protege las células beta del páncreas del daño causado por el estrés oxidativo y la inflamación causada por el alto nivel de glucosa a consecuencia de la resistencia a la insulina, además de proteger a las nefronas de los riñones del daño producido por la glucosa, se ha reportado que las dosis

administradas en humanos van desde 2 a 40 mg de astaxantina (Bhuvanewari S 2012).

En ratones db/db diabéticos por inducción con estreptozotocina se reportó que la astaxantina actuaba protegiendo a las células β pancreáticas contra la toxicidad del alto contenido de glucosa en plasma (Bhuvanewari S., 2014).

Otros estudios de interés hacen referencia a la utilidad de astaxantina como potenciador en el incremento de la proliferación de progenitores neuronales obtenidos a partir de células madre pluripotentes adultas, se reportó que una dosis de 10 ng/mL induce a los progenitores neurales a proliferar en una expansión casi por lo doble que el índice observado en los progenitores neurales que no habían sido estimulados con astaxantina, se observó que la astaxantina induce la expresión del gen NeuroD (Jeon-Hwan K *et al.*, 2010).

Por otra parte, en estudios del desarrollo embriológico pancreático, se ha reportado que el gen NeuroD en el caso del desarrollo de las células beta pancreáticas es una diana de Ngn3 (Uchiyama, K., *et al.*, 2002), por lo que inferimos que la expresión de éste podría beneficiar el desarrollo de células beta pancreáticas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se estima que 8.2% de la población mexicana padece DM, significa que existen de cinco a seis millones de personas con DM en nuestro país (ADA 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que esta enfermedad se convierta en la séptima causa mundial de muerte para el año 2030, además está situada dentro de las principales causas de hospitalización y enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas, por tal es considerada una enfermedad prioritaria en el plan nacional de salud (INEGI 2013; PNS 2013-2018).

Aunque existen terapias alternativas para controlar la enfermedad, como la administración de insulina exógena, así como el trasplante total de páncreas en conjunto con el de riñón, se requiere de donadores compatibles, cirugía mayor y hospitalización prolongada del paciente, por lo cual en muchos casos no es posible encontrar en estas terapias alternativas, la capacidad de curar esta enfermedad.

Es por ello que se ha generado gran interés en la terapia celular con la búsqueda de substitutos de células productoras de insulina; sin embargo no se han encontrado protocolos con eficiencia suficiente en la obtención de células β funcionales; por otra parte se sabe que la astaxantina es un carotenoide con alto potencial antioxidante, tiene la capacidad de prevenir la oxidación lipídica de las membranas celulares, se ha reportado que tiene actividad hepatoprotectora, inmunomoduladora, antiinflamatoria, anticancerígena y antidiabética, además, se conocen efectos protectores de las células beta pancreáticas contra los niveles altos de glucosa en el organismo y aumenta la respuesta para la producción de insulina, se sabe que la astaxantina promueve la expresión de genes que participan en la diferenciación de linajes neuronales como Ngn3 y Neuro D, genes de interés en este trabajo debido a su participación en la maduración de linajes endócrinos pancreáticos. Por todo lo descrito anteriormente, en este trabajo se

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

pretende probar el efecto de la astaxantina *in vitro* como factor de estimulación en el proceso de diferenciación de células troncales de pulpa dental obtenidas de cultivos primarios y de línea celular de médula ósea hacia células β pancreáticas productoras de insulina, y así establecer protocolos estandarizados que permitan obtener células β en la biomasa suficiente.

3. JUSTIFICACIÓN

La astaxantina es un compuesto con alta actividad antioxidante, con la capacidad de inducir genes que participan en la diferenciación de células de tipo neuronales, tales como Ngn3 y NeuroD, estos genes también participan en la cascada de expresión hacia la formación de células pancreáticas endócrinas, por lo que a través del proceso de diferenciación propiciado por el diseño de un protocolo de diferenciación de células troncales mesenquimales a productoras de insulina se pretende incorporar la astaxantina para favorecer la expresión de insulina debido al efecto sobre la inducción génica antes mencionada y su alto potencial antioxidante.

La incorporación de la astaxantina *in vitro* en el protocolo diseñado para la diferenciación hacia células productoras de insulina surge como una alternativa en la búsqueda y evaluación de nuevas moléculas que pudieran ampliar la posibilidad de obtener un mayor rendimiento en la producción de insulina de las células obtenidas por diferenciación celular *in vitro* con la finalidad futura de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el desarrollo de terapia de reemplazo celular con prospectivas de aplicación en el caso de la diabetes mellitus.

Puesto que la tasa de personas con DM crece aceleradamente en nuestro país posicionándose como tercer lugar a nivel mundial en número de pacientes con este padecimiento y siendo la DM una de las primeras causas de muerte, resulta apremiante la búsqueda e investigación de moléculas y terapias que ofrezcan un control sobre esta enfermedad.

Sin embargo, hasta el momento no existe evidencia científica que demuestre el efecto que la astaxantina pudiera tener sobre la producción de insulina *in vitro* u obtención de biomasa celular funcional, es decir, la obtención de células β que, al recibir un estímulo de glucosa, cuenten con la capacidad de excretar insulina funcional.

JUSTIFICACIÓN

Por lo que, en el presente trabajo, se evaluó el protocolo de diferenciación diseñado y el efecto de la astaxantina sobre el mismo, partiendo de células troncales mesenquimales provenientes de pulpa dental y de médula ósea hacia la diferenciación a células productoras de insulina.

4. HIPÓTESIS

La astaxantina tiene efecto como factor de estimulación en el proceso de diferenciación de células troncales hacia células β pancreáticas productoras de insulina.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el efecto de la astaxantina en un protocolo de diferenciación de células troncales a β pancreáticas productoras de insulina.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar un procedimiento estandarizado para el aislamiento, cultivo y conservación de células troncales mesenquimales a partir de tejido pulpar dental.
- Generar un protocolo de diferenciación con la adición de astaxantina.
- Confirmar la diferenciación y la funcionalidad de las células obtenidas.

6. METODOLOGÍA

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

Experimental

Universo de estudio

Células troncales mesenquimales de pulpa dental y de médula ósea diferenciadas a células productoras de insulina.

Variables

Independientes:

- Tratamiento por etapas con las moléculas de diferenciación sin la astaxantina
- Tratamiento con astaxantina en la etapa 1 de la diferenciación.
- Tratamiento con astaxantina en la etapa 2 de la diferenciación.
- Tratamiento con astaxantina en pre-tratamiento y durante la etapa 2.

Dependientes:

- Expresión de los genes característicos de cada etapa.
- Producción de insulina intracelular.
- Excreción de insulina al medio.

Aspectos éticos y legales.

Para la colecta de órganos dentarios se llevó a cabo el procedimiento de la Ley General de Salud. El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Civil Dr. Juan I. Menchaca, además del comité de investigación, se anexó un comité de cirugía; el muestreo se realizó bajo consentimiento informado de los pacientes.

6.2. En la figura 7 se muestra el diagrama experimental, donde se ilustra el proceso llevado a cabo.

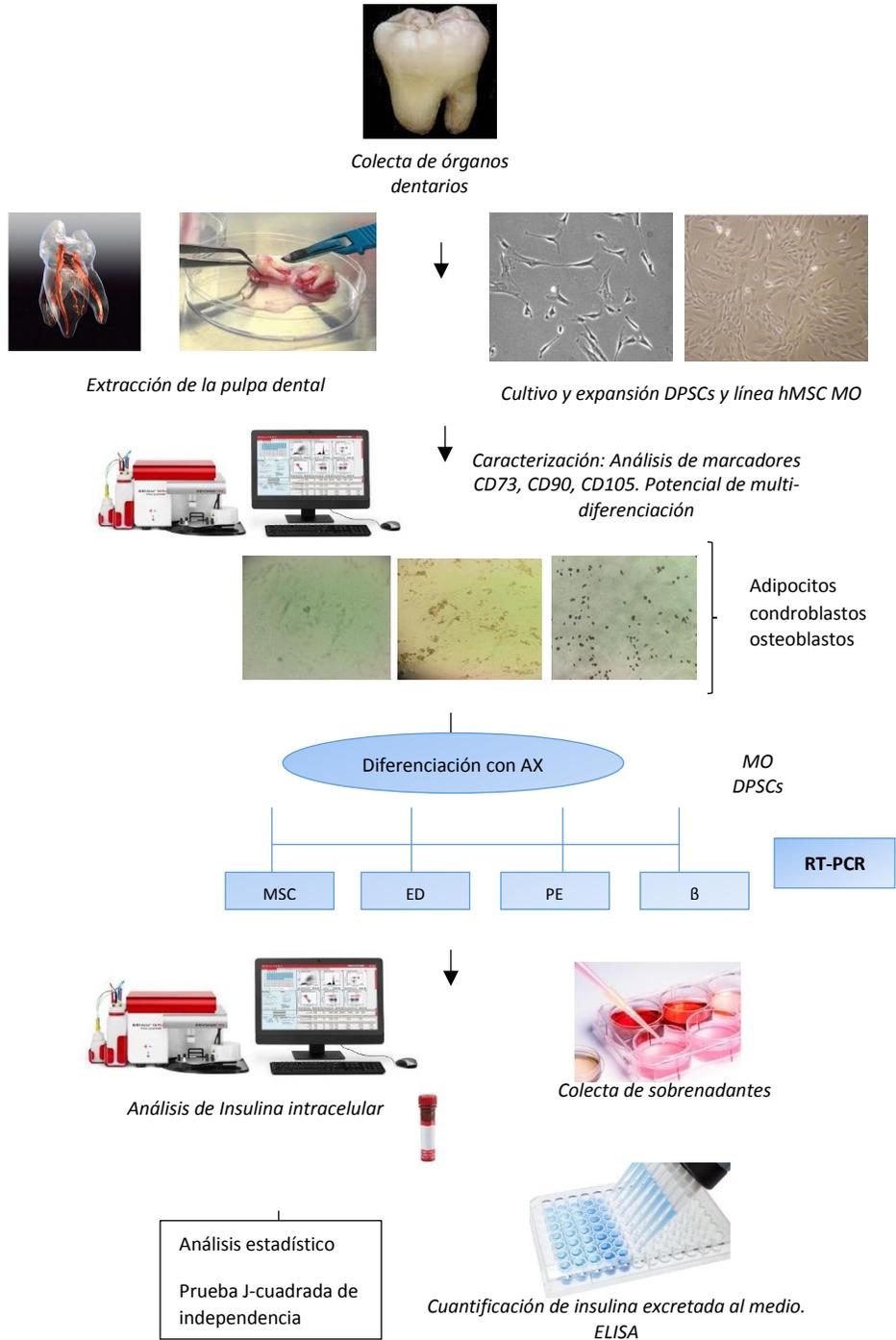


Figura 7. Diagrama experimental.

El proceso comienza con la colecta de órganos dentarios, la generación de protocolos de cultivo y aislamiento de DPSC, posteriormente los procesos de diferenciación y finalmente la confirmación de la identidad y funcionalidad de las células.

6.3. MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1. Línea de células troncales mesenquimales de médula ósea

Se utilizaron células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea de la casa ATCC (PCS-500-012 Lot. 63208778) correspondientes a un masculino caucásico de 24 años. Su morfología es similar a la de los fibroblastos y son células adherentes al plástico, el certificado de calidad de análisis de marcadores característicos está garantizado hasta el pase 10.

6.3.1.1. Cultivo y propagación

Se partió de un vial de células de médula ósea congeladas. Las células se sembraron en frascos de cultivo con medio recomendado por la misma casa comercial (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium, ATCC PCS-500-03 -plus Mesenchymal Stem Cell Growth Kit for Bone Marrow-derived MSCs ATCC PCS-500-04). El cultivo se incubó a una temperatura constante de 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% con humedad relativa. Cuando el cultivo llegó a una confluencia entre el 70 a 80%, las células se desprendieron con Tripsina-EDTA al 0.005% (ATCC PCS -999-002) y se resembraron en nuevas botellas 5,000 células por cm², hasta lograr una expansión de la línea hasta el pase 4.

Las células se criopreservaron con medio basal recomendado con 7% DMSO (ATCC-4-X) y se almacenaron en tanque con nitrógeno líquido.

6.3.2. Obtención de órganos dentarios.

Las piezas dentales fueron obtenidas por donación bajo consentimiento informado de los pacientes del área de cirugía maxilofacial del OPD (*Organismo Público Descentralizado*), Dr. Juan I. Menchaca, en donde se realizó la extracción de las piezas dentales, por cirujanos del mismo departamento, al ser obtenidas se colocaron en tubos cónicos de 15mL los cuales contenían 3mL de medio RPMI-1640 (R7348 Sigma-Aldrich) adicionado con 5% de DMSO (ATCC-4-X), 10% de albumina humana 10%SFB, 100U/ml penicilina, 100mg/mL estreptomycin y 0.25mg/ml de anfotericina B. Las piezas se transportaron en cadena fría en hileras

de unicel con geles refrigerantes y en caso de ser necesario se congelaron a -80°C, en lo posible se procesaron en las primeras 12 horas después de la extracción.

6.3.3. Obtención de las células de pulpa dental

Para la estandarización de los procesos de obtención de células troncales se utilizaron 30 muestras correspondientes a terceros molares.

En campana de flujo laminar, se procedió a descontaminar las piezas, primeramente, se limpiaron con gasa con anfotericina-B 0.25mg/mL posteriormente se colocaron en Iodopovidona 8%, PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) pH 7 con 100U/100mg/ml de Penicilina/Estreptomicina y finalmente en Clorhexidina al 0.12%.

Para la obtención de las células del interior del órgano dentario, se ingresó al tejido pulpar, para esto se probaron dos metodologías:

1. Se perforaron los órganos dentarios desde la corona hasta llegar a la cámara pulpar utilizando una pieza de mano de uso odontológico de alta velocidad, para hacer la apertura se perforó la corona del diente con una fresa número 8 de carburo, posteriormente se utiliza una fresa del número 2 de carburo para hacer comunicación con la cámara pulpar y por último se utilizó una endo-Z para ampliar la cavidad con la finalidad de tener un mejor acceso a la cámara pulpar, cuando se observaron ápices inmaduros estos simplemente se retiraron con pinzas estériles.
2. Se cortó el órgano dentario a tercio cervical dividiendo corona y raíz, utilizando una pieza de mano de baja velocidad y un disco de diamante de doble vista con mandril, irrigando con jeringa agua sobre la pieza para evitar el sobrecalentamiento de la misma. Al llegar a la cámara se retiró el tejido pulpar mecánicamente con la ayuda de pinzas, cucharillas para dentina y limas hendstrom y flexo file, si se observaban restos de tejido se realizaban lavados con DPBS (Dulbecco's PBS) o con el medio de cultivo celular para obtener la mayor cantidad de tejido. El tejido de los ápices inmaduros así como la pulpa dental se

fraccionaron con bistrú y se colocaron en digestión agregando 1mL de tripsina al 0.005%, diluida en DPBS, la solución se colocó en agitación a 160 rpm a temperatura regulada a 37°C por 20 minutos, vortex 1 minuto, 20 minutos en agitación 220rpm y un minuto en vortex nuevamente, esta suspensión fue centrifugada a 1500rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 5mL de medio α MEM adicionado con 10% de SFB, 2mM de L-glutamina, 10UM L-ácido ascórbico 2-fosfato, 1% penicilina-estreptomicina 100U/100mg/mL y 0.25mg/mL de anfotericina B.

Esta suspensión se colocó en botellas de cultivo de 25cm² ventiladas y se observaron al microscopio invertido a las 24 horas posteriores y diariamente para verificar que se encontrara libre de contaminación, así como monitorear si ya se observaban células adheridas y el medio fue reemplazado cada 72 horas, aproximadamente entre los 7 y 15 días se comenzaron a ver las primeras células en crecimiento en cúmulos o rosetas con morfología fibroblástica típica.

Para el mantenimiento de los cultivos celulares se utilizó medio DMEM suplementado con 10% SBF y 200mM de L-glutamina. Cuando las células se expandieron se criopreservaron en viales con DMSO al 7%.

6.3.4. Caracterización del fenotipo de las células de pulpa dental obtenidas.

6.3.4.1. Determinación de la expresión receptores de membrana específicos de células troncales.

Se realizó un análisis por citometría de flujo para identificar los siguientes marcadores de membrana: CD73, CD90, CD105 y adicionalmente CD44 (Becton Dickinson Human MSC analysis kit cat. 562245) así como la ausencia de marcadores de tipo hematopoyéticos, se analizaron según el marcaje plasmado en la tabla 2.

Las células se retiraron de la botella de cultivo con tripsina 0.005%, se contaron en cámara de Neubauer y se colocaron 500,000 células en 300 μ L de PBS/BSA 0.1%,

METODOLOGÍA

se prepararon 9 micro tubos con las mismas proporciones. Las células se fijaron con paraformaldehído frío al 4%, este se preparó de la siguiente forma: en 25mL de PBS 2x, se disolvieron 2g de paraformaldehído en agitación constante y en placa de calentamiento a 55°C cuidando que la solución no hierva, se agregó gota a gota NaOH concentrado hasta lograr completa disolución del paraformaldehído, finalmente se aforó a 50mL con PBS 1x y se almacenó a 8°C.

