EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE TGF-β DE LAS CÉLULAS TRONCALES DE PULPA DENTAL, ESTIMULADAS CON IFN-γ Y TNF-α.

Mayra Alejandra Arenas Vigil
Silvia Natalia Díaz Hernández
Lucero Vanessa Otálora Ladino
Katherine Julieth Sanabria Blanco

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC.- MAYO 2019

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Evaluación de la secreción de TGF-β de las células troncales de pulpa dental, estimuladas con IFN-γ y TNF-α.
Grupo de Investigación	Unidad de Investigación Básica Oral U.I.B.O
Línea de investigación:	Regeneración Tisular & Células Stem en Odontología
Trabajo de grado derivado del proyecto	Evaluación de la inmunomodulación de las células madre de pulpa dental, estimuladas con IFN-γ y TNF-α.
Tipo de investigación:	Pregrado/grupo
Estudiantes:	Mayra Alejandra Arenas Vigil Silvia Natalia Díaz Hernández Lucero Vanessa Otálora Ladino Katherine Julieth Sanabria Blanco
Director:	Dr. Juan Carlos Munévar Niño
Codirector:	Dra. Martha Cecilia Tamayo Muñoz
Asesor científico	Dr. Miguel Hernando Parra Ávila
Asesor estadístico	Dr. David Díaz Báez

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector[a]
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector[a] Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. En primer lugar, queremos agradecer a nuestras familias por el apoyo emocional durante este proceso. Agradecemos al Doctor Juan Carlos Munévar director de este trabajo de grado y a la Doctora Martha Cecilia Tamayo co-directora, quienes creyeron en este proyecto y nos apoyaron de manera personal y académica. Culminamos este proceso con la satisfacción de haber realizado nuestro mayor esfuerzo.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen
Abstract

	Pág.
Introducción	**1**
2. Marco teórico	**4**
3. Planteamiento del problema	**13**
4. Justificación	**18**
5. Situación Actual	**19**
6. Objetivos	**20**
6.1 Objetivo general	**20**
6.2 Objetivos específicos	**20**
7. Metodología del Proyecto	**21**
7.1.Tipo de estudio	**21**
7.2. Población y muestra	**21**
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información	**22**
7.4. Plan de tabulación y análisis.	**24**
7.5 Hipótesis de estudio	**25**
a. Hipótesis estadísticas.	**25**
b. Estadística descriptiva.	**25**
8. Consideraciones éticas.	**26**
a. Sustento legal	**27**
9.. Resultados	**28**
11.1.Fase descriptiva	**28**
11.2.Fase analítica	**28**
10. Discusión	**33**
11. Conclusiones	**36**
12. Referencias bibliográficas	**37**

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE TGF-β DE LAS CÉLULAS TRONCALES DE PULPA DENTAL, ESTIMULADAS CON IFN-γ Y TNF-α.

Antecedentes: Se ha demostrado que las células troncales de pulpa dental humana [DPSC´s] tienen la capacidad de secretar factores solubles característicos anti-inflamatorios como el factor de crecimiento transformante beta [TGF-β] sin afectar sustancialmente la proliferación y capacidad de supervivencia celular, cuando son estimuladas por citoquinas como el interferón gamma [IFN-γ] y factor de necrosis tumoral alpha [TNF-α]. El TGF-β es una de las citoquinas más producida por las DPSC´s ante reacciones inmunológicas, inhibie la proliferación y activación de las células T por medio del dipropano de metilo-1 y la indometacina; además permite la activación de las células T reguladoras por una disminución de la IL-17 en el microambiente, diferenciando las DPSC´s a un perfil osteogénico que permita la regeneración ósea. **Objetivo:** Evaluar la capacidad de secreción TGF- β de las células troncales de pulpa dental bajo el estímulo de las citoquinas IFN-γ y TNF-α en un modelo in vitro. **Métodos:** Se utilizaron DPSC´s post-criopreservadas, cada muestra estuvo constituida pozos de 1000, 500 o 250 células que fueron estimuladas por dos citoquinas; TNF-α y IFN- γ, a tres concentraciones [200ng/ml, 100ng/ml o 50ng/ml]. La secreción de TGF-β fue evaluada 24 horas después de haber sido estimuladas mediante la técnica de ELISPOT. Los datos fueron analizados estadísticamente por la prueba de prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney**. Resultados:** La estimulación con IFN-γ a diferentes concentraciones no demostró una diferencia significativa, pero si entre los diferentes números de células, debido a que se observó que a menor número de células hubo mayor producción de TGF – β. Se evidenció secreción eventual de TGF- β, bajo el estímulo de TNF-α de las DPSC's a las diferentes concentraciones, así como en diferentes cantidades celulares. **Conclusiones:** De acuerdo a las limitaciones de este estudio se puede concluir que hubo más secreción de TGF- β al ser estimulada con IFN-γ que con TNF-α sin embargo no fue estadísticamente significativo.

Palabras clave: Células troncales de pulpa dental, IFN-y, TNF- α, TGF-β, Inmunomodulación.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE TGF-β SECRETION OF DENTAL PULP STEM CELLS STIMULATED WITH IFN-γ AND TNF-α.

Background: It has been proven that human dental pulp stem cells DPSCs have the ability to secrete characteristic anti-inflammatory soluble factors such as the transforming growth factor beta TGF-β without substantially affecting proliferation and cell survival capability when stimulated with cytokines such as interferon gamma IFN-γ and the tumour necrosis factor alpha TNF-α. The TGF-β is one the most produced cytokines by DPSCs due to immunological reactions, hinders proliferation and activation of T cells by means of metil-1 dipropylene and indomethacine; additionally, it allows the activation of regulating T cells by a decrease of IL-17 in the micro-environment, differentiating the DPSCs to an osteogenic profile which permits osseous regeneration. **Objective:** to evaluate the secretion of TGF- β from DPSCs stimulated by cytokines IFN-γ and TNF-α in an *in-vitro* model. **Methods:** Post-cryopreserved DPSCs were used in samples of 1000 cells, 500 cells or 250 cells stimulated by IFN-γ and TNF-α in concentrations of 200ng/ml, 100ng/ml o 50ng/ml. The secretion of TGF-β was evaluated 24 hours later with the ELISPOT technique and data was analysed statistically with the Kruskal-Wallis and U de Mann-Whitney tests. **Results:** The stimulus with different concentrations of IFN-γ did not present a significant difference, as it did among varying cell counts where it was seen that lower cellular concentration generated higher TGF – β production. There was also evidence of TGF – β secretion stimulated by DPSCs TNF-α with different concentrations and cell quantities. **Conclusions:** the limitations of the present study allow to conclude that there was greater secretion of TGF- β when stimulated with IFN-γ than with TNF-α. However, this was not statistically significant.

Key words: dental pulp stem cells, IFN-y, TNF- α, TGF-β, immunomodulation.

.

1. INTRODUCCIÓN

El rechazo del trasplante celular alogénico de células troncales mesénquimales tiene como principal causa la activación del sistema inmune cuando estás células son trasplantadas. Actualmente para prevenir el rechazo de los trasplantes, se utiliza una terapia con fármacos anti-inflamatorios, esteroideos y corticoesteroides, para inmunosuprimir al paciente y evitar el rechazo del injerto, inhibiendo la actividad de los linfocitos TCD4 y TCD8 y mediando la activación de los Treg, Se puede presentar una inmunosupresión inadecuada debido a la incompatibilidad con HLA, a menudo por antecedentes de rechazo agudo. [Golshayan et al., 2008].