La fijación de las células se realizó de la siguiente manera: se realizó previamente un lavado con PBS con BSA al 0.1% para retirarles el medio de cultivo, las células se centrifugaron a 1500rpm durante 2 min.

Se retiró el sobrenadante con micropipeta cuidando de no desprender el botón celular, se les añadió 100µL de paraformaldehído al 4% frío y se colocaron en agitación constante a 120rpm durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 900µL de PBS/BSA 0.1% con el fin de diluir el paraformaldehído, se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se prosiguió con el marcaje con los anticuerpos como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Marcaje con anticuerpos.

Número de tubo y anticuerpos correspondientes.	Descripción
1. Células sin marca	
2. Células con CD44	PE-Mouse anti-human
3. Células con CD73	APC-Mouse anti-human
4. Células con CD90	FITC-Mouse anti-human
5. Células con CD105	PerCP-Cy Mouse anti-human
6. Células marcadas con el cocktail de marcadores hMSC.	CD90-FITC, CD105-PerCP-Cy, CD73-APC.
7. Control isotipo de cocktail hMSC	mIgG1,κ- FITC, PERCP-Cy, APC
8. Células marcadas con el cocktail de marcadores de tipo hematopoyético.	CD34-PE, CD11b-PE, CD19-PE, CD45PE, HLA-DR PE.
9. Control de isotipo de marcadores de tipo hematopoyético.	mIgG1, κ- PE y mIgG2a κ-PE

Se colocaron 5 μ L de los anticuerpos individuales a cada tubo correspondiente y se colocaron 10 μ L para los controles de isotipo, así como para el cocktail positivo y negativo, se incubaron durante 1 h (tabla 2), protegidos de la luz y en agitación constante a 90 rpm. Se realizó un lavado para retirar el exceso de anticuerpo, se agregó 500 μ L de PBS/BSA 0.1% y se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 300 μ L de PBS/BSA 0.1%, se procedió a analizar en el citómetro Accuri C6 BD.

6.3.4.2. Potencial de diferenciación multi-linaje de las células de la pulpa dental.

Se realizó el cultivo de las células de pulpa dental en placas de seis pozos, se colocaron un millón de células por cada uno. La diferenciación hacia osteoblastos (Cat. 417D-250 Stem cell), adipocitos (Cat. 811D-250 Stem cell) y condroblastos (Cat. 411D-250 Stem cell) se realizó con medios formulados para dichos procesos, las células se cultivaron con los respectivos medios de diferenciación durante 24 días. Para la confirmación de los tipos de células obtenidas después del proceso, se trabajó con tinciones como lo marca la sociedad internacional de terapia celular para el aislamiento e identificación de células troncales.

6.3.4.2.1. Tinción con rojo oleoso: confirmación de la diferenciación hacia adipocitos.

El rojo oleoso se fija a las vacuolas lipídicas características de los adipocitos, la tinción se preparó de la siguiente manera: se pesaron 0.25g de rojo oleoso y se colocaron en un tubo de 50mL, se agregó 50mL de isopropanol al 100% y se mezcló por inversión, la mezcla en el tubo se cubrió con papel aluminio y se incubó a 56° durante 12h en baño maría, posteriormente se aforó el volumen a 50mL con agua destilada y dos horas previas al ensayo, esta solución se calentó a 60° y se mantuvo a esta temperatura durante dos horas, una vez transcurrido este tiempo, se prosiguió a preparar la solución de trabajo, tomando 6 volúmenes de la

solución de rojo oleoso combinándolos con 4 volúmenes de agua destilada, la solución de trabajo se filtró utilizando un poro de 0.22 μm .

Para la tinción, se retiró el medio de cultivo de los pozos y se enjuagaron dos veces con 300 μL de PBS 1x, las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 min, se retiró el PFA y se agregaron 500 μL por pozo de PBS durante 1 min, se retiró este PBS y después se agregaron 500 μL por pozo de isopropanol al 60% en solución salina durante 15seg.

Se retiró el isopropanol y se agregaron 500 μL por pozo de la solución de trabajo de rojo oleoso y se dejó reposar durante 20 minutos. Se enjuagó dos veces con 500 μL de PBS y se observó la placa al microscopio. Los adipocitos obtenidos deben mostrar en el espacio citoplásmico vacuolas lipídicas teñidas en color rojo o marrón, estas vacuolas son características de este tipo de células, por otra parte, si las células no se hubieran diferenciado no se observará coloración al interior de la célula.

6.3.4.2.2. Tinción con azul alciano: confirmación de condroblastos.

El azul alciano se fija a las fibras de colágena de la matriz extracelular producidas por los condroblastos. El azul alciano (A5268 Sigma Aldrich) se preparó al 1% en ácido acético al 3%, se ajustó el pH a 2.5 utilizando ácido acético concentrado, esta solución se filtró en membrana de 0.22 μm y se dejó reposar durante 24h.

Se procedió a retirar el medio de cultivo de la placa, las células se fijaron con etanol al 96% durante 20min, se lavaron con PBS 1x, se agregó ácido acético al 1% durante 5min, enseguida se lavaron con PBS y se colocó la solución de azul alciano durante 1h, posteriormente las células se lavaron con PBS y se observaron al microscopio. Las células condroblásticas se caracterizan por presentar fibras de colágena en la matriz extracelular, bajo esta tinción se observan en color azul celeste, por otra parte, las células que no expresen estas fibras no retendrán el colorante.

6.3.4.2.3. Tinción Von Kossá: confirmación de osteoblastos.

La tinción de Von Kossá tiñe de color negro o marrón los depósitos de calcio producidos por los osteoblastos. Las células se enjuagaron dos veces con 250µL por pozo agua destilada. Una vez realizados los dos lavados, se colocó por pozo 2mL de etanol frío al 70% durante 12 a 24h se colocó la placa en refrigeración a -20°C sin agitación.

Posteriormente se retiró el contenido de los pozos y se lavaron con agua destilada o desionizada, luego se retiró el agua.

Se añadieron 500µL de solución de nitrato de plata (227188 Sigma Aldrich) al 5%. La placa se colocó en exposición a luz UV a 120µJ/cm² durante 5 a 7 min hasta que se comenzaron a visualizar depósitos de calcio en color negro o marrón oscuro.

Posteriormente se retiró el nitrato de plata y se colocó PBS, posteriormente se observaron al microscopio. Las células obtenidas deben mostrar en el espacio citoplásmico, depósitos de calcio en forma de pequeñas vacuolas que se tiñen de color negro cuando el nitrato de plata se fija al calcio, sin embargo, las células no diferenciadas no retendrán el colorante.

6.3.5. Proceso de diferenciación a células productoras de insulina

El proceso de diferenciación de células mesenquimales se llevó a cabo en placas de 6 pozos con 500,000 células por pozo, en incubación a 37°C, 95% humedad relativa y 5% de CO₂. Se llevó a cabo el mismo protocolo para las células de médula ósea, así como las aisladas de pulpa dental. El proceso se realizó en tres etapas o transiciones como se describe a continuación:

Etapa 1: obtención de células endodérmicas

Se colocó 1mL por pozo de medio basal de la casa comercial ATCC suplementado de la forma recomendada para mantenimiento de hMSC al cual se le adicionaron las siguientes moléculas: Activina A (SRP3003-1.-Sigma Aldrich) 100ng/mL y CHIR99021 (SML1046-Sigma Aldrich) 3µM y se incubaron durante 7 días.

METODOLOGÍA

Etapa 2: Obtención de progenitores endócrinos.

Se realizó cambio de medio a la placa de cultivo por DMEM-F12 (D6421-Sigma Aldrich), adicionado con las siguientes moléculas: bFGF (F0291-Sigma Aldrich) 4ng/mL, IGF (I3769-Sigma Aldrich) 50ng/mL, Noggin (H6416-Sigma Aldrich) 100ng/mL, dorsomorfina (P5499-Sigma Aldrich) 1 μ M y Ácido retinoico (R2625-Sigma Aldrich) 2 μ M. Se incubaron por 7 días.

Etapa 3: Obtención de células β pancreáticas.

Se realizó cambio de medio a la placa de cultivo por DMEM-F12 adicionado con las siguientes moléculas: Forscolina (F6886-Sigm Aldrich)10 μ M, taurina (T8691-Sigma Aldrich) 3 μ M, nicotinamida (N0636-Sigma Aldrich)10mM, GLP-1 (G3265-Sigma Aldrich) 4ng/mL, Dexametasona (D4902-Sigma Aldrich) 10 μ M suplemento B27 al 1%. Se incubaron por 7 días.

Al término de cada etapa se colectaron sobrenadantes y las células para su análisis.

Tratamientos con la astaxantina.

Los tratamientos con la astaxantina (SML0982-Sigma Aldrich) consistieron en la dosis de 10ng/mL; que fue colocada en la formulación del medio en la segunda etapa de diferenciación. Por otra parte, se preparó medio nombrado como medio de pre-tratamiento que consistió en DMEM-F12 con Astaxantina 10ng/mL, suplementado con 7% SBF y 200mM de L-glutamina (Tabla 3) estos tratamientos se siguieron para el análisis genético del proceso de diferenciación.

Tabla 3. Se describen los grupos de tratamiento para la diferenciación.

Grupo/cultivo	Condición	Descripción del proceso
1	Protocolo de diferenciación control	Protocolo de diferenciación sin astaxantina (Prueba testigo sin la molécula o tratamiento de referencia TR)
2	Protocolo de diferenciación con la astaxantina en el medio de la segunda etapa	Se llevó a cabo el protocolo de diferenciación en el cual se añadió la astaxantina a 10ng/mL en el medio de la etapa dos.
3	Protocolo de diferenciación con medio de pre-tratamiento 24h antes de la etapa dos, además la astaxantina se incluyó también en la segunda etapa.	Se llevó a cabo el protocolo de diferenciación, al terminar la primera etapa se les colocó medio de pre-tratamiento durante 24h, posteriormente se prosiguió con el medio de la etapa dos donde se incluyó la molécula astaxantina a 10ng/mL.

Grupo 1: células sin astaxantina o tratamiento de referencia (TR); grupo 2: células con astaxantina sólo en la formulación del medio dos, Grupo 3: pre-tratamiento de astaxantina y en la formulación del medio dos.

6.3.6. Análisis de marcadores de membrana después del proceso de diferenciación.

Para corroborar el cambio de fenotipo de las células de troncales a diferenciadas se realizó un análisis por citometría de flujo para visualizar la disminución de los porcentajes de expresión en los marcadores de membrana: CD73, CD90, CD105 y adicionalmente CD44 que inicialmente se analizaron como se describe en el apartado para confirmar el efecto del proceso de diferenciación (BD Human MSC analysis kit cat. 562245).

6.3.7. Análisis de expresión de genes.

6.3.7.1. Extracción de RNA total.

Al término de cada etapa de diferenciación se colectaron las células para realizar un análisis por RT-PCR para rastrear la expresión de genes característicos del proceso.

Las células correspondientes a cada etapa fueron colectadas con el uso de rastrillo celular, se colocaron en un crio vial que contenía 1mL de medio DMEM/F12.

La extracción de RNA se realizó utilizando un kit (RNeasy Mini Kit. Quiagen cat. 74104). Se utilizaron 1×10^6 células aproximadamente, se colocaron en tubos eppendorf, se centrifugaron a 1500rpm durante 2 minutos para retirar el medio de cultivo, se añadieron 350 μ L de buffer RLT y 350 μ L de etanol grado BM al 70%, se mezcló por pipeteo, los 700 μ L totales se transfirieron a una columna de extracción ensamblada a un tubo de recolección, se centrifugaron durante 30seg a 8000g.

Posteriormente se descartó el flujo del tubo de recolección, se añadió sobre la membrana de la columna 700 μ L de buffer RW1, se centrifugó durante 30seg a 8000g, se descartó el flujo de la columna, después se añadió un volumen de 500

μL de buffer RPE y nuevamente se centrifugó 30seg a 8000g, se añadieron 500 μL de buffer RPE nuevamente y se centrifugaron 2 min a 8000g, posteriormente se reemplazó el tubo de colección por uno nuevo y finalmente se colocó sobre la membrana 30 μL de agua grado BM, se centrifugó durante 1 min A 8000g para eluir el RNA de la columna.

6.3.7.2. Cuantificación de RNA

Para determinar la concentración de las muestras se cuantificaron en el fluorómetro Qubit 3.0, para esto se realizó una curva de solución de trabajo con los estándares provistos por el kit RNA Assay Qubit Cat. 032852. Posteriormente se tomó una muestra del extracto de RNA de 10 μL y se colocó en 90 μL de solución de trabajo, se tomó la lectura y se procedió a realizar los cálculos correspondientes para tomar 50ng de RNA para la síntesis de cDNA.

6.3.7.3. Síntesis de cDNA

Una vez cuantificado el RNA, se realizaron los cálculos necesarios para tener 50 ng de RNA para la síntesis de cDNA. Se utilizaron los componentes del kit *Go scrip reverse transcription system* cat. A5001 lote 0000233110.

Se colocaron 50ng de RNA experimental con 1 μL de *random primer* y 1 μL de agua libre de nucleasas, la mezcla se incubó a 70°C durante 5 min, después se colocó en hielo por 5 min y se centrifugó en spin 10 s.

Se preparó el mix de reacción con la enzima *go script reverse*, a esta mezcla se le adicionó la mezcla del RNA experimental, el volumen total fue de 20 μL , se incubó a 25°C durante 5 min, y luego a 42°C durante 1h, finalmente para inactivar la enzima se incubó a 70°C durante 15 min. La tabla 4 muestra las condiciones que fueron programadas para la síntesis del cDNA en el termociclador marca Applied Biosystems, *Veriti 96 well Thermal Cycler*.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Inicio	25 °C	5 minutos
Extensión	42 °C	60 minutos
Inactivación de la enzima	70 °C	15 minutos
Enfriamiento	4 °C	∞

Tabla 4. Condiciones de retrotranscripción para la síntesis de cDNA.

6.3.7.4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se partió del cDNA sintetizado y se utilizó el termociclador marca *Applied Biosystems, Veriti 96 well Thermal Cycler*.

Se utilizó el kit Promega Go Taq G2 Flexi DNA Polymerase cat. M7806. Se realizó la mezcla de reacción contemplando volúmenes totales de 12.5 µL por reacción.

En la tabla 5 se muestran las proporciones de los componentes del mix por reacción individual.

Tabla 5. Mix de PCR para una reacción.

Componente	Volumen (µL).
5xBuffer Green	2.5
MgCl ₂	1.25
dNTP	0.25
Taq Polimerasa	0.0625
Iniciador F	0.5
Iniciador R	0.5
Muestra /Agua	2
Agua libre de nucleasas	5.43

En la tabla 6 y 7 se muestran las condiciones de la PCR para el análisis de los genes de interés.

Gen	TM Óptima
GAPDH	55
Glut2	55
Pdx-1	55
Ngn3	54
Is-1	55
Pax6	50
Insulina	53

Tabla 6. Temperaturas óptimas.

Tabla 7. Condiciones de la PCR para el análisis de los genes de interés

Temperatura	
Desnaturalización	95°C/2min 95°C/30seg.
Alineación	TM, 30seg, 35 ciclos
Extensión	72°C 1 min, final: 72°C 5min
Enfriamiento	4°C

El gen endógeno para normalizar el análisis en todos los casos fue el GAPDH ya que la expresión de éste gen permanece constante puesto que se regula con proliferación, activación y diferenciación celular. En la tabla 8 se muestran las secuencias de las secuencias de los oligos utilizados.

Tabla 8. Secuencias de los oligos utilizados

Gen	
Nombre	Secuencia
PDX-1	F GTCCTGGAGGAGCCCAAC
	R GCAGTCCTGCTCAGGCTC
GLUT2	F GGTTTGTAAGTTATGCCTAAG
	R GCCTAGTTATGCATTGCAG
Is-1	F GATTTCCCTATGTGTTGGTTGC
	R CTTCCACTGGGTTAGCCTGTAA
Ngn3	F CTCGAGGGTAGAAAAGGATGACGCCTC
	R ACGCGTGAATGGGATTATGGGGTGGTG
Insulina	F AGCCTTTGTGAACCAAGACC
	R GCTGGTAGAGGGAGCAGATG
Pax-6	F ATGAACAGTCAGCCAATGGG
	R CACACCAGGGGAAATGAGTC

Posteriormente se corrieron geles de agarosa (A2576 Sigma Aldrich) al 1.5% en buffer TAE (tris base, ácido acético y EDTA), teñidos con Gel Red (41003 Biotium), 80V durante 1h. Posteriormente se observaron en trasiluminador y se capturaron fotografías de los mismos.