Los corticoides están dentro de los tratamientos inmunosupresores más usados, estos compuestos son moléculas lipofílicas que disminuyen la expresión de varias citoquinas proinfllamatorias y de moléculas como el factor de crecimiento de plaquetas, el factor de necrosis tumoral y la interleucina-α1 tisular, disminuyendo la quimiotaxis, el estímulo mitogénico de otras células inflamatorias y la infiltración de macrófagos en la herida. [Wang *et al*. 2013]. Sin embargo, el tratamiento con estos fármacos tiene limitaciones ya que el mecanismo molecular de los corticoides afecta todas las etapas del proceso de cicatrización (anti-inflamatoria, proliferativa y de remodelación). A pesar del uso de este tipo de fármacos, el rechazo a los tejidos injertados se sigue presentando. Como terapia alternativa surge la posibilidad de modular la inmunidad estimulando células del sistema inmune con actividad reguladora para evitar la activación de las células efectoras evitando el uso de fármacos inmunosupresores. Sin embargo, es indispensable conocer el funcionamiento de las vías inmunomoduladoras mediadas por las células inmunes [Golshayan *et al,* 2008].

Las investigaciones realizadas en regeneración donde usan células troncales obtenidas de médula ósea, timo, cordón umbilical, demuestran que existen diferentes mecanismos de modulación de la respuesta inmune. Algunos de estos afectan las células del sistema inmune innato, como lo son las células asesinas naturales [NK] y las células dendríticas, mientras que otros actúan inhibiendo las células del sistema inmune adaptativo como, linfocitos T y linfocitos B [Aileen *et al.,* 2017].

Las células troncales mesenquimales [MSC] afectan las células NK estimuladas con IL-2 disminuyendo su proliferación, fenotipo, potencial citotóxico y secreción de IFN-γ. Se ha demostrado que las células troncales disminuyen la proliferación de los linfocitos B manteniendo a las células en las fses G0/G1 del ciclo celular. En cuanto a los linfocitos T, se ha demostrado que las MSC afectan la activación, proliferación, diferenciación y función efectora [Ding *et al.,* 2015; Aileen *et al.,* 2017]. La inmunosupresión ejercida por las DPSC's se lleva a cabo por medio de mecanismos independientes y dependientes del contacto celular. Entre los factores inmunomoduladores secretados por las DPSC's se han identificado TGF-β, HGF, PGE2, IL-10, IL-6, IL-17. Mientras que en los mecanismos dependientes del contacto célula-célula, se ha involucrado a las moléculas PD-L1 y HLA-G1 [Ding et al., 2015].

Sin embargo, hay pocos estudios acerca del papel inmunomodulador de las células troncales de pulpa dental en seres humanos [Macias et al., 2010]. Por lo tanto, es necesario conocer más sobre los mecanismos inmunoreguladores de las células troncales para en un futuro plantear la posibilidad de establecer una terapia segura basada en el cultivo de células troncales con el objetivo de generar sustitutos tisulares, órganos *in vitro* o reparar tejidos con lesiones de tamaño crítico [Shi M. *et al.*, 2011], además de sustituir la falta de donantes y evitar el rechazo del aloinjerto por parte del huésped permitiendo el avance de la terapia regenerativa especialmente en odontología, en donde sería de gran impacto para el éxito de los tratamientos [Huang *et al.*, 2008].

En protocolos de injertos o trasplantes celulares, se ha observado que las DPSC's tienen baja capacidad inmunogénica y modulan la respuesta inmune [Polchert *et al.,* 2008]. Algunos estudios han mostrado que las MSCs de la cavidad oral tienen la capacidad de tratar la osteonecrosis inducida por medicamentos de la mandíbula incrementando el número de células T reguladoras e inhibiendo la proliferación de células Th17 en un modelo *in vitro* en ratones [Kikuiri *et al.*, 2010] Además de la reparación de defectos óseos cráneo-faciales [Zheng et al., 2009] en un estudio en cerdos, también se ha observado que están involucradas en la regeneración del complejo dentinopulpar [Huang *et al.*, 2008; Gronthos *et al*., 2000], incluso, se ha identificado que las células del ligamento periodontal [PDLSCs], de la médula ósea [BMSCs], y de la pulpa dental [DPSC's] poseen capacidad inmunomoduladora inhibiendo

la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica [PBMCs], [Pierdomenico *et al*., 2005].

El TNF-α e IFN-γ son factores solubles que a pesar de que son capaces de estimular las DPSC's para inducir una mayor inmunomodulación de la respuesta inmune, también pueden inducir un cambio en el fenotipo de las células troncales que les impide una correcta proliferación y diferenciación afectando la expresión de la molécula STRO-1. La función del IFN se inhibe por la secreción de TGF-β e IL-10, el uso de glucocorticoides, así como por el inmunosupresor ciclosporina-A. [Mata *et al.,* 2008].

El TGF-β es una citoquina que pertenece a un gran grupo de polipéptidos extracelulares con características estructurales comunes. Esta citoquina participa en procesos de crecimiento, desarrollo, diferenciación y homeostasis a través de su interacción con receptores en la membrana celular. Existen diferentes isómeros definidos según el tipo de receptor de membrana. TGF-β1, TGF-β2, y TGF-β3 son homólogas entre sí y se han encontrado en todos los mamíferos. Estos forman una familia de receptores de tipo glicoproteínas transmembranales con un dominio serina-treonina-kinasa en la parte intracelular, un dominio transmenbranal y un dominio extracelular corto, rico en cisteína y N-glicósido2. Está implicado en el crecimiento del tejido conectivo favoreciendo la quimiotaxis de fibroblastos, macrófagos, linfocitos y estimulando la reparación de tejidos [Prieto *et al.,* 2002]. Por otro lado, tiene actividad inhibitoria sobre las células epiteliales y endoteliales, e incluso sobre las funciones inmune y hematopoyética,

Por tal razón se evaluará la capacidad de secreción TGF-β de las células troncales de pulpa dental bajo el estímulo de las citoquinas IFN-γ y TNF-α a diferentes concentraciones y en diferentes tiempos, en un modelo *in vitro* utilizando el método de ELISPOT.

2. MARCO TEÓRICO

Resumen de búsqueda de información

Se definieron las siguientes variables

IFN-γ: El interferón es una proteína secretada por células de vertebrados en respuesta a una amplia variedad de inductores. Confiere resistencia contra muchos virus, inhibe la proliferación de células normales y malignas, impide la multiplicación de parásitos intracelulares, aumenta la fagocitosis de macrófagos y granulocitos, aumenta la actividad de las células asesinas naturales y muestra varias otras funciones inmunomoduladoras [Termino MeSH, 1983]. El interferón gamma es producido en mayor cantidad por los linfocitos activados mitogénica o antigénicamente. Es estructuralmente diferente a los interferones de tipo I y su función principal es la inmunorregulación. El interferón gamma se encuentra implicado en la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II en células que normalmente no los producen, lo que conduce a enfermedades autoinmunes [Termino MeSH 2009].

TNF-α: Glicoproteína sérica producida por macrófagos activados y otros leucocitos mononucleares de mamíferos. Tiene actividad necrosante contra líneas celulares tumorales y aumenta la capacidad de rechazar trasplantes de tumores. También conocido como TNF-α, es homólogo al TNF-α[LIFNOTOXINA] solo en un 30%, pero comparten los receptores de TNF- α. [Término MeSH 2005].

TGF- β: Un factor sintetizado en una amplia variedad de tejidos. Actúa sinérgicamente con TGF-α para inducir la transformación fenotípica y también puede actuar como un factor de crecimiento autocrino negativo. TGF-β tiene un papel potencial en el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, la secreción de hormonas y la función inmune. TGF- β se encuentra principalmente como formas de homodímero de productos génicos separados TGF- β1, TGF-β2 o TGF- β3. Se han aislado heterodímeros compuestos por TGF- β1 y 2 [TGF- β: 1.2] o de TGF- β: 2 y 3 [TGF- β: 2.3]. Las proteínas TGF- β se sintetizan como proteínas precursoras. [Término MeSH 1991].

Células Troncales de pulpa dental: Células relativamente indiferenciadas que retienen la capacidad de dividirse y proliferar a lo largo de la vida posnatal para proporcionar células progenitoras que pueden diferenciarse en células especializadas. [Término MeSH, 1984].

Se consultaron las siguientes bases de datos:

PUBMED, MEDLINE vía OVID y EMBASE vía OVID.

Se utilizaron las siguientes palabras clave:

Dental pulp stem cells, IFN-y, TNF-α, TGF-β, Immunity, in vitro, Regenerative Dentistry, Modulation, Secretion.

Se utilizaron las siguientes estrategias de búsqueda:

Estrategias de búsqueda [Tabla N° 1]

#1	[Immunomodulation] OR [immune response modulation] OR [Immunomodulations]
#2	[Dental Pulp Stem Cell] OR [Cell, Stem]
#3	[Cytokine] OR [Transforming Growth Factor beta] OR [Interferon-gamma] OR [tumor necrosis factor alpha]
#4	#1 AND #2
#5	#1 AND #3
#6	#1 AND #2 AND #3

Se buscaron los siguientes tipos de estudio:

Se revisaron estudios *in vitro* sobre células adherentes y ELISPOT, evaluación de la secreción de las citoquinas de células troncales de pulpa dental. Se encontraron 9.069, 348.934, 289.020 artículos respectivamente en las siguientes bases de datos; MEDLINE vía OVID, EMBASE vía OVID y PUBMED, de los cuales se seleccionaron por título 72, por abstracts 68 y de estos se seleccionaron 52 por relevancia.

Se excluyeron aquellos artículos publicados hace más de 10 años y aquellos que no fueran en inglés o español.

MARCO DE REFERENCIA

La medicina regenerativa se fundamenta en el uso de trasplantes celulares autólogos o de células troncales de médula ósea a tejidos lesionados, para regenerar el tejido o disminuir el daño tisular. Para éste tipo de procedimientos se usan varias poblaciones celulares de la medula ósea. Dentro de estas se destacan las células troncales hematopoyéticas, las mesenquimales o estromales, las células mononucleadas, las multinucleadas y las células

multipotentes, [MAPC]. Las células troncales hematopoyéticas [CMH] tienen la capacidad de reproducirse por sí mismas, de diferenciarse a células troncales de la línea hematopoyética y, por su plasticidad, también a tejidos no hematopoyéticos como músculo, hígado, vasos sanguíneos, tejido nervioso y piel [Macias *et al.*, 2010; Phinney *et al.*, 2007]. Existen diversas fuentes de obtención de células troncales mesenquimales dentro de las cuales la médula ósea es la principal fuente de aislamiento, aunque también se han aislado de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal [Arévalo *et al*.,2007].

No obstante, los tejidos más empleados son la medula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo. Aunque la médula ósea es la mejor fuente de obtención, existen algunos aspectos que dificultan su uso como son su limitada tasa de crecimiento, la capacidad de diferenciación de acuerdo a la edad del donante de la médula y el riesgo en la toma de muestra [Arévalo *et al*., 2007]. La constitución celular de la médula ósea es heterogénea incluyendo células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y células osteogénicas, por lo que no se puede extraer poblaciones celulares purificadas. Su diversidad celular constituye la fuente principal y son referente para la realización de trasplantes celulares y la regeneración de los tejidos.

En cuanto a la obtención de células madre mesenquimales a partir de sangre de cordón umbilical, se requiere de procesos muy especializados para lograr un cultivo exitoso. Factores como el tiempo de recolección, un procesamiento inferior a 16 horas, así como el volumen de sangre recolectado igual o superior a 30 ml son importantes para cultivar estás células [Bieback et al., 2004].

Respecto al aislamiento y cultivo a partir de tejido adiposo, las células obtenidas de esta fuente tienen una morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación *in vitro* similar a las obtenidas de médula ósea, tienen una mayor capacidad de proliferación y es posible acceder más fácilmente a muestras de tejido adiposo a través de procedimientos como liposucción o abdominoplastia [Wu *et al.*, 2017].

Adicionalmente, también es posible usar células troncales obtenidas de cavidad oral, que tiene a favor que ocasionan un trauma mínimo para el individuo durante su obtención [Romero *et al.*, 2014]. Las células troncales de la cavidad oral son las obtenidas de la papila apical [SCAP] [Sonoyama *et al.,* 2006] ligamento periodontal [PDLSCs] [Seo *et al.,* 2004], dientes temporales exfoliados [SHED] [Miura *et al.,* 2003], germen dental [DFSCs] [Morsczeck *et al.,* 2005] y pulpa dental [DPSC'S] [Gronthos *et al.,* 2000]. Las células troncales de pulpa dental se destacan por conservar las propiedades de auto renovación, adherencia al plástico, diferenciación en varios linajes celulares como adipocitos, osteoblastos y odontoblastos. Estas células expresan los marcadores CD90, CD73 y CD44, además de una baja expresión de antígeno leucocitario humano [HLA] de clase I y II [Gronthos *et al*., 2000; Macias *et al.*, 2010].

Las células troncales son utilizadas hoy en día como alternativa de tratamiento para la regeneración de tejidos, debido a su gran capacidad de diferenciación en varios linajes celulares [músculo, hígado, vasos sanguíneos, tejido nervioso, cartílago, músculo, tendón, piel y grasa], como también la capacidad de autorrenovación y modulación la respuesta inmune. [Macias *et al.*, 2010; Montoya et al., 2010].

El potencial terapéutico que poseen las células troncales de pulpa dental [DPSC's] es enorme, por esa razón es importante proponer el desarrollo de tratamientos basados en estas células para los pacientes que padecen de patologías irreversibles como enfermedades crónicas degenerativas, cáncer o lesiones de tamaño crítico que comprometen la capacidad de reparación tisular. Para garantizar el éxito de estas terapias es fundamental conocer los mecanismos involucrados en el rechazo del injerto y en la tolerancia inmunológica [Macias et al., 2010].