6.3.8. Análisis de producción de insulina.

6.3.8.1. Insulina intracelular.

Después de los procesos de diferenciación, las células se desprendieron mediante un raspado con ayuda de un rastrillo celular. Se colectó la suspensión celular en un micro-tubo de 1.5 mL de fondo cónico, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5

METODOLOGÍA

min, posteriormente se descartó el sobrenadante y añadió 100µL de solución 1:1 de metanol: acetona, con la finalidad de fijar y permeabilizar las células en un solo paso, se dejó esta solución durante 1 min, posteriormente se les añadió 500µL de PBS a los tubos y se centrifugaron inmediatamente a 1500rpm durante 2 min, luego se retiraron los sobrenadantes y se incubaron con solución de anticuerpo anti-insulina (*Alexa Fluor 647 Mouse*) la cual se preparó colocando 4µL de anticuerpo en 1000µL de PBS, después a cada muestra de células en los micro tubos eppendorf se les colocó 200µL de solución de anticuerpo, se incubaron durante 1h protegidos de la luz en agitación constante a 90rpm a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó un lavado colocando 800µL de PBS, se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 300µL de PBS. Se tomó como control, células indiferenciadas sometidas al proceso de fijación-permeabilización y marcaje con el anticuerpo. Las muestras se leyeron en el citómetro Accuri C6 BD en el canal FL-4 (el rango del canal de este canal es de 540-700nm).

Para este análisis se añadieron dos grupos de trabajo adicionales a los descritos en la tabla 3, es decir, se realizaron protocolos de diferenciación donde se incluyó la astaxantina en la etapa 1 y en la etapa 3 del proceso, se describen en la tabla 9, estos análisis corresponden a células que se trabajaron para verificar la insulina intracelular por citometría de flujo después del proceso, no se incluyeron en el análisis genético puesto que este primer análisis exploratorio será utilizado como base para posteriores análisis.

METODOLOGÍA

Tabla 9. Grupos de trabajo establecidos para el análisis de insulina intracelular.

Grupo/cultivo	Condición	Descripción del proceso
Control	Células indiferenciadas	Células indiferenciadas marcadas con anti-insulina (su función es delimitar la población de células negativas para insulina intracelular)
Grupo 1A1	Protocolo de diferenciación con la astaxantina en la etapa 1	Se llevó a cabo el protocolo de diferenciación en el cual se añadió la astaxantina a 10ng/mL en el medio de la etapa uno.
Grupo 2A2	Protocolo de diferenciación con la astaxantina en el medio de la etapa 2	Se llevó a cabo el protocolo de diferenciación en el cual se añadió la astaxantina a 10ng/mL en el medio de la etapa dos.
Grupo 3A3	Protocolo de diferenciación con la astaxantina en el medio de la etapa 3	Se llevó a cabo el protocolo de diferenciación en el cual se añadió la astaxantina a 10ng/mL en el medio de la etapa tres.
Pre-T y A2	Protocolo de diferenciación con medio de pre-tratamiento 24h antes de la etapa dos, además la astaxantina se incluyó también en la segunda etapa.	Se llevó a cabo el protocolo de diferenciación, al terminar la primera etapa se les colocó medio de pre-tratamiento durante 24h, posteriormente se prosiguió con el medio de la etapa dos donde se incluyó la molécula astaxantina a 10ng/mL

Las células analizadas en citometría de flujo corresponden a células maduras o finalizadas las tres etapas del proceso de diferenciación, se clasificaron en 4 grupos para su estudio. Grupo 1A1: células con tratamiento de astaxantina durante la etapa 1; Grupo 2A2: células con astaxantina sólo en la formulación del medio dos, Grupo 3A3: células con tratamiento de astaxantina en la formulación del medio tres; Pre-T y A2: Se llevó a cabo el protocolo de diferenciación, al terminar la primera etapa se les colocó medio con astaxantina 10ng/mL durante 24h, posteriormente se prosiguió con el medio de la etapa dos donde se incluyó la molécula astaxantina a 10ng/mL.

6.3.8.2. Análisis de insulina liberada al medio

Los sobrenadantes colectados después del proceso de diferenciación se analizaron mediante una prueba ELISA, se utilizó el kit Invitrogen Cat. KAQ1251. Se estandarizó la prueba puesto que se observó que el PBS provocaba interferencia con los componentes del kit propiciando que se observaran densidades ópticas fuera del rango estimado de la curva estándar por la interacción inespecífica con otros reactivos del kit.

METODOLOGÍA

Por ello se determinó cambiar de regulador las muestras por TBS-BSA 5% utilizando mini columnas centrífugas 3K (Amicon Millipore), se colocó en cada columna 100µL de muestra (sobrenadantes de las células diferenciadas) con 400µL de TBS-BSA 5%, se centrifugó durante 30 min a 14,000-xg, se descartó el filtrado y se colocaron 500µL de TBS-BSA 5%, se resuspendió con micropipeta y se centrifugó 30 min a 14,000-xg, se descartó nuevamente el flujo y nuevamente se colocaron 500µL de TBS-BSA 5%, se llevó a la centrifuga bajo las mismas condiciones, finalmente se descartó el filtrado y se resuspendió la muestra en 250µL al final la muestra quedó diluida en buffer TBS-BSA 5% en dilución de 1:2.5, después del cambio de buffer, las muestras se procesaron en el inmunoensayo y se confirmó que desapareció la interferencia.

El inmunoensayo de tipo sándwich constó de una microplaca de 96 pozos recubierta con un anticuerpo monoclonal específico para la insulina. Se colocaron 400µL de solución comercial bloqueadora de ELISA (Thermo- invitrogen) durante 2h, posteriormente se decantó el contenido de los pozos y se secó la placa colocándola sobre papel absorbente.

Se colocaron 50 µL de cada estándar y controles provistos por el kit de ensayo en los pozos, éstos constan de concentración conocida ya que son sueros humanos liofilizados que son resuspendidos en agua, además se colocaron 50µL de las muestras en sus pocillos respectivos, después se añadieron 100 µL de anticuerpo de detección en cada pocillo, se cubrió la microplaca con un sellador de placas y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el contenido de los pozos con micropipeta y se lavó la microplaca 4 veces con 400 µL de solución de lavado (IDvet) por pocillo, esperando 30s antes de retirar la solución entre cada lavado, después del lavado final, se añadieron 100 µL de cromógeno y se incubó en oscuridad durante 15 min, posteriormente se añadieron 100µL de solución de paro y se dejó reposar durante 5 min, después se leyó a 450nm (longitud de onda determinada para el fluorocromo acoplado al anticuerpo de detección) en el espectrofotómetro de placas Xmark marca Bio-rad.

6.3.9. Análisis estadístico.

Las diferencias estadísticas entre los grupos de estudio se determinaron mediante un análisis de J-cuadrada de independencia para las poblaciones celulares analizadas para insulina intracelular, es decir, para el análisis por citometría de flujo. Se consideró una diferencia estadística cuando el valor de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Cultivo y expansión de la línea de células troncales mesenquimales de médula ósea

Las células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea de la casa ATCC (PCS-500-012 Lot. 63208778) se expandieron hasta pase 4, bajo las condiciones de cultivo estándar, se muestran fotografías representativas del cultivo celular en la figura 8.

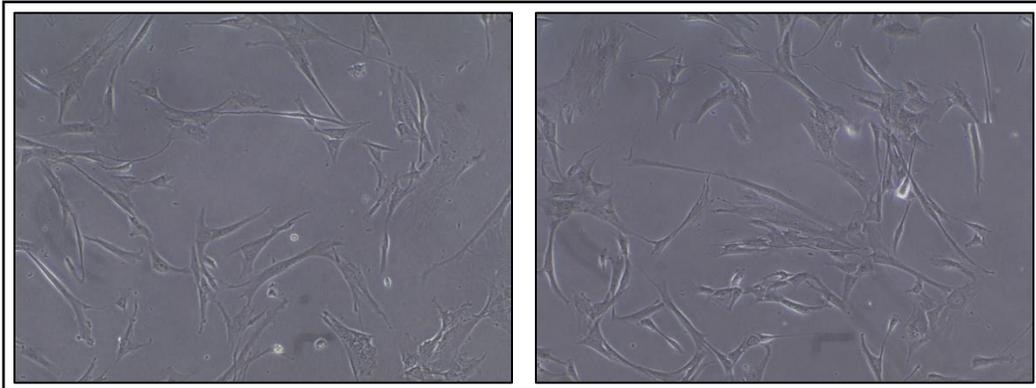


Figura 8. Células troncales mesenquimales de médula ósea en crecimiento. El cultivo corresponde al pasaje 3 de la línea celular, muestran morfología fibroblastoide y son adherentes al plástico. Las fotografías fueron tomadas con el aumento de 40x

7.2. Crecimiento celular de los cultivos primarios de la pulpa dental.

Las células aisladas de la pulpa dental de los órganos dentarios colectados muestran una morfología fibroblastoide alargada, además son adherentes al plástico, la morfología de las células aisladas se aprecian visiblemente similares a las de la línea de células troncales de médula ósea, las cuales se tomaron como testigo de referencia para verificar las características morfológicas de los cultivos primarios, consideramos que las células de estos cultivos primarios presentan características de células troncales.

Las primeras células en crecimiento se observaron entre los 7 y 15 días después del cultivo de los explantes de la pulpa dental. Se eligió trabajar la metodología de obtención del tejido pulpar cortando el órgano dentario, puesto que de esta forma se facilitó el acceso a la cámara pulpar para la obtención del tejido, por otra parte,

RESULTADOS

se redujo la contaminación por restos óseos y de esmalte propio del corte de la pieza con el disco.

En la figura 9 se aprecian fotografías representativas de los cultivos primarios en crecimiento.

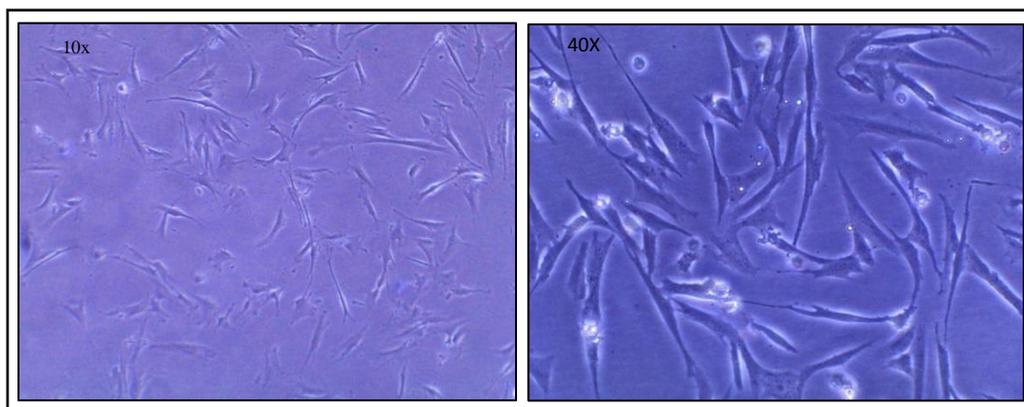


Figura 9. Fotografías representativas del cultivo primario de células de pulpa dental. A) Células en crecimiento con ampliación 10X. B) Células en cultivo primario con ampliación de 40X.

Se realizó la expansión de los cultivos primarios para crio-preservar las células en tanque de nitrógeno para análisis posteriores. En la tabla 10 se resume la cantidad de cultivos preservados de células del cultivo primario de las muestras de los órganos dentarios que se procesaron. Se utilizaron los primeros 30 cultivos para generar el procedimiento de obtención y cultivo.

Tabla 10. Cultivo de células a partir de los órganos dentarios.

Sexo del donante	Edad	Clave interna: No. Paciente/ No. pieza	Sexo del donante	Edad	Clave interna: No. Paciente/ No. pieza
masculino	25	31/48	femenina	18	37/38
masculino	25	31/28	femenina	18	38/48
femenina	32	32/48	femenina	18	38/18
masculino	18	33/48	femenina	27	39/28
masculino	18	33/38	femenina	16	40/48
femenina	35	34/18	femenina	16	40/18
femenina	35	34/48	masculino	25	42/38
femenina	35	34/28	masculino	25	42/28
femenina	35	34/38	masculino	25	42/48
masculino	15	35/38	masculino	25	42/18
masculino	15	35/48	femenina	20	44/18

RESULTADOS

femenina	30	36/48	femenina	24	48/18
femenina	30	36/18	femenina	24	48/28
femenina	18	37/48	femenina	42	50/38
femenina	18	37/18	femenina	16	54/18

Se resguardaron en tanque de nitrógeno 30 muestras del cultivo de los órganos dentarios, éstas fueron analizadas para determinar que su fenotipo, y morfología correspondiente a células troncales mesenquimales.

7.3. Caracterización del fenotipo de las células de pulpa dental.

7.3.1. Análisis morfológico y expresión de receptores específicos de células troncales mesenquimales humanas (hMSC).

El análisis se llevó a cabo en el citómetro Accuri C6 BD; se realizó el estudio de los cultivos primarios, tomando como referencia la morfología y el análisis de marcadores en la línea celular de médula ósea, para contemplarlas como testigo positivo de células troncales; inicialmente se realizó un análisis morfológico para verificar el tamaño y la granularidad de las células obtenidas del cultivo primario de pulpa dental y se comparó con la morfología de las células troncales de médula ósea, se observó que la morfología de las células de pulpa dental es similar a las de la línea celular (Figura 10).

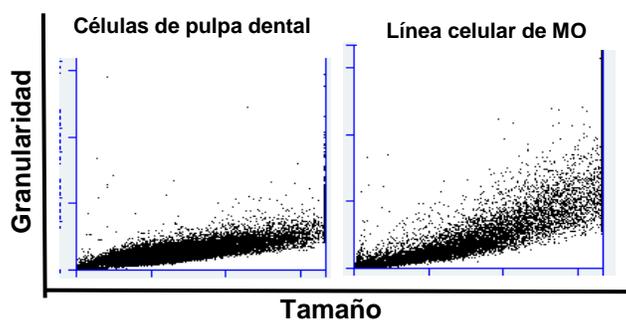


Figura 10. Análisis morfológico. Las células de pulpa dental presentan un tamaño similar a las células troncales de médula ósea, la granularidad o complejidad celular se aprecia de forma similar a pesar de que las células de MO presentan una ligera dispersión.

Las células aisladas expresan los marcadores CD73, CD90, CD44 y CD105 en proporciones adecuadas de acuerdo a la ISCT, esto es, en un porcentaje de la población mayor al 95%, por otra parte, no se observaron marcadores de tipo hematopoyéticos (CD34, CD45, CD56, CD14 y HLA), los cuales no deben

RESULTADOS

presentarse en más del 2% de la población celular; en la tabla 11 se resumen los porcentajes de expresión de los marcadores de membrana característicos de células troncales mesenquimales encontrados en tres muestras representativas de los cultivos primarios de células aisladas de pulpa dental.

Tabla 11. Expresión de marcadores de membrana en las células aisladas de la pulpa dental.

Muestra	Expresión de marcadores de membrana (% de expresión)				
	CD44	CD73	CD90	CD105	Marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45, CD56, CD14 y HLA)
1	98	98.4	92.7	99.4	0.6
2	99.2	96.0	80.9	96.4	0.4
3	99.7	93.6	94.4	97.1	0.1

Se analizó una población de 30 muestras donde se observó la expresión de los receptores característicos de células troncales, sin embargo se muestran en la tabla 6, sólo tres representativas, cabe resaltar que para los procesos de diferenciación se eligió una de estas tres muestras debido a su alto porcentaje de expresión de marcadores característicos de células troncales, por otra parte, los marcadores de tipo hematopoyético se observan en porcentajes mínimos, lo cual es indicativo de que se ha aislado una población homogénea de células troncales, de acuerdo a este fenotipo.

En la figura 11 se muestran los resultados del análisis por citometría de flujo de una muestra representativa, donde, de acuerdo a la caracterización del modelo de trabajo (anexo 1) se muestran las dobles tinciones para los marcadores CD44 vs CD90 y CD73 vs CD105.

En estos gráficos de puntos podemos visualizar en los cuadrantes superior derecho la población celular que registra una longitud de onda indicativa de la expresión de dichos marcadores.

RESULTADOS

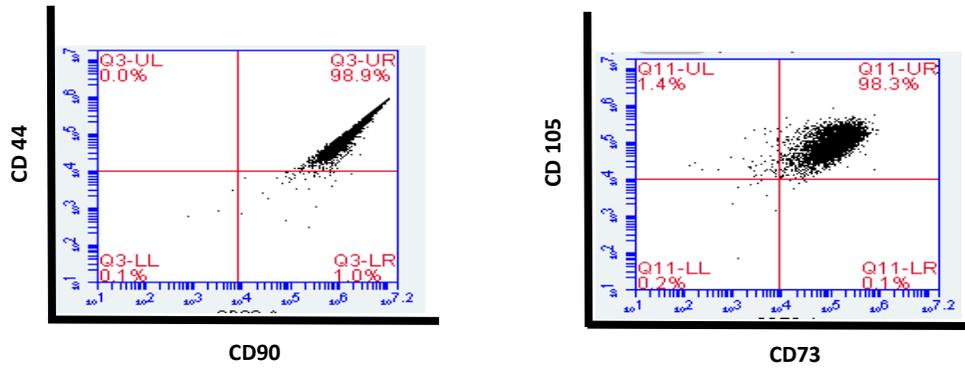


Figura 11. Expresión de receptores específicos de hMSC.