Las células troncales son hipoinmunogenicas debido a que no expresan antígenos de clase II y otras moléculas coestimulatorias del sistema inmunológico. Además, previenen la activación de las células T indirectamente a través de la modulación de las células dendríticas, inhiben la proliferación y producción de IFN-γ de las células *natural killer* [NK], permiten la activación de las células Treg induciendo un microambiente supresor local a través de la producción de prostaglandinas y citoquinas anti-inflamatorias, así como por la expresión de indolamina- 2,3-dioxigenasa [IDO] [Golshayan *et al.*, 2008; Shi M. et al., 2011; Shi Y. *et al.*, 2012].

Las DPSC's tienen una alta capacidad de diferenciación que se aprovecha en los trasplantes celulares permitiendo la regeneración de tejidos orofaciales, esto a pesar de que estás células se exponen a un medio pro-inflamatorio en la cavidad oral de manera constante. Por lo tanto, estas células tienen un gran potencial para la aplicación clínica de la terapia regenerativa al verse involucradas en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el mantenimiento del homeostasis tisular, y el turn-over de algunos tejidos afectados durante el envejecimiento [Baum *et al.,* 2000; Siachoque *et al*., 2011]

La capacidad de regular la respuesta inmunológica por parte de las DPSC's se presenta por medio del contacto célula-célula y la secreción de factores solubles que forman un microambiente supresor. Dentro de los principales factores solubles se encuentran las quimiocinas, grupos de péptidos de bajo peso molecular, implicadas en la quimiotaxis y en la activación de los distintos tipos celulares que participan en la inflamación [Filella *et al.,* 2002].

La interleucina 6 [IL-6], es una proteína de cuatro hélices-alfa de 184 aminoácidos. El ADNc de la IL-6 se clonó en 1986 y se reconoció que la IL-6 pertenecía a una gran familia de citoquinas, que compartían la topología de proteínas de hélices-alfa y la unión las estas es gracias a un bucle largo que las une. El receptor de IL-6 [IL-6R], una proteína con dominio Ig, el cual se une a IL-6 con afinidad nanomolar. La unión de IL-6 al IL-6R no conduce, sin embargo, a la señalización. El complejo de IL-6 e IL-6R se asocia con la proteína gp130 induciendo así su dimerización e iniciando la señalización intracelular a través de la vía JAK / STAT 4. Otorgando a la célula un perfil inmunomodulador [Rose *et al.,* 2012].

La citoquina 2 [IL-2], a pesar de ser una citoquina clásica de una reacción proinflamatoria de la respuesta inmunológica, es producida normalmente por los linfocitos Treg y en menor proporción por los linfocitos CD8 y células NK. La secreción de IL-2 por los linfocitos CD8 disminuye la tolerancia inmunológica ejercida por las células Treg. A pesar de que las células troncales no demuestran ser secretoras de IL-2, el microambiente que generan inducen la diferenciación de los linfocitos T a Treg, para promover una modulación inmunológica indirecta [Boyman *et al.,* 2012].

La citoquina 10 [IL-10] es la principal citoquina antiinflamatoria, es producida por los linfocitos T de tipo Th2 y con capacidad de inhibir la síntesis de IFN-γ y de IL-2 por parte de

los linfocitos T pro inflamatorios, y de IL-1, IL-6 y TNF-α por parte de los macrófagos. [Fiella *et al;* 2002]

El Factor de crecimiento transformante beta [TGF-β] es la citoquina producida por las DPSC's en mayor concentración, fomentando microambiente supresor e incrementando la regeneración del tejido celular [Kyurkchiev *et al.*, 2014]. El TGF-β inhibe la proliferación y la activación de las células T por medio del dipropano de metilo -1 [1-MT] y la indometacina, además de permite la activación de las células T reguladoras por una disminución de la IL-17 principalmente en el microambiente celular [Flanders *et al., 2013*]. Las células troncales son potentes secretoras de TGF-β, lo que permite que favorezcan funciones reguladoras del sistema inmune [Yongkang *et al.,* 2017].

Los efectos ejercidos sobre la célula y el entorno celular, dependen de la concentración del TGF-β, inhibiendo o activando las células efectoras. Los principales efectos sobre las células efectoras son fomentar la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos y neutrófilos; aumentar las funciones efectoras y de memoria de los linfocitos T CD4+ antígeno-específico; estimular la secreción de IgA, IgG e IgM; inhibir la proliferación de linfocitos, células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos y ciertas líneas celulares tumorales. [*Peralta et al.*, 2001]

La señalización de TGF- β funciona a través de un sistema de proteínas de unión y un receptor de membrana, que puede incluir receptores tipo I y II [TβRI y TβRII, respectivamente], receptores tipo III [TβRIII o endoglina o CD105], β-glicano [también es un TβRIII], proteína de anclaje a GPI y BAMBI [receptor tipo I truncado natural]. La endoglina y el β-glicano pueden presentar el TGF-β al receptor tipo II que se complementa con el receptor tipo I y lo fosforila. Los receptores TβRI y TβRII son quinasas serina/treonina transmembranales, donde TβRI fosforila moléculas intracelulares. La señalización intracelular involucra a la familia de proteínas Smad, donde Smad-1 y Smad-2 son directamente fosforiladas por TβRI para luego formar un complejo con Smad-4. Este complejo entra directamente al núcleo donde interactúa con otros factores de transcripción para regular la transcripción. En contraste, Smad-7 inhibe la fosforilación de Smad-2 y Smad-3 en una retroalimentación negativa para prevenir la sobre estimulación de la célula mediante TGF-β [Flanders *et al.,* 2003; *Somoza, et al.,* 2015].

En contraste, la influencia de estas citoquinas para una respuesta inmunomoduladora eficaz de parte de las DPSC's *in vivo* es mínimo de 7 días, mientras que para que haya una activación completa de la respuesta inmune solo son necesarias 4 horas [Polchert *et al.,* 2008], por lo tanto, una respuesta reguladora por parte de se ve en desventaja frente a la reacción efectora que se desencadena rápidamente. Además, se ha reportado que las NKs activadas por medio de citoquinas, pueden lisar eficientemente MSCs tanto autólogas y alogénicas *in vitro* [Shi M. *et al.,* 2011]. También se ha observado que, las células T activadas pueden inducir la apoptosis de DPSC's a través de la vía del FAS/FASL [Zhao *et al.,* 2012]. Incluso, altos niveles de IDO aumentan secreción de IL-6 e inducen la diferenciación de células plasmáticas, lo que perjudica la proliferación y diferenciación de las DPSC's [Ucelli *et al.,* 2008]. Por el contrario, los estudios de Polchert *et al.,* [2008] y Sonoda *et al.,* [2016], reportaron una mayor supervivencia de un trasplante celular con una estimulación previa de IFN-γ, debido a un cambio fenotípico parcialmente desconocido, que permite modular la respuesta inmune, y así mejorar la proliferación y diferenciación celular [Polchert *et al.*, 2008; Ding *et al.,* 2015].

Por lo tanto, la presencia de un sistema regulador que limite la respuesta efectora del sistema inmunológico y permita mantener la tolerancia, mediado por la secreción de citoquinas anti-inflamatorias por parte de las DPSC's puede ayudar a evitar reacciones agresivas contra el injerto, con consecuencias graves para el paciente [Siachoque *et al.,* 2011].