Muestra representativa. La población celular que se agrupa en los cuadrantes superior derecho de cada gráfico muestra la población positiva para los marcadores analizados, puesto que se muestran las dobles tinciones.

7.3.2. Potencial de diferenciación

Las células aisladas de pulpa dental se sometieron a procesos de diferenciación hacia tres estirpes celulares originarias cada una de las tres capas germinales puesto que está descrito en la literatura que las células troncales mesenquimales son multipotentes, por lo que deben contar con la capacidad de diferenciarse hacia células de distintos linajes (Halleux C. *et al.*, 2001).

7.3.2.1 Diferenciación a adipocitos.

La tinción con rojo oleoso evidencia lípidos intracelulares aglomerados en vacuolas en el espacio citoplasmático, lo cual es característico de los adipocitos, en la figura 12 se muestran fotografías representativas de las células en cultivo después del proceso de diferenciación a adipocitos teñidos con rojo oleoso.

RESULTADOS

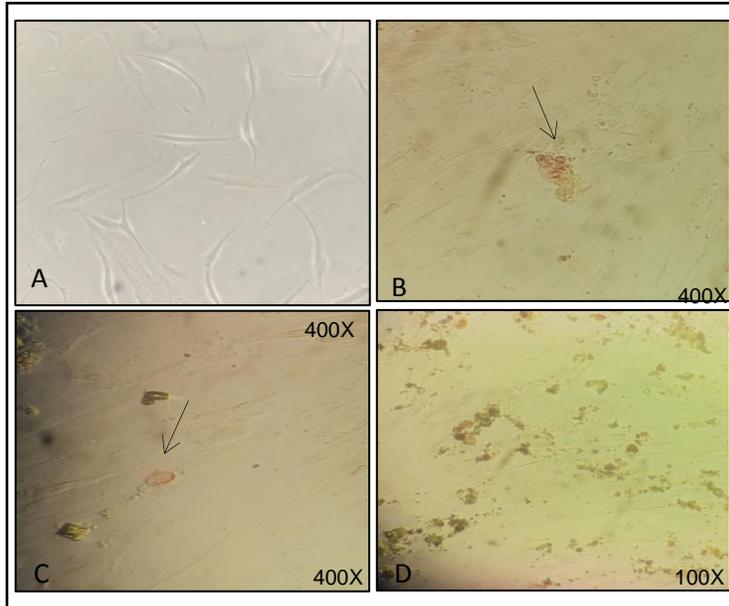


Figura 12. Adipocitos.

Obtención de adipocitos por diferenciación de las células aisladas de la pulpa dental, se observan en color rojo los lípidos en las vacuolas citoplasmáticas de las células, presentan morfología redondeada y grandes vacuolas. Se muestra en A) control negativo, es decir, células indiferenciadas conservan una morfología fibroblastoide típica con aumento 400x; B y C) adipocitos teñidos con rojo oleoso observados con aumento 400x, las flechas en las imágenes señalan adipocitos en cultivo y representan diferentes campos del cultivo, D) células observadas con aumento 100x.

7.3.2.2 Diferenciación a condroblastos

La tinción con azul alciano evidencia fibras de colágena en la matriz extracelular, lo cual es muestra de la formación de condroblastos, en la figura 13 se muestran fotografías representativas de las células en cultivo después del proceso de diferenciación a condroblastos teñidos con azul alciano.

RESULTADOS

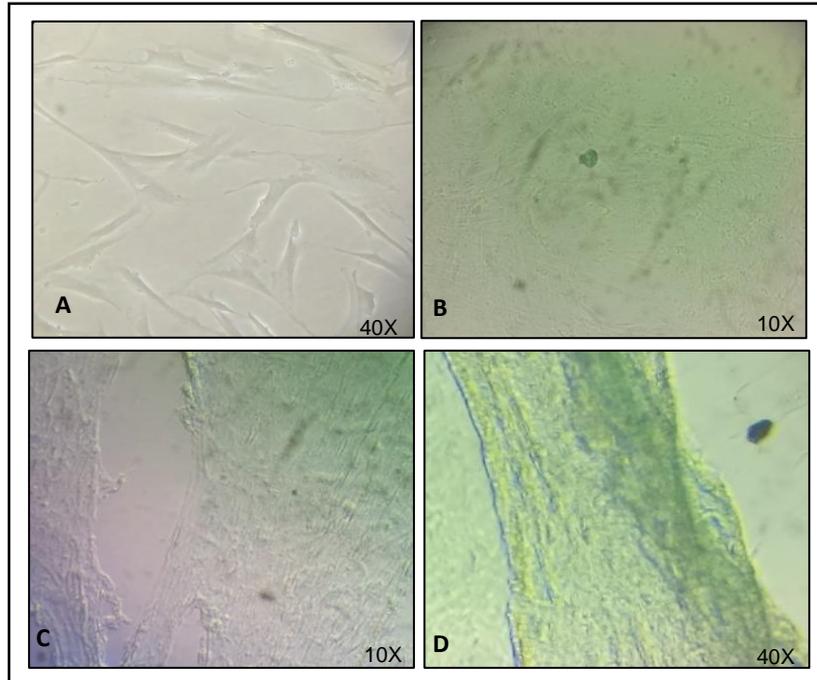


Figura 13. Condroblastos.

Obtención de condroblastos por diferenciación de las células aisladas de la pulpa dental, las fibras de colágena se observan en color azul, presenta morfología alargada y filamentosa. Se muestra en A) Control negativo, células no diferenciadas conservan su morfología fibroblastoide; B y C) condroblastos teñidos observados con aumento 10x se muestran dos campos diferentes del cultivo, D) muestra una ampliación en aumento 40x.

7.3.2.3 Diferenciación a osteoblastos.

La tinción de Von Kossá evidencia depósitos de calcio intracelulares aglomerados en el espacio citoplasmático, lo cual es una característica específica de los osteoblastos, en la figura 14 se muestran fotografías representativas de las células en cultivo después del proceso de diferenciación a osteoblastos.

RESULTADOS

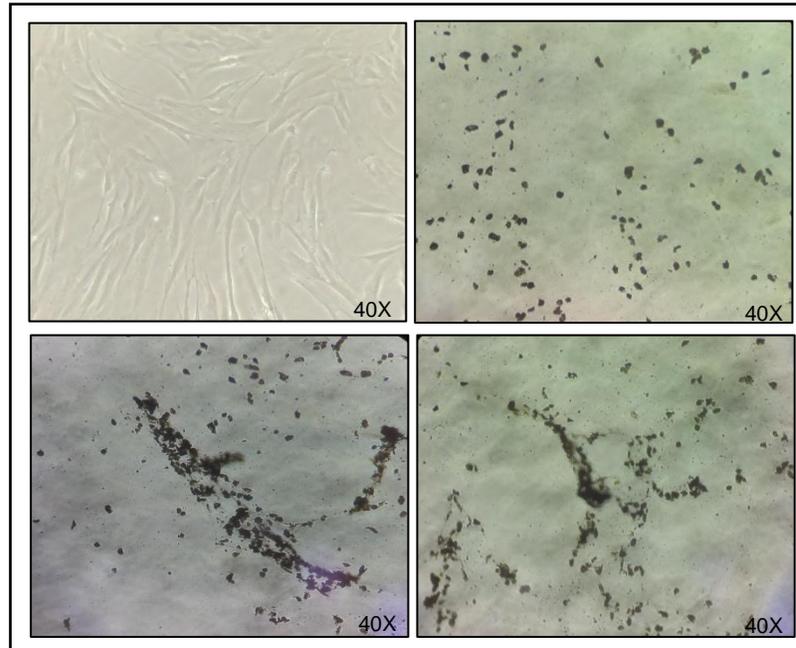


Figura 14. Osteoblastos.

Obtención de osteoblastos por diferenciación de las células aisladas de la pulpa dental, se observan en color negro los depósitos de calcio en las células, presentan morfología redondeada-cilíndrica. A) control de células sin diferenciación. Se muestran fotografías representativas de distintos campos del cultivo observadas en aumento de 40x.

7.4. Diferenciación a células productoras de insulina.

Una vez comprobado el aislamiento de células troncales mesenquimales a partir de pulpa dental, se procedió a realizar los procesos de diferenciación tanto de éstas, como de las células de médula ósea hacia células productoras de insulina.

Cada uno de los tres protocolos que se llevaron a cabo incluye tres etapas de diferenciación identificadas como “ET 1”, “ET2” y “ET3”.

Durante el proceso de diferenciación se tomaron fotografías para observar el crecimiento de las células durante el proceso, en la figura 15 se muestran imágenes representativas del proceso, se observó que las células con tratamientos de la Astaxantina (Ax) presentan mayor proliferación en las etapas 2 y 3 que las células en diferenciación que no se expusieron a la astaxantina.

RESULTADOS

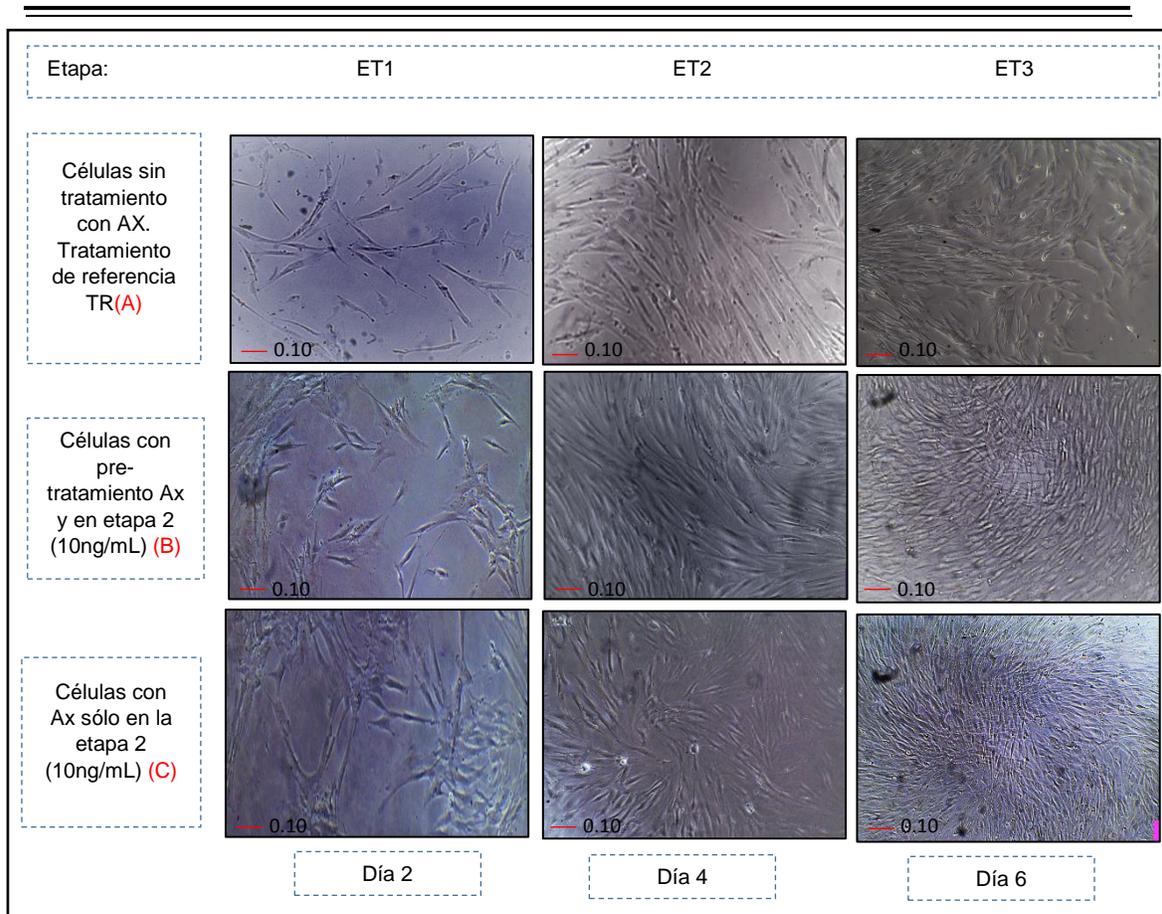


Figura 15. Imágenes representativas de los cultivos de MSC en diferenciación a células productoras de insulina.

Presentan visiblemente mayor proliferación celular aquellos cultivos tratados con la astaxantina, esto corresponde a las etapas 2 y 3, las fotografías se tomaron en los días 4 de la etapa 2 y en el día 6 de la etapa 3, (cada etapa tiene una duración de 7 días).

En el análisis de microscopía se observó que las células engrosan su morfología, durante el transcurso de la etapa dos y toman la tendencia a formar conglomerados celulares, se conoce que las agrupaciones que forman son típicas de células en transcurso a formar células pro-endócrinas.

7.5. Análisis genético del proceso de diferenciación.

El análisis por RT-PCR mostró que las células expresan algunos de los genes característicos del proceso de diferenciación a células beta en los tiempos en que se estableció tomar las células, cada período o estadio de la diferenciación está determinado por 7 días por etapa, por lo que se sugiere que aquellos genes que no

RESULTADOS

se observan en el tiempo en que se tomó la muestra, pudieron haberse expresado con anterioridad de acuerdo a que en la tercera etapa se observa el gen de insulina, en la figura 16 se muestran los genes observados en cada etapa del proceso.

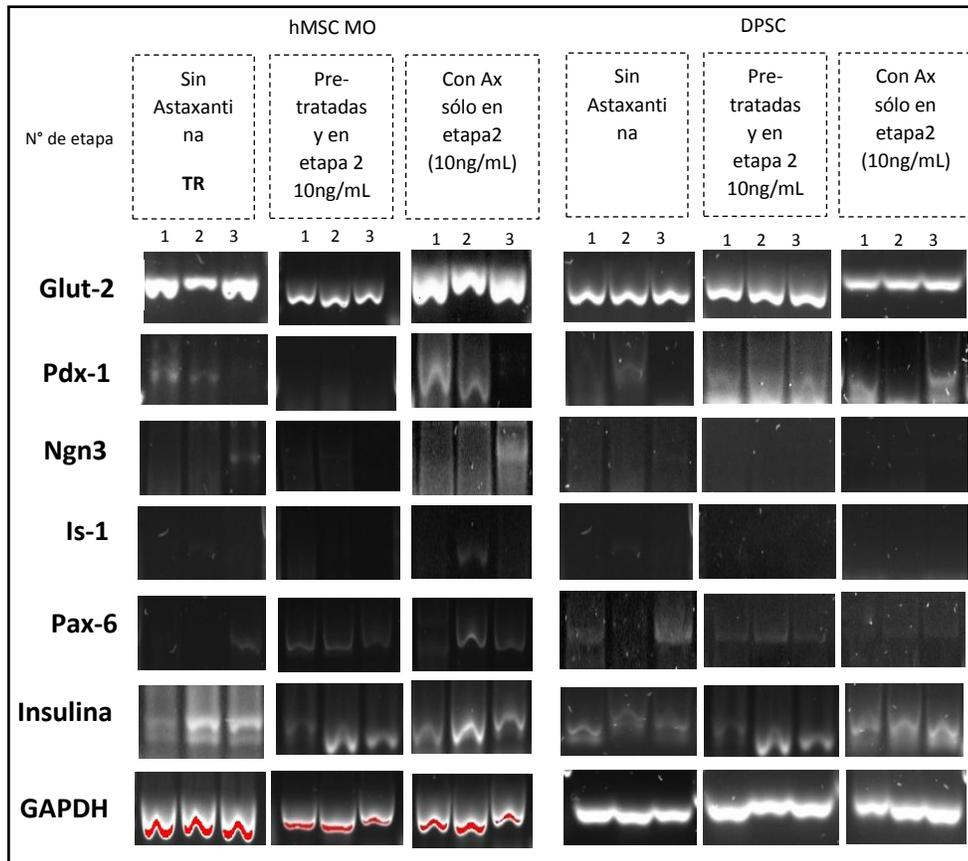


Figura 16. Análisis de expresión de genes por RT-PCR durante las tres etapas de diferenciación.

Se identifican los análisis en células de médula ósea (hMSC MO) y de las células de pulpa dental (DPSC) para todos los análisis se utilizaron 50ng de RNA. Se muestran en columnas los resultados para cada protocolo indicados en los recuadros de puntos, el primero en ambos tipos de células corresponde al tratamiento de referencia (TR), es decir, sin la astaxantina. Se presenta para cada protocolo sus respectivas etapas de maduración (1 a 3). Se observa insulina desde la primera etapa del proceso y su expresión perdura hasta la madurez.