Para evaluar la activación de las células inmunes se pueden usar diferentes técnicas de laboratorio. Por ejemplo, Ding *et al., en el* 2015 reportaron el uso de ensayos de proliferación de linfocitos, detección de citoquinas, cultivos transwell, experimentos de neutralización y citometría de flujo para examinar las características inmunes *in vitro* de las células troncales de pulpa dental, encontrando que estas células suprimen la proliferación de células T mediante la secreción de IL-10 [Ding *et al.,* 2015]

Las pruebas de ELISA son útiles para detectar y cuantificar sustancias como péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas en solución. Dependiendo del tipo de ELISA, se inmoviliza sobre una superficie sólida un anticuerpo o un antígeno, luego se adiciona la solución problema; la interacción antígeno-anticuerpo se evidencia mediante un anticuerpo unido a una enzima que produce una reacción colorimétrica cuantificable cuando se adiciona el sustrato específico de la enzima [Sonoda *et al.*, 2016]. La técnica de ELISA tiene varias ventajas entre ellas se destacan que es rápida, se pueden detectar muchos marcadores solubles, es fácil de evaluar, entre otras. Sin embargo, según algunos autores estás pruebas pueden presentar resultados inespecíficos porque algunos de los compuestos a evaluar se degradan rápidamente en diferentes puntos del procedimiento [Polchert *et al.*, 2008; Ding *et al.,* 2015; Sonoda *et al.*, 2016].

Este método de ELISA fue utilizado en el artículo titulado *¨Interferón-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells¨* de Sonoda *et al.,* [2016], en el cual se evaluó el efecto inmunomodulador de las DPSC´s en un proceso infamatorio irreversible y se comparó con otras DPSC´s de diente sano que se estimularon previamente con IFN-γ y TNF-α, ambas presentaron un perfil regulador de la respuesta inmunológica pero fue con el IFN-γ que hubo mejores resultados de estimulación celular.

Por otro lado, los protocolos de detección de citoquinas con ELISpot, refieren que es una técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas similar al ELISA; ya que todos los procedimientos experimentales se realizan bajo una misma microplaca de Difluoruro de polivinilideno, sobre la cual se unen analitos secretados por las células estimuladas a unos anticuerpos específicos adsorbidos sobre la placa. Las coloraciones obtenidas se pueden contar con un sistema automático de lectura ELISpot, o manualmente utilizando un estereomicroscopio [R&D/Protocolo]. Algunos Autores refieren mayor eficacia, especificidad y confianza con este tipo de prueba, ya que no existe el riesgo de que se descarten o pierdan en los medios de transporte sustancias a evaluar [Wu *et al.*, 2017].

La técnica se basa en la estimulación de las células por un período específico de tiempo en una microplaca que tiene adsorbidos los anticuerpos específicos contra el analito que se desea evaluar. Durante este período de incubación, el anticuerpo adsorbido inmoviliza el

analito que están secretando las células estimuladas. Posteriormente, se retiran las células y se añade a los pozos un anticuerpo policlonal biotinilado específico para el analito elegido. Después para revelar la reacción se agrega fosfatasa alcalina conjugada a estreptavidina y se agrega una solución de sustrato [BCIP / NBT]. Sobre la superficie de la placa se forman precipitados de color azul-negro que señalan la captura de las citoquinas secretadas por las células estimuladas [Wu *et al.*, 2017].

Usando técnicas combinadas de ELISA y Elispot, Wu *et al.*, [2017], evaluó la producción de IL-6 e IFN-*γ de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo demostrando que* el ELISPOT es una herramienta útil para poder identificar las células secretoras de citoquinas [Wu *et al.*, 2017].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El rechazo de aloinjerto es la primera causa de falla en los trasplantes de células madre, debido a que las MSCs en condiciones normales necesitan de la activación de una respuesta inmunológica que segregue factores solubles tanto para la activación de las MSCs como para la consecuente modulación de la respuesta inmune. Para evitar el rechazo de los trasplantes alogénicos, se usan fármacos anti-inflamatorios, esteroideos y corticoesteroides, los cuales son usados para inmunosuprimir al paciente y así evitar el rechazo del injerto. Sin embargo, aún con el uso de este tipo de fármacos se siguen presentando rechazos de injertos [Golshayan *et al.,* 2008].

Los corticoides son moléculas lipofílicas derivadas de la hormona endógena cortisol que se difunden en las células y terminan activando a los receptores de corticoides [RC]. Los RC activados se dimerizan y difunden dentro del núcleo, en donde pueden modular la transcripción genética, uniéndose a las regiones promotoras de genes susceptibles a estos compuestos. Los corticoides afectan las etapas del proceso de cicatrización de la herida divididas en 3 fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación. [Wang *et al.* 2013].

Inmediatamente después de la herida, las plaquetas y la cascada de la coagulación inician la hemostasia primaria y secundaria. Durante la hemostasia primaria, las plaquetas liberan numerosas citoquinas, incluyendo el factor de crecimiento transformante beta [TGF-β], que dispara la subsiguiente producción de factores adicionales de crecimiento, tales como el factor básico de crecimiento de fibroblastos [FGF], de las células cercanas. El andamiaje de malla de fibrina establecido durante la hemostasia secundaria, actúa como un reservorio para los factores de crecimiento y brinda una matriz para la futura síntesis de tejido. Además, los receptores unidos a la membrana celular, como la molécula de adhesión intercelular 1 [MAC-1], facilitan el reclutamiento de células inflamatorias. [Wang *et al.* 2013].

A los pocos minutos de la lesión, arriban los neutrófilos. Luego, en el curso de 2 o 3 días, los macrófagos se vuelven predominantes. El tratamiento con la corticoide dexametasona disminuye la expresión de citoquinas [incluyendo el TGF-β1], las plaquetas derivadas del factor de crecimiento, el factor de necrosis tumoral y la interleucina-α1 en el tejido y, por lo tanto, puede disminuir la quimiotaxis y el estímulo mitogénico para otras células

inflamatorias. La dexametasona también regula negativamente la expresión celular endotelial de la MAC-1 en cultivos y en anastomosis colónicas en proceso de cicatrización, resultando en una adhesión atenuada de granulocitos y migración. Concordante con ese hallazgo, los corticoides en altas dosis reducen la extensión de la infiltración de macrófagos en la herida. [Wang *et al*. 2013].

Las investigaciones realizadas en regeneración con células troncales obtenidas de médula ósea, timo, cordón umbilical, demuestran que existen diferentes vías para la modulación de la respuesta inmune, actuando en diversas células del sistema inmune innato, como lo son las células asesinas naturales [NK] y células dendríticas, y sistema inmune adaptativo los linfocitos T y linfocitos B [Aileen *et al.,* 2017]. Motivo por el cual es indispensable conocer con mayor profundidad las vías inmunomoduladoras de las células troncales las cuales pueden activarse con mayor rapidez evitando el fracaso de la terapia.