Con la finalidad de contar con una mayor cantidad de material genético, se realizó una extracción de RNA de un set o mezcla de células de las distintas etapas del proceso de diferenciación de DPSC, muestran la expresión de genes como Pdx-1, Pax4, Pax6, Ngn3, e Insulina, se observa la presencia de bandas definidas con mayor claridad, se sugiere que se debe al aumento de material genético ya que se

RESULTADOS

tomó de una mayor cantidad de células para la extracción y se emplearon 100ng de RNA por reacción. La figura 17 muestra los resultados obtenidos de la mezcla de las células en las distintas etapas.

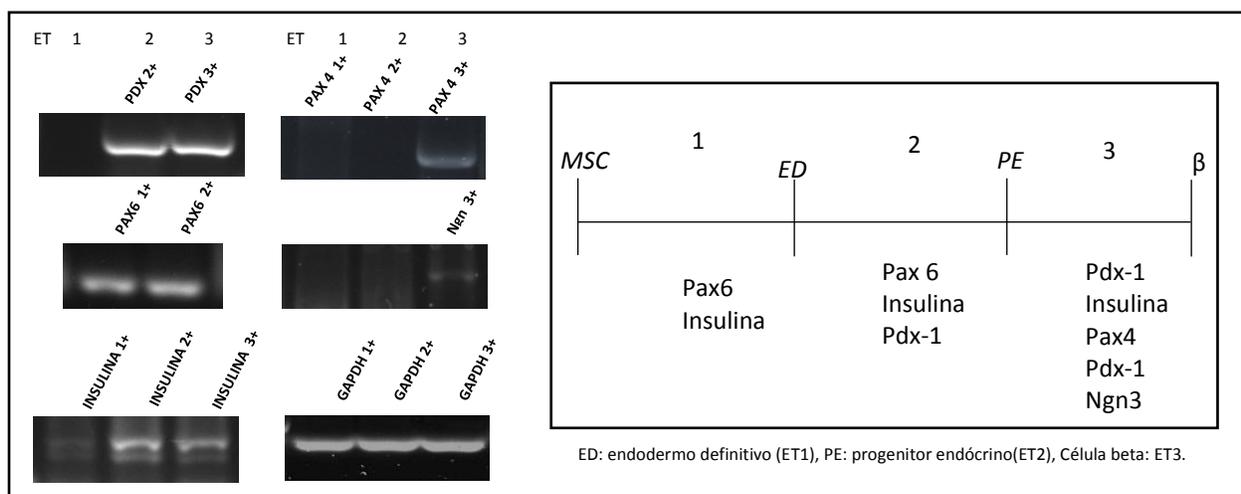


Figura 17. Esquema de la expresión de genes característicos del proceso de diferenciación de células troncales hacia células beta.

Se muestran por etapas la expresión de genes en células troncales provenientes de pulpa dental, se ilustra en el recuadro de la derecha, en resumen, las etapas o transiciones de maduración en el proceso, desde la célula troncal (MSC) hasta la formación de células maduras. Se observa la expresión de insulina desde etapas tempranas, así como la presencia de Pdx-1 en la etapa de madurez.

El conjunto de células que se tomó para el análisis de estos genes nos otorgó la oportunidad de contar con una mayor concentración de material genético, se visualizan bandas de insulina desde etapas tempranas del desarrollo, por otra parte, la presencia de Pdx-1 en la segunda y tercera etapa es indicativo de que la célula ha alcanzado un grado de madurez para excretar insulina.

7.6. Expresión de receptores específicos de hMSC después del proceso de diferenciación.

Los receptores de membrana CD44, CD90, CD73 y CD105 expresados en conjunto y en una alta expresión ($\geq 95\%$) determinan las características de una célula troncal mesenquimal, sin embargo, una prueba de que la célula cambió su fenotipo hacia un linaje celular determinado es la disminución de la expresión de

RESULTADOS

estos receptores, por lo que al analizar la presencia de dichos receptores en las células diferenciadas observamos que se encuentran disminuidos, en la tabla 8 se resumen los porcentajes de estos marcadores encontrados antes y después del proceso de diferenciación de una muestra representativa del proceso de diferenciación en células de pulpa dental sin astaxantina.

Los porcentajes observados en la tabla 12 son el resumen de lo obtenido en la figura 18 de citometría de flujo donde se aprecia que la disminución es significativa para los cuatro receptores, lo cual indica que la célula ha perdido el fenotipo de célula indiferenciada y confirma que el proceso de diferenciación se llevó a cabo (Mata-Miranda M *et al.*, 2014).

Tabla 12. Tabla comparativa de la expresión de receptores de membrana antes y después del proceso de diferenciación.

Receptor de membrana	% de expresión <u>antes</u> de la diferenciación	% de expresión <u>después</u> de la diferenciación
CD 44	98	0.0
CD 90	92.7	14.4
CD 73	98.4	12.7
CD 105	99.4	0.4

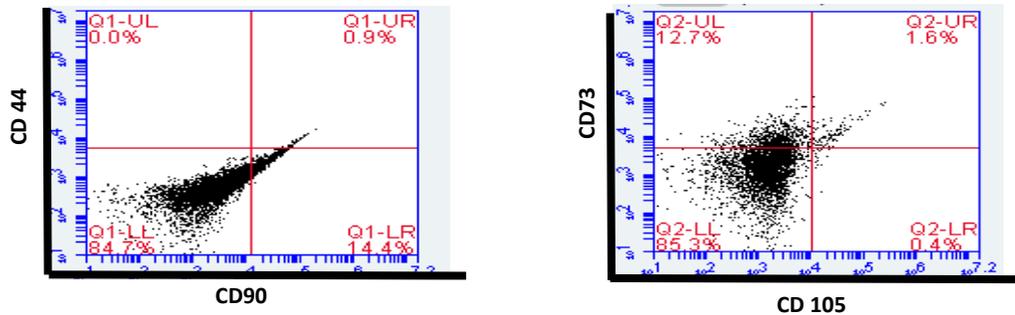


Figura 18. Expresión de receptores después del proceso de diferenciación.

Se observa en la figura los gráficos de puntos las dobles tinciones para una muestra de células sometida a este análisis de marcadores una vez que éstas fueron sometidas al proceso de diferenciación, se observa la población en los cuadrantes inferiores izquierdo, lo cual muestra una disminución de los marcadores que antes expresaron, es decir, se confirma que cambió su fenotipo de célula troncal mesenquimal.

7.7. Expresión de Insulina intracelular

En las figuras 19 y 20 se muestran los histogramas de citometría de flujo correspondientes a las células permeabilizadas y marcadas con anti-insulina Alexa

RESULTADOS

647 BD™, las células indiferenciadas (no inducidas al protocolo de diferenciación) marcadas con anticuerpo delimita la población negativa para insulina, es por ello que el desplazamiento hacia la derecha del pico de fluorescencia que se observa en las células diferenciadas marcadas nos indica un porcentaje de población positiva para insulina intracelular, se leyeron 10,000 eventos por muestra en citómetro Accuri C6 BD (ver tabla 4).

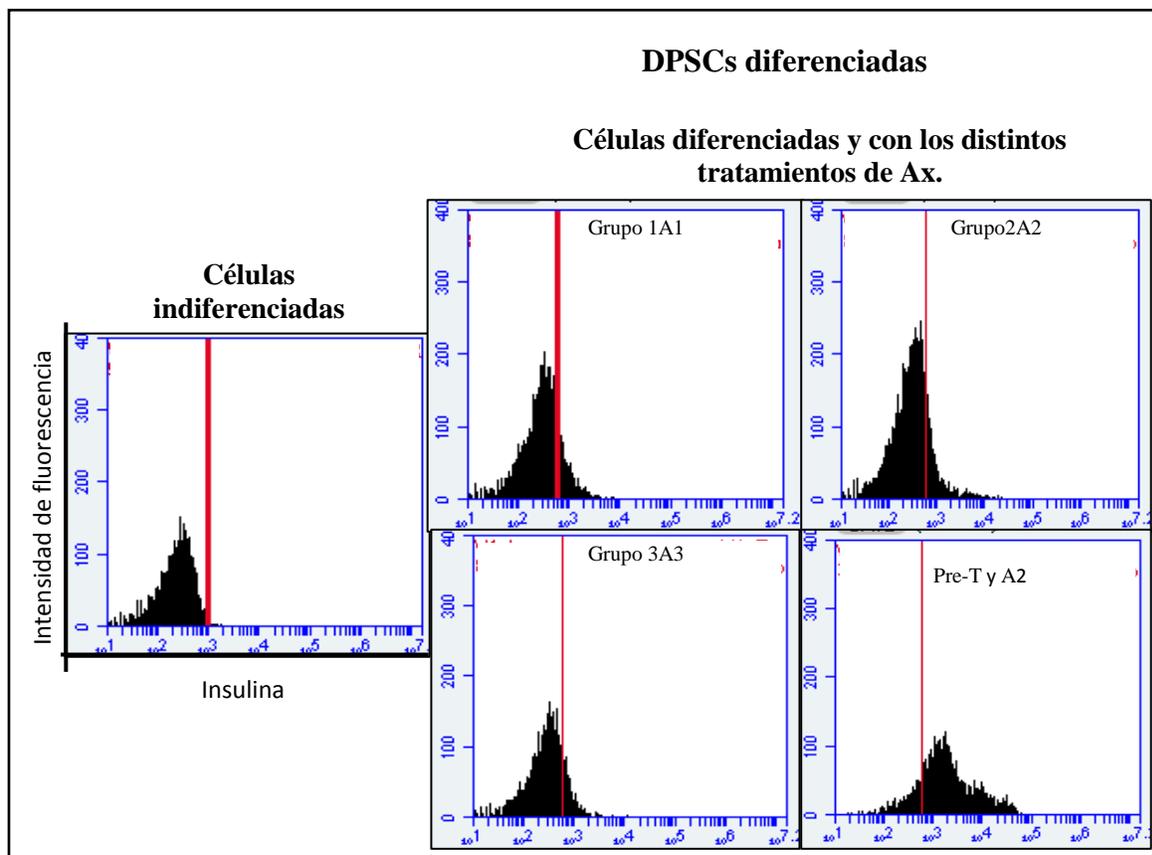


Figura 19. Células diferenciadas provenientes de pulpa dental marcadas con anti-insulina.

Se analizaron la etapa de madurez de capa protocolo descrito, es decir, la ET 3 en todos los grupos de tratamiento, estos grupos de tratamiento o protocolos están caracterizados de acuerdo a la etapa durante el proceso en que se utilizó la astaxantina y se identifican como Grupo 1: protocolo con (A1) tratamiento con la astaxantina en la etapa 1, Grupo 2: protocolo con (A2) tratamiento con la astaxantina en la etapa 2, Grupo 3: tratamiento con la astaxantina en la etapa 3 (A3), Pre-T y A2: Células con tratamiento de la astaxantina previa a la etapa 2 y durante la misma. Estos histogramas corresponden a células diferenciadas o en ET3 provenientes de DPSCs (ver tabla 4).

Cabe resaltar que se observó que bajo el tratamiento de la astaxantina previo y durante la etapa 2 se aprecia un mayor desplazamiento de la fluorescencia hacia la derecha; este comportamiento se observa similar en las células mesenquimales de médula ósea diferenciadas; mientras que en el caso de los tratamientos con la

RESULTADOS

molécula en la etapa 1 y 3 el porcentaje de células positivas para insulina se observa constante. En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos para las células diferenciadas de MO.

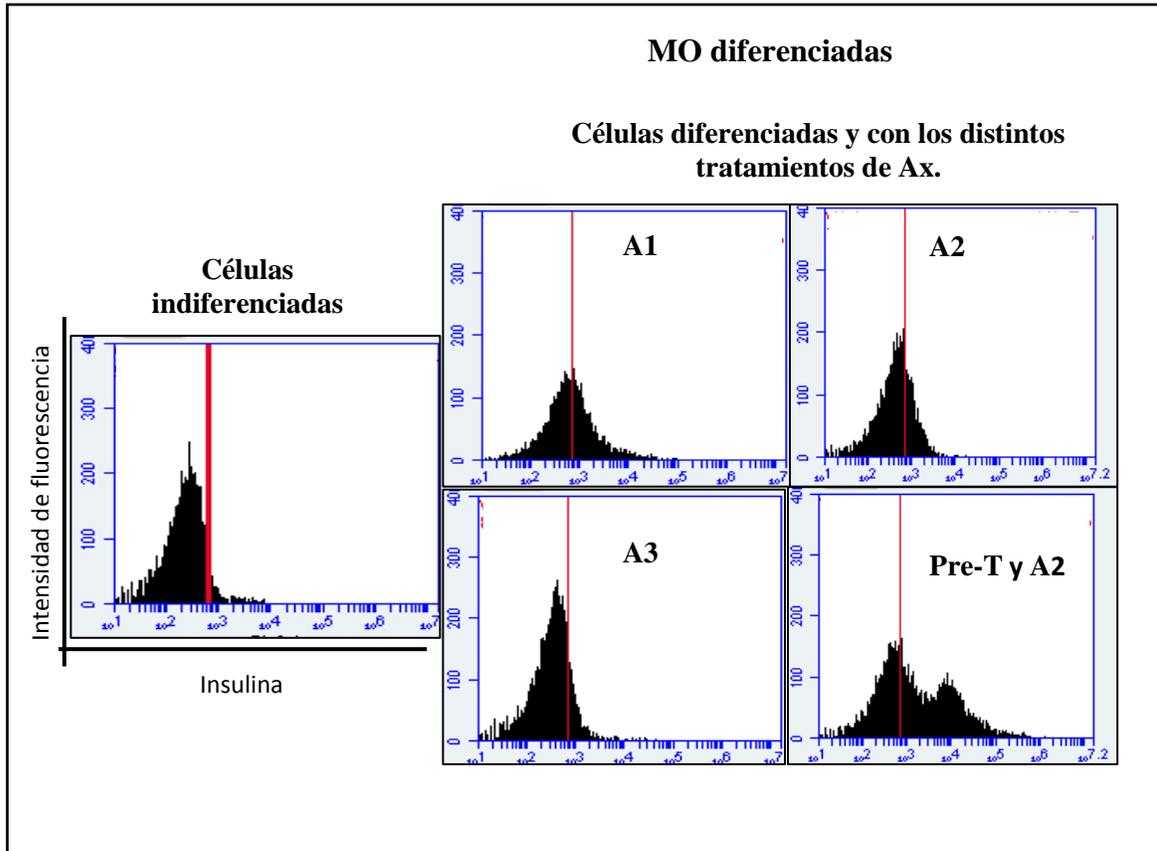


Figura 20. Células diferenciadas provenientes de Médula ósea marcadas con anti-insulina.

Se analizaron la etapa de madurez de capa protocolo descrito, es decir, la ET 3 en todos los grupos de tratamiento, estos grupos de tratamiento o protocolos están caracterizados de acuerdo a la etapa durante el proceso en que se utilizó la astaxantina y se identifican como Grupo 1: protocolo con (A1) tratamiento con la astaxantina en la etapa 1, Grupo 2: protocolo con (A2) tratamiento con la astaxantina en la etapa 2, Grupo 3: tratamiento con la astaxantina en la etapa 3 (A3), Pre-T y A2: Células con tratamiento de la astaxantina previa a la etapa 2 y durante la misma. Estos histogramas corresponden a células diferenciadas o en ET3 provenientes de MO. (Ver tabla 4).

Los porcentajes de población positiva para insulina intracelular se resumen en la tabla 13 para DPSCs y MO.

RESULTADOS

Tabla 13. Expresión de insulina intracelular en los diferentes tratamientos con la astaxantina.

Protocolo de referencia (Células maduras)		Células maduras con Astaxantina							
		En etapa 1 de la diferenciación.		En etapa 2 de la diferenciación		En etapa 3 de la diferenciación		Pre-tratamiento y durante la etapa 2.	
		A1		A2		A3		Pre-T y A2	
Insulina	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
DPSC	13.90%	15.40%	84.60%	14.30%	85.70%	15.60%	84.40%	62.90%	37.10%
MO	11.52%	36.70%	63.30%	13.30%	86.70%	22.00%	78.00%	49.50%	50.6%

El porcentaje de la población positiva para insulina de las células que fueron pre-tratadas antes de la etapa dos y durante la misma (*Pre-TyA2*), se observa tres veces mayor con referencia al resto de los tratamientos (tabla 13). Se observó que la tendencia a presentar mayor porcentaje de población positiva para insulina en este tratamiento es semejante tanto en DPSCs como en las células de MO.

Estos resultados sugieren que la astaxantina previa y durante la etapa 2 favorece la formación de células productoras de insulina o bien la producción de esta hormona.

En la figura 21 se muestran las poblaciones de células positivas para insulina intracelular, en donde el primer grupo de barras corresponden a las células diferenciadas no expuestas a astaxantina, es decir que con el protocolo de diferenciación diseñado (tratamiento de referencia) se obtiene aproximadamente un 11 al 16% de la población positiva para insulina intracelular de acuerdo a las condiciones de trabajo y al tiempo en que se colectaron las células, el resto de las barras del gráfico corresponde a las poblaciones celulares que durante el proceso de diferenciación se expusieron a tratamiento con la astaxantina en distintas etapas. Estos porcentajes representan lo observado en la tabla 13.

RESULTADOS

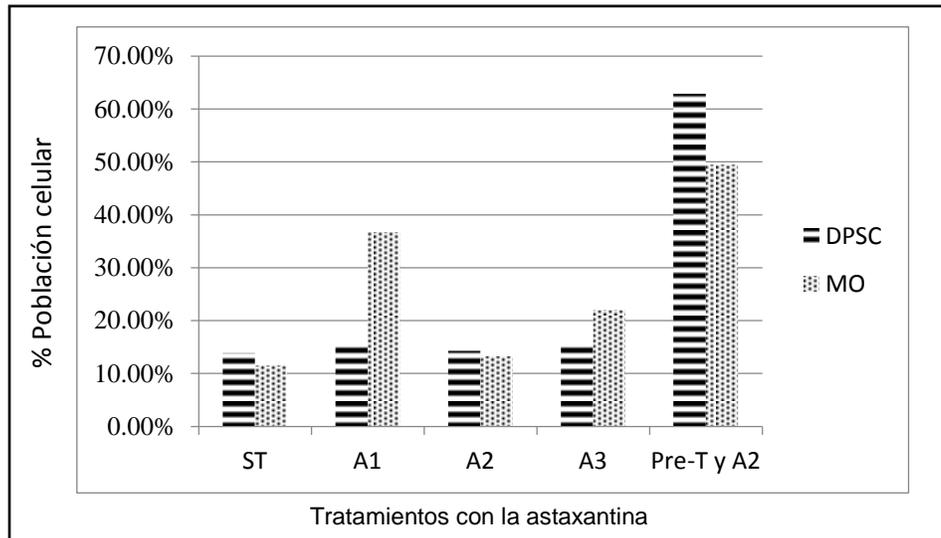


Figura 21. Porcentaje de población de DPSC y MO con insulina intracelular presente.

TR: Tratamiento de referencia, es decir el protocolo de diferenciación sin tratamiento de astaxantina, Grupo 1A1: células con astaxantina en la etapa 1, Grupo 2A2: células con astaxantina en la etapa 2, Grupo 3A3: células con astaxantina en la etapa 3, Pre-T y A2: células con astaxantina previa a la etapa dos y durante la misma.

Las diferencias estadísticas entre los grupos de estudio se determinaron mediante un análisis de J-cuadrada de independencia para las poblaciones celulares analizadas para insulina intracelular. Se consideró una diferencia estadística cuando el valor de $p < 0.05$.

Se estudió una población de 10,000 células por cada tratamiento de astaxantina, sin embargo, se observó en el grupo de células con pre-tratamiento de astaxantina (Grupo *Pre-TyA2*) un aumento de insulina en la población celular, esto es significativamente superior con un $\alpha=0.05$ en un análisis de J-cuadrada de independencia para MO como para DPSCs.

7.8. Liberación de insulina.

Para corroborar la funcionalidad de las células diferenciadas, inmediatamente después del proceso de diferenciación, se colectó el medio de la etapa tres y las células se estimularon con glucosa 23mM durante 1h, posteriormente se colectaron sobrenadantes y se analizaron mediante una prueba ELISA. Por otra

RESULTADOS

parte, con el fin de conocer adicionalmente la concentración de insulina a largo plazo después del proceso de diferenciación, se estudió el grupo de TR (tratamiento de referencia), se reemplazó el medio de la tercera etapa por medio basal de mantenimiento (medio basal ATCC PCS-500-030) y se muestreo sobrenadante 72 h después y se analizó.

En la tabla 14 se muestran las concentraciones de insulina en $\mu\text{UI/mL}$ encontradas bajo distintos tratamientos de la astaxantina cuando las células son estimuladas con glucosa durante 1h en una concentración de 23mM. De las células diferenciadas y sin tratamiento de astaxantina (TR) se obtuvieron 131.09 $\mu\text{UI/mL}$ para DPSC, mientras que para las obtenidas a partir de médula ósea se obtuvieron 62.43 $\mu\text{UI/MI}$ (TR), se observó que cuando las células están en contacto con la astaxantina las concentraciones encontradas tienen una ligera tendencia a aumentar, sin embargo cuando las células se incubaron 24h previas al comienzo de la etapa 2 y que además se les colocó la molécula durante esta segunda etapa (Pre-T y A2) la concentración de insulina es aproximadamente tres veces mayor que en el caso de los tratamientos y de las células ST.

Tabla 14. Insulina liberada al medio.

	TR	72h después	A1	A2	A3	PRE Y #2	ET 1	ET 2
DPSC	131.095537	33.3123518	139.970513	135.080793	139.970513	465.136936	0	0
MO	62.4357925	30.7456813	147.305094	39.7312402	73.9592847	169.308837	0	0

TR: Tratamiento de referencia, es decir el protocolo de diferenciación sin tratamiento de astaxantina, Grupo 1A1: células con astaxantina en la etapa 1, Grupo 2A2: células con astaxantina en la etapa2, Grupo 3A3: células con astaxantina en la etapa 3, Pre-T y A2: células con astaxantina previa a la etapa dos y durante la misma. ET1: etapa 1; ET2: etapa 2 (es decir, etapas del proceso previas a la madurez o conclusión del proceso de diferenciación) (Ver tabla 4).

Para las muestras de sobrenadantes de las células diferenciadas del TR después de 72h del proceso se encontraron concentraciones entre 30-33.31 $\mu\text{UI/mL}$, de esta forma tres días después del proceso de diferenciación y sin estímulo de glucosa, se observó que la concentración de insulina disminuía a una tercera parte aproximadamente respecto del promedio de las concentraciones que se encontraban cuando se analizaron las muestras inmediatamente después del proceso (Grupos 1A1, 2A2 y 3A3).

RESULTADOS

Por otra parte, se analizaron muestras de sobrenadantes correspondientes al término de la etapa 1 y 2 (etapas inmaduras del proceso de diferenciación) en los cuales no era detectable la presencia de insulina, por lo que se sugiere que la célula debe madurar en la tercera transición para adquirir la capacidad de liberar la insulina.

En la figura 22, se visualizan las concentraciones obtenidas para ambas líneas.

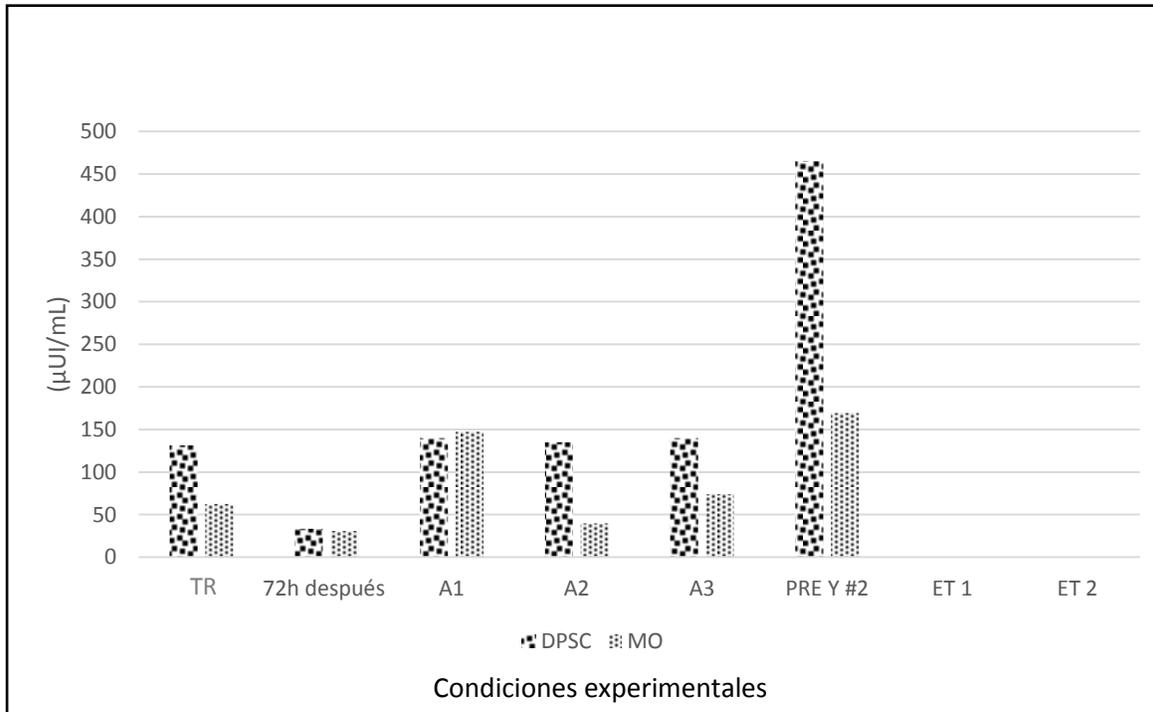


Figura 22. Concentraciones de insulina en el medio de cultivo.

TR: Tratamiento de referencia, es decir el protocolo de diferenciación sin tratamiento de astaxantina, Grupo 1A1: células con astaxantina en la etapa 1, Grupo 2A2: células con astaxantina en la etapa 2, Grupo 3A3: células con astaxantina en la etapa 3, Pre-T y A2: células con astaxantina previa a la etapa dos y durante la misma. ET1: etapa 1; ET2: etapa 2 (es decir, etapas del proceso previas a la madurez o conclusión del proceso de diferenciación).

Se muestran los resultados de forma gráfica donde se observa que la condición experimental del Pre y #2 en ambas líneas de células troncales ofrece una mayor concentración de insulina al finalizar el proceso de diferenciación. Esta figura representa de forma gráfica lo referido a los datos mostrados en la tabla 14.

8. DISCUSIÓN

Las células troncales mesenquimales son un recurso con aplicaciones en áreas de medicina regenerativa y terapia celular, sin embargo es necesario contar con protocolos de aislamiento, cultivo y preservación.

En este trabajo primeramente se llevaron a cabo procedimientos para la obtención de células troncales mesenquimales a partir de tejido pulpar de órganos dentarios provenientes de población mexicana.

Antes de acceder al tejido pulpar fue necesario establecer un proceso de desinfección y limpieza de las piezas dentales, debido a que en la cavidad bucal naturalmente se alojan gran cantidad de microorganismos, que pueden causar contaminación de los cultivos celulares. Aunque algunos autores reportan la descontaminación de la pieza únicamente con etanol al 70% (Karamzade R. *et al* .,2012) nosotros observamos en la práctica, que algunos cultivos se contaminaban con bacterias, así que con el fin de asegurar la esterilidad de los cultivos primarios se probaron combinaciones de microbicidas, antifúngicos y antibióticos para limpiar las piezas estableciendo así un protocolo de limpieza, de esta forma logramos obtener cultivos libres de contaminación bacteriana.

Posteriormente establecimos protocolos de obtención del tejido pulpar, probando dos metodologías; perforar las piezas de la corona hacia la cámara pulpar y cortar el órgano separando la corona de la raíz. Se descartó la primera, puesto que se observó que al perforar el órgano dentario, la generación de residuos de dentina contaminaron los cultivos e impidieron el crecimiento celular, se trabajó con la segunda metodología, es decir, se cortaron los órganos, puesto que esta metodología facilitó la obtención del tejido pulpar sin arrastrar residuos de dentina.

Existen reportes donde son utilizados diversos procesos para la obtención del tejido pulpar, como la perforación de las piezas con láser y la perforación de los

DISCUSIÓN

órganos dentarios (Raouf M. et al., 2014; Aljamie M, et al., 2016), sin embargo es preferido el corte de las piezas debido a que de esta forma se genera menor cantidad de residuos, además de ser un procedimiento sencillo que aminora costos lo que facilita su aplicación

Se utilizaron 30 piezas dentales para la estandarización de los protocolos de obtención y cultivo. Posteriormente se aislaron células de 30 muestras más, se procedió a estudiar el fenotipo de éstas y se preservaron en congelación para análisis posteriores.

La caracterización fenotípica de las células que aislamos, se realizó mediante el análisis morfológico, la expresión de receptores de membrana y el estudio del potencial de diferenciación, nos apegamos a lo establecido por la ISCT, este es el organismo encargado de impulsar el uso de las terapias celulares con aplicaciones en diversos padecimientos en beneficio de pacientes de todo el mundo.

Se observó que las células obtenidas en este estudio presentaron una morfología típica representativa de células troncales: fibroblastoides y adherentes al plástico. Los cultivos primarios fueron comparados con la morfología presentada por cultivos de la línea celular de MO, siendo similares, por otra parte las células obtenidas no expresaron marcadores de tipo hematopoyéticos (CD14, CD11b, CD34, CD45, HLA, HMC II, entre otros) esto indica que se obtuvo una población homogénea, por otra parte se encontró la expresión de marcadores de membrana como CD44, CD73, CD105 y CD90.

La alta expresión ($\geq 95\%$) de estos receptores en conjunto caracteriza a las células troncales mesenquimales (Ramos L. 2016; Arévalo-Romero *et al.*, 2007), sin embargo estos receptores de membrana se expresan en diversos linajes celulares, pero no se encuentran expresados en altas proporciones ni tampoco en conjunto, su presencia en otros tipos celulares se debe a que desempeñan funciones de reparación celular, adhesión y comunicación. Nosotros encontramos

DISCUSIÓN

una alta expresión de estos marcadores característicos de células troncales en nuestros cultivos primarios de las piezas dentales (>95%). Se procedió a estudiar el potencial de diferenciación de las células aisladas, puesto que las células troncales mesenquimales tienen como característica la capacidad de formar tipos celulares provenientes de las distintas capas germinales (endodermo, ectodermo, mesodermo) la ISCT ha establecido que las células aisladas deben tener la capacidad de diferenciarse hacia células condroblásticas, adipocitos y osteoblastos (Halleux C., *et al.*, 2001).

Las células aisladas mostraron evidencia de la formación de estos tres tipos celulares, con esto se verificó que cumplieron con las características especificadas, de esta forma corroboramos que obtuvimos células troncales de pulpa dental.

El aislamiento de DPSC's a partir de población mexicana podría abrir campo en nuestro país para la aplicación de nuevas terapias con sustitutos celulares, puesto que, las piezas dentales que utilizamos en este caso son consideradas productos de desecho biológico, podríamos otorgarles una utilidad terapéutica innovadora; por ejemplo, la obtención de células productoras de insulina a partir de DPSC's.

En este trabajo se diseñó un protocolo de diferenciación para obtener células productoras de insulina a partir de las DPSC's aisladas y de la línea celular de MO. Se tomó en cuenta las principales transiciones o etapas indispensables para guiar a la célula indiferenciada hacia células tipo β pancreáticas así como las moléculas necesarias, dosis y tiempo determinado de exposición.

Al realizar un estudio de cribado de las moléculas de utilidad para inducir la diferenciación en cada etapa se eligieron moléculas cuya combinación favoreciera el proceso y se estableció un período de 7 días por etapa, tiempo que determinamos como promedio de acuerdo a los distintos trabajos sobre diferenciación hacia células productoras de insulina (Suresh K *et al.*, 2014),

DISCUSIÓN

puesto que algunos autores reportan establecer periodos desde 48h para algunas etapas (Amour D' et al., 2006) y algunos otros reportan hasta 15 días (Rezania A, et al., 2014).

Las células aisladas de pulpa dental y la línea celular de MO se sometieron al proceso de diferenciación y se midió la expresión de algunos genes representativos de la diferenciación, tales como Pdx-1, Ngn3, Is-1, Glut2, Pax6 e insulina. Se sabe que la búsqueda de expresión de genes es un método útil para verificar la diferenciación de las células (Kunisada Y., *et al.*, 2011; Amour D. *et al.*, 2006).

Se encontró que las células en proceso de diferenciación expresan genes como Pdx-1, Glut2, Ngn3 e insulina, genes indispensables en el desarrollo de las células β . La expresión de Pdx-1 indica la formación inicial del desarrollo pancreático, en este punto las células necesitan de señales provenientes del mesenquima, que *in vitro* estas señales son suplidas por la adición de FGF, e IGF.

La expresión de Ngn3 corresponde a células endocrinas, en nuestro estudio, observamos la expresión de Ngn3 entre la segunda y tercera etapa del proceso, esto significa que las células progresaron a la formación de células endócrinas, además se sabe que este gen es clave para el inicio de la madurez celular (Amour D, *et a.*, 2006).