Las células troncales mesenquimales afectan la proliferación, el fenotipo, el potencial citotóxico y la secreción de IFN-γ por parte de las células NK previamente estimuladas con IL-2. [Aileen *et al.,* 2017]. Aunque existen pocas investigaciones de la actividad de las células troncales mesenquimales sobre los linfocitos B, se ha demostrado que las células troncales disminuyen la proliferación de estas células por detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y no por apoptosis. En cuanto a los linfocitos T se ha demostrado que las células troncales mesenquimales afectan la activación, proliferación, diferenciación y función efectora [Aileen *et al.,* 2017].

La inmunosupresión ejercida por las DPSC's se lleva a cabo por medio de mecanismos independientes y dependientes del contacto celular. Entre los factores secretados por las DPSC's se han identificado TGF-β, HGF, PGE2, IL-10, IL-6, IL-17. Mientras que en los mecanismos dependientes del contacto célula-célula, se ha involucrado a PD-L1 y HLA-G1 [Aileen *et al.,* 2017]. Sin embargo, hay pocos estudios acerca del papel inmunomodulador de las células troncales de pulpa dental en seres humanos [Macias *et al.*, 2010]. Es fundamental estudiar las propiedades inmunomoduladoras de estas células para su aplicación en humanos, así como también para establecer bancos de células troncales mesenquimales [MSCs=Mesenchymal Stem Cells] alogénicas, con el fin de utilizarlas en posibles terapias celulares aprovechando su capacidad de proliferación y diferenciación para estimular la

regeneración tisular. Para cumplir éste objetivo es necesario diseñar terapias seguras basadas en el cultivo de células troncales con el objetivo de generar sustitutos tisulares, órganos *in vitro* o reparar tejidos con lesiones de tamaño crítico [Shi M. *et al.*, 2011]. Además, también se busca en un futuro sustituir la falta de donantes y evitar el rechazo del aloinjerto por parte del huésped permitiendo el avance de la terapia regenerativa en odontología, en donde sería de gran impacto para el éxito de los tratamientos regenerativos [Huang *et al.*, 2008].

Las MSCs de la cavidad oral se pueden usar para tratar la osteonecrosis de la mandíbula incrementando el número de células T reguladoras e inhibiendo la proliferación de células Th17 [Kikuiri *et al.*, 2010]. Además de la reparación de defectos óseos cráneo-faciales [Zheng et al., 2009], también se ha observado que estas células pueden ser usadas en la regeneración del complejo dentinopulpar [Huang *et al.*, 2008; Gronthos *et al*., 2000]. Otras líneas como las células del ligamento periodontal [PDLSCs], las de la médula ósea [BMSCs], y las de la pulpa dental [DPSC's] poseen capacidad inmunomoduladora equivalente a las MSCs inhibiendo la proliferación de PBMCs [Pierdomenico *et al*., 2005].

Las células troncales de pulpa dental pueden regular la respuesta del sistema inmune. En protocolos de injertos o trasplantes celulares, se ha observado que las DPSC's tienen baja capacidad inmunogénica y modulan la respuesta inmune [Polchert *et al.,* 2008]. Esa inmunomodulación está mediada por El TNF-α, que. El TNF-α es un factor soluble que a pesar de que es capaz de estimular las DPSC's para inducir una mayor inmunomodulación de la respuesta inmune, también puede generar un cambio en el fenotipo de las células troncales que les impide una correcta proliferación y diferenciación regulando negativamente el STRO-1 que induciendo la apoptosis celular. Evitando que exista un tiempo más prolongado de inmunomodulación] de la respuesta inmune para evitar el rechazo del trasplante celular [Sonoda *et al.*, 2016].

Otros tipos de células como son las células troncales de placenta tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse en cualquier línea celular, adicionalmente tienen una importante capacidad inmunomoduladora. Estás células no presentan diferencias morfológicas significativas cuando se comparan con otras líneas celulares como las obtenidas de médula ósea, timo o cavidad oral [Zhao *et al.*, 2012]. De otro lado, se ha observado que las células

madre estromales multipotentes son capaces de disminuir los factores de crecimiento para aliviar la inflamación en el lugar de la lesión e inducir a la reparación del tejido [Phinney et al., 2007], la capacidad inmunomoduladora de estas células troncales es bastante alta, aunque son poco inmunogénicas [Uccelli *et al.,* 2008].

El IFN-γ es una citoquina producida por los linfocitos mitogénicamente o por estimulación antigénica. Estructuralmente es diferente del interferon tipo I y su actividad principal es la inmunorregulación, a través de la activación de los macrófagos, con aumento en la capacidad fagocitaria de estos, tanto en las respuestas inmunitaria innatas como las respuestas celulares adaptativas, previamente interviene en la reclutación de monocitos de la circulación. El IFN-γ no comparte receptores con los interferones de tipo I y su estructura proteica es distinta. En los últimos años se ha demostrado que las células mieloides [células dendríticas, macrófagos y neutrófilos] también son capaces de producir IFNγ a través de la estimulación con IL-12 e IL-18. [Mata *et al.,* 2008]

La expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II en células que normalmente no los producen conduce a enfermedades autoinmunes. Este antígeno expresado por las células presentadoras de antígenos [APCS] tiene como función la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitaria innatas como las respuestas celulares adaptativas, previamente interviniendo en el reclutamiento de monocitos de la circulación. Otra de sus funciones es dirigir la diferenciación de los Linfocitos T CD4+ en linfocitos Th1, la cual ocurre en respuesta a los patógenos que también activan a las células dendríticas, los macrófagos y los Linfocitos "natural killer" [NK]; para inducir mayor secreción de IL-12, la cual promueve más diferenciación a Th1, amplificando fuertemente la reacción inflamatoria. La principal función de las moléculas del HLA clases I y II consiste en unirse a péptidos antigénicos con el fin de presentar antígenos a los linfocitos T. La capacidad que tiene un péptido concreto para unirse a una molécula del HLA particular de manera satisfactoria es una función directa del ajuste entre los residuos de aminoácidos del péptido y los bolsillos de unión presentes en la molécula del HLA. El péptido unido forma una estructura terciaria denominada complejo MHC-péptido, que es reconocida por los linfocitos T por medio del receptor de linfocitos T (TCR). El primer lugar en donde se produce la interacción TCR-MHC-péptido en la vida de un

linfocito T es en el timo, en este órgano suceden los procesos de selección positiva y negativa [Shinagawa *et al.*, 2017]

La producción de IFN-γ es inducida por patógenos, por el entrecruzamiento de moléculas de superficie, por antígenos específicos, por la activación del receptor de células T o por estimuladores de células T no específicos como la fitohemaglutinina, la concanavalina-A, ésteres de forbol, ionóforos o también por estimulación por citoquinas [IL-1, IL-2, IL-12, IL-18], factores de crecimiento y estrógenos. La expresión del gen de IFN-γ se inhibe por glucocorticoides, TGFβ e IL-10, así como por el inmunosupresor ciclosporina-A a través del factor de transcripción NF-ATp. [Mata *et al.,* 2008]

El TGF-β es una citoquina que pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que participan en procesos de desarrollo, diferenciación y homeostasis a través de su interacción con receptores de la membrana celular. TGF-β1, TGF-β2, y TGF-β3 son homólogas entre sí y se han encontrado en todos los mamíferos. Estos se pueden encontrar asociados a las membranas celulares formando una serie de receptores membranales. Estas glicoproteínas transmembranales están formadas por un dominio serina-treonina-kinasa en la parte intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular más corto, rico en cisteína y N-glicósido2. El TGF-β Está implicado en procesos de desarrollo, diferenciación e inhibición del crecimiento de células epiteliales y endoteliales, así como también afecta las funciones inmune y hematopoyética promoviendo el crecimiento del tejido conectivo, favoreciendo la quimiotaxis de fibroblastos, macrófagos, linfocitos y estimulando la reparación de tejidos [Prieto *et al.,* 2002].

Este trabajo deriva de un proyecto en el que se evaluó la inmunomodulación de las células madre de pulpa dental, estimuladas con IFN-γ y TNF-α, específicamente la secreción de las citoquinas IL-6, IL-10, IL-2, pero no se incluyó la evaluación de la citoquina TGF-β.

4. JUSTIFICACIÓN

Los fármacos anti-inflamatorios, esteroideos y corticoesteroides, son usados ampliamente en el uso de transplantes como un inmunosupresor para evitar el rechazo del injerto, favoreciendo la generación de los linfocitos T reguladores. Sin embargo, aún con el uso de fármacos inmunosupresores, los rechazos de los injertos siguen presentándose [Golshayan et al., 2008]. Motivo por el cual es indispensable buscar alternativas menos convencionales como el uso de células madre. Sin embargo, se necesita conocer con mayor profundidad las vías inmunomoduladoras de estas células

El rechazo de aloinjerto es la primera causa de falla terapéutica en los trasplantes alogénicos de células madre. A pesar de esto se ha observado que las que las MSCs se activan en presencia de algunas citoquinas como el IFN-γ y el TNF-α, generando un ambiente tolerogenico que ayuda a la modulación de la respuesta inmune. Este fenómeno puede ser importante para aumentar la supervivencia celular y disminuir la prevalencia del rechazo al trasplante celular, evitando el consumo de fármacos que puedan ocasionar efectos colaterales indeseados en los pacientes.

Por lo tanto, esta investigación busca expandir los conocimientos sobre las vías inmunomoduladoras de las células madre de pulpa dental y la eficacia de la estimulación de las células madre con IFN-γ y TNF-α, para futuros estudios.

5. SITUACIÓN ACTUAL

Actualmente se ha desarrollado un importante interés en el estudio de las células troncales provenientes de la médula ósea y la importancia de estás en la Medicina Regenerativa. Se han descrito las características principales de las células troncales mesenquimales como son la capacidad de diferenciación, autorenovación y proliferación, así como las de diferentes tipos celulares relacionados, sus propiedades funcionales y la importancia dada al uso de estas células en diversas aplicaciones terapéuticas [Macias et al., 2010]. También se ha reportado que las DPSC's logran inmunodular la secreción de citoquinas y factores solubles que promueven el desencadenamiento de una respuesta inmunológica estimuladas con IFN-γ y TNF- α [Shi Y. *et al.,* 2012]. Estudios *in vitro* lo demuestran al reportar su uso en dientes sano y dientes con pulpitis irreversible, comprobando la acción inmunomoduladora de las células troncales de pulpa dental al ser estimuladas con IFN-γ Sonoda *et al*., 2016].

Es necesario activar las células troncales para inhibir la proliferación de las Células T y así evitar la mortalidad las MSCs. De acuerdo con la literatura, la proliferación y diferenciación de las MSCs se evaluó por medio de la expresión de los marcadores CD11b+, B220+, CD45+ y el MHC I y II. La diferenciación de estas células lleva a generar un ambiente tolerogénico mediado por los factores solubles como el COX-2, la PGE2, la enzima IDO y el TGF- β, [Golshayan *et al.,* 2008]. También se ha observado que las DPSC's puede regular la intensidad de respuesta inmune mediante la inducción de la apoptosis de las células T a través de la vía FAS/Falú contactos célula-célula. Además, promueven la generación de células T reguladoras, lo que incrementa la tolerancia inmune [Macias *et al.*, 2010].

Se considera que las células troncales tienen un enorme potencial terapéutico, por esa razón es importante desarrollar tratamientos basados en estas células para los pacientes que padecen de patologías irreversibles como las enfermedades crónicas degenerativas, el cáncer, o lesiones de tamaño crítico que comprometen la reparación tisular. Para garantizar el éxito de las terapias basada en células troncales en dichos pacientes es fundamental conocer los mecanismos involucrados en el rechazo del injerto y en la tolerancia inmunológica [Baum et al., 2000; Macias et al., 2010; Montoya et al., 2010]. La tolerancia inmunológica en estos procesos está mediada principalmente por la subpoblación de LT reguladores naturales [nTreg] [Siachoque *et al.*, 2011].

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar la secreción TGF-β de las células troncales de pulpa dental previamente estimuladas con IFN-γ y TNF-α en un modelo *in vitro*.

6.2 Objetivo Especifico

1. Evaluar la producción de la citoquina TGF-β por parte de las células troncales estimuladas con IFN-γ y TNF-α.
2. Comparar la producción de la citoquina TGF-β por parte de las células troncales a diferentes concentraciones de cada una de las citoquinas IFN-γ y TNF-α [50, 100 y 200 ng/ml] de las moléculas estimuladoras a 24 horas. [para tener en cuenta para la estadística]

7. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

7.1 ***Tipo de estudio:*** Estudio experimental *in vitro*.

Preparación de la muestra:

Descongelación, cultivo primario y caracterización de DPSC's:

Se retiró el criovial del tanque de nitrógeno y se colocó al baño maría a 37°C hasta eliminar remanentes de hielo. El volumen total se transfirió a un tubo Falcón de 15ml y se agregó 10ml de medio precalentado a 37°C [DMEM suplementado con 10% SFB, 1% de antibióticos]. Se centrifugó a 2000rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió en medio de cultivo. Las células resuspendidas se sembraron en una placa de 24 pozos con 5mL de medio de cultivo DMEM, se incubaron a 37°C, atmósfera húmeda y CO^2 [5%], hasta obtener un 90% de confluencia celular.

Verificación de viabilidad celular de las células descongeladas

Con el fin de verificar si las células troncales descongeladas eran viables, las células adherentes expandidas se lavaron con PBS y se digirieron enzimáticamente con 3 mL de tripsina 0,025%, con EDTA al 0,02%, de 5-10min a 37ºC.

La suspensión celular se lavó 2 veces con tampón fosfato salino PBS, Se tomó 1µL de la suspensión celular y se tiñó con el colorante de exclusión azul tripano y se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer.

Evaluación del fenotipo celular

Para confirmar que el fenotipo las células obtenidas del cultivo primario corresponden a DPSC's, 200.000 células fueron marcadas con los anticuerpos del kit MSC Phenotyping Kit Human [Miltenyi- Biotec, 130-095-198, Macs®, Paris Francia] y se analizaron por citometría de flujo. Los marcadores evaluados corresponden a anticuerpos anti-CD45, anti-CD34, anti-CD90, anti-CD73 y el colorante de viabilidad 7AAD-PERCP del MSC Phenotyping Kit Human [Miltenyi- Biotec, 130-095-198, Macs®, Paris Francia], las células se incubaron en oscuridad durante 30 min y se llevaron al citometro refrigeradas. Las células troncales se definieron como células CD105, CD90 y CD73 positivas y CD45, CD34 negativas.