La expresión del gen de insulina se observó en etapas tempranas (es decir, en la etapa 2 del proceso de diferenciación) creemos que esto es debido a que el ciclo celular no fue sincronizado para iniciar el proceso de diferenciación, por lo cual el proceso de madurez no es homogéneo para todas las células en cultivo, de esta forma cuando se muestrearon las células al terminar la etapa 2 y se analizaron por RT-PCR se encontró la expresión de insulina.

DISCUSIÓN

Por otro lado, no se observó la expresión de Isl-1 en el tiempo que se tomaron las muestras para medir este gen, es decir, al término de la etapa 2 y al término de la etapa 3 para el análisis; sin embargo, no se descarta que las células lo pudiesen haber expresado en algún otro momento del proceso, por lo que podríamos suponer que si efectuamos un análisis a manera de cinética en el que se muestre células en diferentes tiempos y se analizaran por RT-PCR podríamos encontrar en que periodo del proceso se expresa este gen.

Una vez que establecimos el protocolo de diferenciación se añadió la molécula astaxantina en distintos puntos del proceso, basados en lo reportado por Jeon-Hwan y colaboradores (Jeon H.K., *et al.*, 2010); ellos utilizaron la astaxantina en un protocolo de diferenciación de células pluripotentes inducidas hacia la formación de progenitores neurales; en este estudio reportaron el efecto de la astaxantina en la diferenciación de progenitores neurales, en donde se encontró que al añadir astaxantina durante el proceso de diferenciación se propició la expresión del gen NeuroD, además de inducir aumento en los niveles de proteínas relacionadas con la proliferación celular y los niveles de expresión de factores de transcripción relacionados con la formación de progenitores neurales.

Basados en estos reportes, nosotros decidimos utilizar la astaxantina en el protocolo de diferenciación hacia células tipo β pancreáticas puesto que, esta descrito en la literatura (Hung P. *et al.*, 2013) que el gen NeuroD se encuentra implicado en la maduración de las células beta durante la transición secundaria, NeuroD se activa en la etapa 2 del proceso para fungir como una diana del gen Ngn3 que como ya se describió antes, es clave para el desarrollo de células endocrinas, por ello es que se determinó utilizar la astaxantina previa a la transición secundaria y también durante la misma, de manera que si bien, no se ha dilucidado el mecanismo por el cual la astaxantina podría beneficiar la formación de células β o la producción de insulina, nuestros resultados sugieren que la astaxantina podría influir en la activación de vías de señalización implicadas

DISCUSIÓN

en el desarrollo de células productoras de insulina con un efecto en la transición secundaria.

Posteriormente se realizaron análisis para verificar la presencia de insulina; recapitulando sobre los grupos de tratamiento que se estudiaron en este trabajo en el apartado de producción de insulina intracelular, se contó con el tratamiento de referencia (el protocolo de diferenciación sin la astaxantina: TR), así como los siguientes tres grupos caracterizados por la adición de la molécula en diferentes etapas del proceso (A1, A2 y A3) y el grupo *Pre-TyA2*, de cada grupo se analizó por citometría de flujo una población de 10,000 células, se observó que el porcentaje de población positiva para insulina presentada por el TR, es similar a la población que se observa en los grupos A1, A2 y A3, sin embargo, se observa una diferencia significativa al comparar el TR con el grupo *Pre-TyA2*, este efecto se observó también en las células provenientes de la línea de MO, puesto que en esta línea el grupo de *Pre-TyA2* presentó una población hasta tres veces mayor con insulina intracelular comparada con el resto de grupos de tratamiento y con el grupo TR por lo que podríamos suponer que existe un efecto de la astaxantina cuando es utilizada en un tiempo intermedio o de pre-incubación en el proceso.

Como se describió anteriormente, grupo *Pre-TyA2* corresponde a un grupo de células donde se colocó la astaxantina en una incubación previa al iniciar la etapa 2 del proceso y que además se colocó la astaxantina durante esta segunda etapa; la condición de "*Pre-T*", describe una condición llamada *pre-tratamiento* donde la finalidad u objetivo fue exponer a las células a la molécula astaxantina antes de inducir a las células a la transición secundaria, suponemos que la astaxantina por su alto potencial antioxidante, en este punto quizás actuó protegiendo a las células del estrés oxidativo causado por la inducción de la diferenciación con el cocktail de moléculas que conforman el medio de diferenciación de la segunda etapa, permitiendo así un mayor número de células que alcanzaron la madurez como células productoras de insulina.

DISCUSIÓN

Esto abre una brecha para el estudio del efecto de la astaxantina sobre la proliferación y la activación de vías de señalización con las cuales pudiese intervenir para lograr el efecto que observamos, es decir, que en esta condición las células producen aproximadamente tres veces más insulina que las células del grupo control y que las células que se trataron con la astaxantina únicamente en la etapa 2. Hasta hoy no se han encontrado reportes que sugieran un posible mecanismo de acción de la astaxantina en un proceso de diferenciación para la obtención de células β , por lo que es necesario realizar un estudio de lo que ocurre a nivel molecular sobre las vías de señalización correspondientes cuando las células en cultivo se someten a este tratamiento.

Posteriormente se analizó la insulina liberada al medio donde la concentración de insulina obtenida con el protocolo de referencia (TR) fue de 135 $\mu\text{UI/mL}$, de acuerdo a este dato, podríamos decir que el grupo *Pre-TyA2* es el tratamiento que indujo a las células a expresar una mayor cantidad de insulina puesto que en este grupo se encontró 465 $\mu\text{UI/mL}$. Este dato se correlaciona con el porcentaje de células con insulina intracelular presente, puesto que incrementa la población en dicho tratamiento, de igual forma incrementa la insulina liberada en éste.

Sabemos que para que las células obtenidas por diferenciación celular sean candidatas en investigaciones futuras como una posible terapia celular es indispensable contar con protocolos de diferenciación con los cuales sea posible obtener células productoras de insulina que suplan la necesidad de la hormona de la manera en que lo hacen las células β del páncreas de manera natural, la cantidad de esta hormona excretada por una célula β del páncreas oscila entre los 10 a 20 pg de hormona/célula y depende de la edad y peso corporal del individuo (Mahmoud 2014, Bo sun 2015).

Como se mencionó con anterioridad, esta es una de las principales razones para la búsqueda de moléculas que aumenten la eficiencia en cuanto a la producción de insulina que ofrecen las células obtenidas por diferenciación *in vitro*. Si

DISCUSIÓN

comparamos la cantidad de insulina que produjeron nuestras células (haciendo referencia al grupo *Pre-TyA2*, es decir, 465.13 μ UI/mL) entonces podríamos estimar que cada célula obtenida produjo alrededor de 0.67 pg de insulina, estos resultados son alentadores ya que, si bien es necesario incrementar la eficiencia de la producción de insulina, abren campo en el perfeccionamiento de las técnicas y protocolos de obtención de células productoras de insulina, ya que en publicaciones anteriores, autores han reportado obtener concentraciones de insulina a partir de la diferenciación de células mesenquimales de aproximadamente de 75 μ UI/mL ó 0.11 pg (Arefeh J. *et al.*, 2014 y 2015), 8.34 μ UI/mL ó 0.0000001pg (Nekoei *et al.*, 2015); cabe remarcar que estas concentraciones de insulina publicadas por estos autores han sido mediante el uso de protocolos diferentes, sin embargo se mantiene un objetivo en común, este ha sido, mejorar el rendimiento de la producción de insulina y la población de células diferenciadas.

Uno de los hallazgos más importantes de este trabajo fue el efecto de la astaxantina como una molécula que favorece el proceso de obtención celular con mayor eficiencia. Aunque es importante realizar repeticiones del estudio, el efecto de la astaxantina como *Pre-TyA2*, tuvo un efecto similar no sólo en DPSC's diferenciadas si no que en hMSC MO diferenciadas también produjo un aumento en la concentración de insulina encontrada.

Anteriormente D'Amour y colaboradores en el año 2006 iniciaron investigaciones como pioneros en la obtención *in vitro* de células productoras de insulina, teniendo en cuenta que la importancia primordial para el desarrollo de terapias celulares para el tratamiento de la diabetes es la producción de un número suficiente de células endocrinas pancreáticas que funcionaran de forma similar a los islotes primarios, ellos utilizaron células embrionarias humanas para lograr dicho objetivo, por lo que no fueron bien aceptadas en los modelos éticos y morales de la sociedad.

DISCUSIÓN

Estudios sobre el potencial de diferenciación de DPSC afirman que cuentan con una mayor facilidad de formar células endocrinas comparadas con las células hMSC provenientes de MO (Jafarian A. *et al.* 2014). Éstas últimas han sido las hMSC mayormente estudiadas puesto que fueron las primeras células indiferenciadas en aislarse, por lo que son una alternativa viable en estudios de diferenciación celular. Otros autores sugieren que debido al microambiente en donde se encuentran las células indiferenciadas en el organismo se desarrolla la capacidad de formar linajes celulares determinados con cierta preferencia (Kao S. *et al.*, 2015), es decir, las células provenientes de MO expresan mayor eficiencia para diferenciarse a células sanguíneas y estromales, por otra parte, las DPSC se diferencian preferentemente a células osteoblásticas (Zanini *et al.*, 2011; Kao S. *et al.*, 2015).

La influencia del nicho biológico en las hMSC propicia que las DPSC ofrezcan una fuente más eficiente para la obtención de células productoras de insulina comparado con las hMSC MO, como se observó en este trabajo, se obtuvo una mayor cantidad de células diferenciadas a partir de las DPSC respecto de las células provenientes de MO.

Por otra parte, cabe resaltar que utilizar células provenientes de piezas dentales es un recurso innovador, ya que hasta hoy las piezas dentales generalmente se consideran un producto de desecho biológico, por lo que es altamente viable su aprovechamiento como fuentes de obtención de células madre mesenquimales consideradas útiles para el desarrollo de terapias en la medicina regenerativa en múltiples padecimientos crónicos como DM.

9. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pudieron llegar a las siguientes conclusiones:

- En este trabajo fue posible generar un procedimiento estandarizado para el aislamiento, cultivo y preservación de células troncales mesenquimales provenientes de piezas dentales obtenidas de población mexicana. Por lo tanto, esto abre una brecha en la investigación en el área de terapia celular en nuestro país.
- Se logró generar un protocolo con astaxantina para la diferenciación de células troncales hacia células productoras de insulina, con base a los resultados obtenidos se concluye que las DPSC ofrecen mayor rendimiento en producción de insulina.
- La confirmación de la funcionalidad de las células obtenidas nos indica que el protocolo es efectivo y prometedor para realizar posteriormente réplicas del estudio.

10. PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentadas en esta tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones.

En un primer plano se encuentran los trabajos destinados a complementar los aspectos de análisis genético con la búsqueda de la expresión de otros mensajeros.

En concreto, se podría estudiar la expresión a manera de cinética durante todo el proceso de diferenciación celular. La opción más plausible sería realizar este estudio cada 24 horas, se sugiere usar la técnica de PCR en tiempo real para realizar un estudio de forma cuantitativa y a profundidad para comprender si realmente existe una modificación ante la presencia de la molécula de interés, en este caso la astaxantina.

Otro punto que sería interesante complementar sería el estudio de la liberación de insulina, probando diferentes vehículos de la glucosa, concentraciones de glucosa diferentes, tiempos de incubación, incluso un análisis de la excreción a manera de cinética para identificar la respuesta a glucosa y a factores iónicos y potenciales para la regulación celular en dichos mecanismos, esto nos daría información de si las células responden a un control de excreción bajo diversas condiciones y si serán capaces de responder a un control negativo para regulación de la liberación, como glucagón.

Por otra parte, se podría esperar que en un modelo in vivo de ratones diabéticos humanizados, estas células implantadas en el páncreas tuvieran un efecto positivo en la restauración de la homeostasis de la glucosa.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Afelik, S., & Jensen, J. (2013). Notch signaling in the pancreas: patterning and cell fate specification, 2 (August), 531–544. <https://doi.org/10.1002/wdev.99>.
- Ahnfelt-ronne, J., Jørgensen, M. C., Klinck, R., Jensen, J. N., Füchtbauer, E., Deering, T., Serup, P. (2012). DEVELOPMENT AND STEM CELLS Ptf1a-mediated control of Dll1 reveals an alternative to the lateral inhibition mechanism, 4492. <https://doi.org/10.1242/dev.090597>.
- Aljamie M., Lujain A., Rawan N., Elsayed L. (2016). Dental Pulp Stem Cells, a New Era in Regenerative Medicine: A Literature Review. *Open Journal of Stomatology*. 6, 155-163.
- Altucci, L., & Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(3), 181–193. <https://doi.org/10.1038/35106036>
- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 2014. 37:1. 514-579.
- Angelis, D., Lendahl, U., Hrabe, M., & Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation, 400(August), 14–16.
- Arefeh J., Mohammad T., Saeid A., Zahra P., Amir A., Masoud S., (2014)., Generation of high-yiel insulin producing cells from human bone marrow Mesenchymal stem cell. *Mol. Biol. Rev.* 41:4783-4794.doi: 10.1007/s11033-014-3349-5.
- Arefeh J., Mohammad T., Saeid A., Zahra P., Amir A., Maryam L., Niknam L., Masoud S., (2015)., The generation of insulin producing cells from human Mesenchymal stem cells by MiR-375 and anti-MiR-9. *Plos One* 10(6): e0128650. doi: 10.1371/journal. Pone.0128650.
- Arévalo-Romero A.J., Páez-Guerrero, D.M, Rodríguez-Pardo V.M., Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Publicación científica en ciencias biomédicas*. 2007. Vol. 5. 1794-2470.

BIBLIOGRAFÍA

- Arman, E.; Haffner-Krausz, R.; Chen, Y.; Heath, J.K.; Lonai, P. 1998, “Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5082–5087.
- Baumgartner, B. K., Cash, G., Hansen, H., Ostler, S., & Murtaugh, L. C. (2014). Distinct requirements for beta-catenin in pancreatic epithelial growth and patterning. *Developmental Biology*, 391(1), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.03.019>.
- Beucher, A., Gjernes, E., Collin, C., Courtney, M., & Meunier, A. (2012). The Homeodomain-Containing Transcription Factors Arx and Pax4 Control Enteroendocrine Subtype Specification in Mice, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036449>.
- Bhuvaneshwari S, Anuradha CV. Astaxanthin prevents loss of insulin signaling and improves glucose metabolism in liver of insulin resistant mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90(11):1544-52
- Bhuvaneshwari S, Yogalakshmi B, Sreeja S et al. Astaxanthin reduces hepatic endoplasmic reticulum stress and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in high fructose and high fat diet-fed mice. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(2):183-91.
- Bilezikjian, L.M.; Corrigan, A.Z.; Vale, W. 1990. “Activin a modulates growth hormone secretion from cultures of rat anterior pituitary cells”. *Endocrinology*, 126, 2369–2376.
- Böttcher, Ralph T., y Christof Niehrs. 2005. “Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development”. *Endocrine Reviews* 26(1): 63–77.
- Bouwens, L. U. C., & Rooman, I. (2005). Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiol Rev*, 85(68), 1255–1270. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2004>.
- Cai, Jun et al. 2010. “Generation of homogeneous PDX1+ pancreatic progenitors from human ES cell-derived endoderm cells”. *Journal of Molecular Cell Biology* 2(1): 50–60.

BIBLIOGRAFÍA

- Chiang, M.K.; Melton, D.A. 2003” Single-cell transcript analysis of pancreas development”. *Dev. Cell*, 4, 383–393.
- D’Amour, Kevin A et al. 2006. “Production of pancreatic hormone–expressing endocrine cells from human embryonic stem cells”. *Nature Biotechnology* 24(11): 1392–1401. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt1259>.
- Desgraz, R., & Herrera, P. L. (2009). Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors, 3574, 3567–3574. <https://doi.org/10.1242/dev.039214>.
- Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lóra, J., & Zaret, K. S. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm, 881, 871–881.
- Gasa, R. (2009). CAPÍTULO 8 Desarrollo embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto, 125–137.
- Gimeno L. Ho Hyon S. Argibay F. et al., Terapia celular para el tratamiento de la diabetes: más allá de las células madre. *MEDICINA Buenos Aires*. 2011. 71:0025-7680. p. 267-273.
- Gioventu. S., Andriolo. G., Bonino F., Frasca S. Lazzari L., Montelatici L., Santoro M., Rebullia P. A novel method for banking dental pulp stem cells. Elsevier. 2012. 47: 199–206.
- Gittes, G. K. (2009). Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Developmental Biology*, 326(1), 4–35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- González A. Cultivos Celulares. Células madre y la regeneración ósea. Universidad de Salamanca. 2012.4:1 p. 223- 238.
- Grimmig, B., Kim, S. H., Nash, K., Bickford, P. C., & Douglas Shytle, R. (2017). Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration. *GeroScience*, 39(1), 19–32. <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9958-x>

BIBLIOGRAFÍA

- Halleux, C., Sottile, V., Gasser, J. a, & Seuwen, K. (2001). Multi-lineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 2(1), 71–76.
- Hart, A.; Papadopoulou, S.; Edlund, H. 2003, “Fgf10 maintains notch activation, stimulates proliferation, and blocks differentiation of pancreatic epithelial cells”. *Dev. Dyn.* 228, 185–193.
- Hernández-Ávila D. Gutiérrez P. Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud pública de México*. 2013. 2:55 129-136.
- Horbelt, Daniel et al. 2015. “Small molecules dorsomorphin and LDN-193189 inhibit myostatin/GDF8 signaling and promote functional myoblast differentiation”. *Journal of Biological Chemistry* 290(6): 3390–3404.
- Hung Ping Shih., Allen Wang., Maiké Sander., 2013. “Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis” *Rev. Cell Dev. Biol.* 2013. 29:81–105
- Huotari, M a, J Palgi, y T Otonkoski. 1998. “Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen.” *Endocrinology* 139(4): 1494–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528926>.
- INEGI. Estadísticas a propósito de la Diabetes. 2013. P 2-17.
- Jafarian, A., Taghikani, M., Abroun, S., Allahverdi, A., Lamei, M., Lakpour, N., & Soleimani, M. (2015). The generation of insulin producing cells from human mesenchymal stem cells by miR-375 and anti-miR-9. *PLoS ONE*, 10(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128650>
- Jafarian, Arefeh et al. 2014. “Generation of high-yield insulin producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells”. *Molecular Biology Reports* 41(7): 4783–94.
- Jeon-Hwan K., Soo-Wan N., Byung-Woo K., Woobong C., Jong-Hwan L., Wun-Jae K., Yung-Hyun C. Astaxanthin Improves Stem Cell Potency via an increase in the proliferation of neural progenitor cell. *Molecular sciences*. 2010. 11. 5109-5119.

BIBLIOGRAFÍA

- Jiang, Jianjie et al. 2007. “Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells”. *Stem Cells* 25(8): 1940–53. <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2006-0761>.
- Jiang, W., Sui, X., Zhang, D., Liu, M., Ding, M., Shi, Y., & Deng, H. (2011). CD24: A novel surface marker for PDX1-positive pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 29(4), 609–617. <https://doi.org/10.1002/stem.608>
- Kao, Shih Yi et al. 2015. “Comparisons of differentiation potential in human mesenchymal stem cells from Wharton’s jelly, bone marrow, and pancreatic tissues”. *Stem Cells International* 2015.
- Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B., & Aflatoonian, R. (2012). Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. *Journal of Visualized Experiments*, (69). <https://doi.org/10.3791/4372>
- Kim, W., Shin, Y., Kim, B., & Egan, J. M. (2010). Biochemical and Biophysical Research Communications Notch signaling in pancreatic endocrine cell and diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 392(3), 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.115>.
- Kopinke, D., Brailsford, M., Pan, F. C., Magnuson, M. A., Wright, V. E., & Murtaugh, L. C. (2013). NIH Public Access, 362(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.11.010>. Ongoing.
- Kopp, J. L., Dubois, C. L., Schaffer, A. E., Hao, E., Shih, H. P., Seymour, P. A., ... Sander, M. (2011). Sox9 + ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas, 665, 653–665. <https://doi.org/10.1242/dev.056499>.
- Kramer, Thomas, Boris Schmidt, y Fabio Lo Monte. 2012. “Small-molecule inhibitors of GSK-3: Structural insights and their application to Alzheimer’s disease models”. *International Journal of Alzheimer’s Disease* 2012.

BIBLIOGRAFÍA

- Kumar, S. 2014. “Recent Developments in β -Cell Differentiation of Pluripotent Stem Cells Induced by Small and Large Molecules”. *International Journal of Molecular Sciences* 15(12): 23418–47. <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/12/23418/>.
- Kunisada, Y., Tsubooka-Yamazoe, N., Shoji, M., & Hosoya, M. (2012). Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 8(2), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.10.002>
- L. Ramos, T., Sánchez-Abarca, L. I., Muntión, S., Preciado, S., Puig, N., López-Ruano, G., ... del Cañizo, C. (2016). MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Communication and Signaling*, 14(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0124-8>
- L'Amoreaux, William J et al. 2010. “Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines.” *Journal of biomedical science* 17 Suppl 1(Suppl 1): S11.
- Lane, Michelle A., y Sarah J. Bailey. 2005. “Role of retinoid signalling in the adult brain”. *Progress in Neurobiology* 75(4): 275–93.
- Masi, Susana, y Spanish National. 2016. Acciones del ácido retinoico en la diferenciación de células de neuroblastoma.
- Masthan, K. M. K., Leena Sankari, S., Aravindha Babu, N., & Gopalakrishnan, T. (2013). Mystery inside the tooth: The dental pulp stem cells. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(5), 945–947. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5379.2984>
- Mata-Miranda M. Sánchez-Monroy M, Vázquez-Zapién G. 2014. Investigación básica con células madre pluripotentes en la Escuela Médico Militar. 68:4 233-237.
- Nakanishi, M., & Hamazaki, T. S. (2007). Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00109.x>.

BIBLIOGRAFÍA

- Nekoei SM., Azarpira N., Sadeghi L., Kamalifar S., (2015)., In vitro differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to insulin producing clusters. *World J. Clin Cases.* 3(7): 640/9. doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.640.
- Norgaard, G.A.; Jensen, J.N.; Jensen, J. 2003. FGF10 signaling maintains the pancreatic progenitor cell state revealing a novel role of Notch in organ development. *Dev. Biol.*, 264, 323–338.
- Norrman, Karin, Anna Strömbeck, Henrik Semb, y Anders Ståhlberg. 2013. "Distinct gene expression signatures in human embryonic stem cells differentiated towards definitive endoderm at single-cell level". *Methods* 59(1): 59–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.03.030>.
- Olvera-Granados, C. P., Leo-Amador, G. E., & Hernández-Montiel, H. L. (2008). Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración? *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 65(4), 306–324.
- Olvera-Granados, Claudia Patricia, Guillermo Enrique Leo-Amador, y Hebert Luis Hernández-Montiel. 2008. "Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?" *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 65(4): 306–24.
- Ornitz, D M et al. 1996. "Receptor specificity of the fibroblast growth factor family". *J.Biol.Chem.* 271(25): 15292–97.
- Otonkoski, Timo et al. 1993. "Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells". *Journal of Clinical Investigation* 92(3): 1459–66.
- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., ... Melton, D. A. (2014). Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell*, 159(2), 428–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>
- Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas Organogenesis: From Bud to Plexus to Gland, (February), 530–565. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22584>.

BIBLIOGRAFÍA

- Pérez, J., Garza-Veloz. I., Ortiz-López R. Células madre. Medicina Universitaria 2007; 9(36):130-40
- Plan Nacional de Desarrollo. Gobierno de la República. Estados Unidos Mexicanos. Programa Sectorial de Salud. 2013-2018.
- Qu, X., Afelik, S., Nygaard, J., Bukys, M. A., Kobberup, S., Schmerr, M., ... Jensen, J. (2013). Notch-mediated post-translational control of Ngn3 protein stability regulates pancreatic patterning and cell fate commitment. *Developmental Biology*, 376(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.021>.
- Rai S. Kaur M. y Kaur S. Applications of Stem Cells in Interdisciplinary Dentistry and Beyond. *Annals of Medical and Health Sciences Research* 2013.3(2):245–254.[Internet]Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3728871/> 18 abril 2015.
- Ramesh B. Preethi S. Shikha S. Anujith K. Making surrogate cells from mesenchymal stromal cells: Perspectives and future endeavors. *Journal of Biochemistry & Cell Biology Elsevier*. 2014. 46. P. 90-102.
- Raof, M. Yaghoobi M. Ali D. Kamal A., Behnam E. Mehdi A. (2014). A Modified Efficient Method for Dental Pulp Stem Cell Isolation. *Dental Research Journal (Isfahan)*. 11, 244-250.
- Rezaia, Alireza et al. 2011. "Production of Functional Glucagon-Secreting alpha-Cells From Human Embryonic Stem Cells". *Diabetes* 60(1): 239–47.
- Rifas, Leonard. 2007. "The role of noggin in human mesenchymal stem cell differentiation". *Journal of Cellular Biochemistry* 100(4): 824–34.
- Ripps, Harris, y Wen Shen. 2012. "Review: taurine: a 'very essential' amino acid." *Molecular vision* 18(November): 2673–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170060><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3501277>.
- Sastre. J. Sabater L. y Aparisi L. Fisiología de la secreción pancreática. *Gastroenterol Hepatol*. 2005;28 (Supl 2):3-9.
- Schaffer, A. E., Taylor, B. L., Benthuisen, J. R., Liu, J., Thorel, F., Yuan, W., Sander, M. (2013). Nkx6.1 Controls a Gene Regulatory Network

BIBLIOGRAFÍA

- Required for Establishing and Maintaining Pancreatic Beta Cell Identity. *PLoS Genetics*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003274>
- Schiesser V., Wells M. Generation of β cells from human pluripotent stem cells: Are we there yet? *NIH Public Access* 2014. 1311: 124–137.
 - Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Conners, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., ... German, M. S. 2000. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas, 3542, 3533–3542.
 - Seamon, K. 1983. "Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives". *Journal of Medicinal Chemistry* 26(3): 436–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6681845> <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm00357a021>.
 - Seamon, Kenneth B K.B. B, William Padgett, y John W J.W. W Daly. 1981. "Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(6): 3363–67. <http://www.pnas.org/content/78/6/3363.short>.
 - Seymour, P. A., & Sander, M. (2011). Historical Perspective: Beginnings of the β -Cell Current Perspectives in β -Cell Development. <https://doi.org/10.2337/db10-1068>.(a)
 - Seymour, P. A., Shih, H. P., Patel, N. A., Freude, K. K., Xie, R., Lim, C. J., & Sander, M. (2012). A Sox9 / Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity, 3372, 3363–3372. <https://doi.org/10.1242/dev.078733>.
 - Shih, H. P., Wang, A., & Sander, M. (2013). Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>.
 - Shih, H. P., Wang, A., & Sander, M. (2013). Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(1), 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>

BIBLIOGRAFÍA

- Takeuchi, H., Nakatsuji, N., & Suemori, H. (2014). Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Scientific Reports*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep04488>
- Tébar Massó F.J., Escobar-Jiménez F. La Diabetes Mellitus en la práctica clínica. Buenos Aires Madrid: Panamericana 2009.
- Totsuka, Y.; Tabuchi, M.; Kojima, I.; Shibai, H.; Ogata, E. 1988., “A novel action of activin A: Stimulation of insulin secretion in rat pancreatic islets”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 335–339.
- Uchiyama, K., Naito, Y., Hasegawa, G., Nakamura, N., Takahashi, J., & Yoshikawa, T. (2002). Astaxanthin protects β -cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*, 7(5), 290–293. <https://doi.org/10.1179/135100002125000811>
- Villasenor, A., Chong, D. C., Henkemeyer, M., & Cleaver, O. (2010). Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis, 4305, 4295–4305. <https://doi.org/10.1242/dev.052993>.
- Xue, X.-L., Han, X.-D., Li, Y., Chu, X.-F., Miao, W.-M., Zhang, J.-L., & Fan, S.-J. (2017). Astaxanthin attenuates total body irradiation-induced hematopoietic system injury in mice via inhibition of oxidative stress and apoptosis. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0464-3>
- Ye, Shoudong et al. 2012. “Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains”. *PLoS ONE* 7(4).
- Yu, Paul B et al. 2009. “and Iron Metabolism”. 4(1): 33–41.
- Yukiya K., Toshiyuki Y., Daiji K., Kana I., Nobuyuki T., Shin-Ichi H., Hidetoshi Y., Origins and Properties of Dental, Thymic, and Bone Marrow Mesenchymal Cells and Their Stem Cells. 2012. *PLoS ONE* 7(11): e46436.
- Zanini, C., Bruno, S., Mandili, G., Baci, D., Cerutti, F., Cenacchi, G., ... Forni, M. (2011). Differentiation of mesenchymal stem cells derived from pancreatic islets and bone marrow into islet-like cell phenotype. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028175>.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., ... Deng, H. (2009). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Research*, 19(4), 429–438. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.28>.

12. ANEXOS

12.1. PRODUCTOS ACADÉMICOS

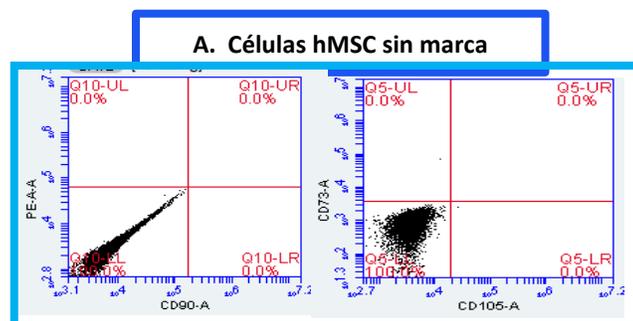
1. Participación como Instructor en el **Taller: aislamiento y cultivo de células madre de pulpa dental** efectuado en el Congreso Nacional de Células madre y medicina regenerativa 2016.
2. Presentación de cartel en el Congreso Internacional Avances en Medicina Hospital Civil de Guadalajara 2017, con el trabajo titulado “**Protocolo de diferenciación de células madre de pulpa dental hacia células productoras de insulina**”. Memoria ISSN:2007-2139.
3. Presentación de cartel en Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía con el trabajo titulado “**Aislamiento, cultivo y caracterización de células madre de pulpa dental de población mexicana: perspectivas en el desarrollo de terapia celular**”. Memoria en extenso ISBN: en trámite
4. Solicitud de patente titulada “**Método de diferenciación de células troncales provenientes de diferentes nichos para la obtención de células productoras de insulina**”. Folio: MX/a/2017/016586
5. Trabajo publicado en la revista de Ciencias de la Salud “**Archivos de Ciencia**”. ISSN: 2428-8747. Volumen 3, suplemento 1, agosto-diciembre 2017, titulado: “**Células madre de la pulpa dental (DPSC): prospectivas terapéuticas en enfermedades crónico degenerativas**”.

12.2. Aspectos éticos y legales para la colecta de las piezas dentales

Para la colecta de órganos dentarios se llevó a cabo el procedimiento de la Ley General de Salud. El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Civil Dr. Juan I. Menchaca, el comité de investigación y se anexó un comité de cirugía. El muestreo se realizó bajo consentimiento informado de los pacientes.

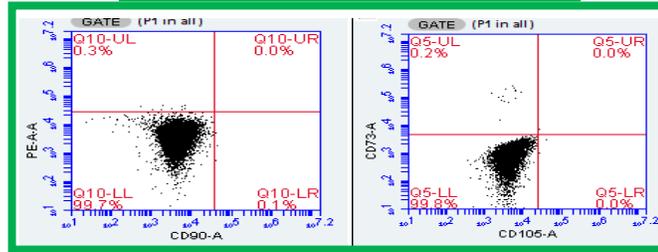
12.3. Caracterización del modelo de trabajo del análisis de receptores característicos de hMSC.

El modelo de trabajo establecido para el análisis de marcadores característicos de células troncales mesenquimales contempla los controles correspondientes a células sin marcar con los anticuerpos (A), estos controles son útiles para determinar la auto-fluorescencia de las células de estudio, de esta forma es posible descartar la intensidad emitida por las células. Se utilizaron controles de isotipos (B), es decir, fluorocromos no dirigidos hacia una proteína específicamente, son útiles para descartar la posible inespecificidad de los fluorocromos utilizados en el análisis. Se utilizó la expresión de anticuerpos CD44, CD90, CD73 y CD105 de manera individual (C). Finalmente se analizó la expresión de marcadores de tipo hematopoyéticos mediante una combinación de estos (D).

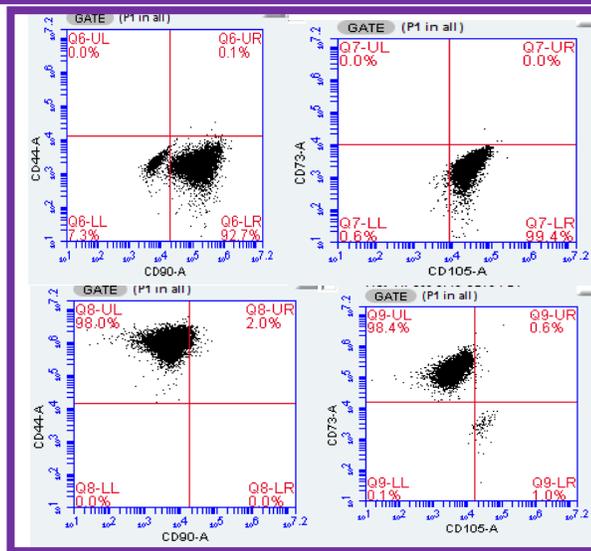


ANEXOS

B. Control de isotipo



C. Expresión de marcadores CD90, CD44, CD105 Y CD73



D. Expresión de marcadores de tipo hematopoyético y control de isotipo