Luego de su caracterización las células se incubaron en cajas T25, cada 4 días se les realizó un cambio de medio [DMEM low glucose/Hyclone. GlutaMAX™ Supplement, pyruvate, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos] y luego del 4° pasaje se realizó el cultivo de las células en las placas de 96 pozos.

7.3 METODOS Y TECNICAS DE RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN

Preparación de las soluciones de TNF-α y IFN-γ:

Para preparar las citoquinas en las diferentes concentraciones, se tomó un tubo eppendorf estéril, al cual se adicionó todo el soluto [20 µg para TNF-α y 100 µg para IFN-γ]. Para TNF-α se agregaron 200µl [0,2ml] de PBS estéril para obtener una solución de 100 µg/ml. Para IFN-γ se adicionaron 500µl [0,5ml] de agua desionizada y estéril para obtener una solución de 0,2 mgr/ml] de acuerdo con las indicaciones del fabricante. [Recombinant Human TNF-alpha protein®. R&D Systems. Minnesota USA - Recombinant human IFN- gamma protein®. R&D Systems, Inc. Minnesota USA]. Las soluciones stock se almacenaron a 2-8°C.

Fase estandarización: Las DPSC's que se utilizaron se encontraban criopreservadas a -70ºC, y fueron obtenidas de la pulpa de dientes permanentes que fueron extraídos por razones terapéuticas. A estas células se le realizaron procedimientos estandarizados para el procesamiento, cultivo y criopreservación de las DPSC's. [Gronthos S. *et al.,* 2000]. Se sembraron las DPSCs en cajas de 96 pozos a un número celular de 4000, 2000, 1000, 500, 250 y 125 DPSC's en 200ul de medio por pozo. Las células fueron estimuladas con estimuladas con tres concentraciones: 200ng/ml, 100ng/ml y 50ng/ml de las citoquinas TNF-α e IFN-γ, evaluados a las 24 horas. Una vez cultivadas las células durante 3 días con 500 µl de medio de cultivo [DMEM low glucose/Hyclone. GlutaMAX™ Supplement, pyruvate, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos]. Se retiró el medio de cultivo inicial y luego se adicionó a cada pozo 400 µl medio de cultivo más 100 µl de la citoquina preparada en las diferentes concentraciones de estudio. Se dejaron en la nevera de 2 a 8°C en oscuridad durante el tiempo establecido para cada pozo, según el diseño experimental a 24 horas, para permitir la evaluación de la secreción del TGF- β.

Evaluación de la secreción de TGF- β [ELISpot human latent TGF-β1®. R&D Systems, Inc. Minnesota USA]:

Diseño y muestra: Cada muestra estuvo constituida por un pozo de un número determinado DPSC's de dientes humanos n* células, estimuladas con tres concentraciones- 200ng/ml, 100ng/ml o 50ng/ml – de las citoquinas TNF-α y IFN- γ, evaluados las 24 horas. De tal manera que se evaluaron tres grupos; un grupo control y dos de estudio.

[Tabla N°1; Figura 1]

Tabla 1: Distribución de los grupos de estudio

Grupo control +	3 pozos cada uno de 250, 500 y 1000 células DPSC's con estímulo de Lipolisacárido [LPS] *Escherichia coli* [1 ng/ml]
Grupo control -	3 pozos cada uno de 250, 500 y 1000 células DPSC's sin estimulo.
Grupo TNF-α	3 pozos cada uno de 250, 500 y 1000 células DPSC's A tres concentraciones 50, 100, 200 ng/ml a 24 horas para un total de 9 pozos.
Grupo IFN- γ	3 pozos cada uno de 250, 500 y 1000 células DPSC's A tres concentraciones 50, 100, 200 ng/ml a 24 horas para un total de 9 pozos.

ESTIMULO	TNF-α			INF-γ			CONTROL	
CONCENTRACIÓN	200ng/ul	100ng/ul	50ng/ul	200ng/ul	100ng/ul	50ng/ul	LPS+	Control negativo
NUMERO DE CÉLULAS	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	500	500	500	500	500	500	500	500
	250	250	250	250	250	250	250	250

x 2

Figura 1. Diseño del experimento.

Para la detección de la secreción del TGF-β a través del método EliSpot se incubaron las células en la placa específica con el anticuerpo para TGF-β en CO2 a 37 ° C por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio, se lavó la placa con 300 µl agua fría, 3 veces para lisar las células adherentes, se adicionó 100µl de Streptavidina en cada pozo y se dejó en la oscuridad durante 2h a temperatura ambiente. Luego se retiró la solución, se adicionó 100µl de la solución cromógena durante 1h en la oscuridad. Para confirmar la secreción de TGF-β se

retiró la solución cromógena, se lavó la placa con agua 3 veces, y se evaluó la formación de un precipitado de color azul-negro [manchas] en los sitios de localización de la citoquina, donde cada punto individual, representó una célula secretora de TGF-b1 latente.

7.4 Plan de análisis de la información:

Indicadores: Los datos para determinar la secreción de TGF-β se reportaron dicotómicamente como presencia o ausencia de secreción; se determinó la secreción de TGF- β cuando se presentaron 1 o más *Spots* en los cultivos de **DPSC's** estimulados.

Pruebas: Se realizó un análisis descriptivo de cada uno de los experimentos realizados; para la evaluación de la secreción TGF-β según estimulo de citoquina, inicialmente se realizó prueba de shapiro-wilk para comprobar la distribución de los datos. Posteriormente fue utilizada la prueba de Kruskal-Wallis para comparar la secreción TGF-β entre diferentes cantidades de células a diferentes concentraciones, y entre diferentes concentraciones a diferentes cantidades de células. La comparación de control positivo y negativo con cada una de las concentraciones de citoquinas a las diferentes diluciones celulares. Finalmente, para la comparación entre citoquinas a las diferentes concentraciones y número de células fue utilizada la prueba U mann Whitney.

7.5 HIPÓTESIS

A. Hipótesis Estadística

Hipótesis Alterna

- Existen diferencias significativas entre las DPSC's estimuladas con IFN-γ y TNF-α para la secreción de TGF- β.

Hipótesis Nula

- No existen diferencias significativas entre las DPSC's estimuladas con IFN-γ y TNF-α para la secreción de TGF- β.

B. Hipótesis Estadísticas Descriptivas

Hipótesis Alterna

- Existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas para la estimulación de las DPSC's con IFN-γ.

Hipótesis Nula

- No existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas para la estimulación de las DPSC's con IFN-γ.

Hipótesis Alterna

- Existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas para la estimulación de las DPSC's con TNF-α

Hipótesis Nula

- No existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas para la estimulación de las DPSC's con TNF-α.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación se realizó de acuerdo a las NORMAS CIENTÍFICAS, TÉCNICAS Y ADMINISTRATIVAS PARA LA INVESTIGACIÓN EN SALUD RESOLUCIÓN Nº 8430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Debido a que en esta investigación se utilizaran dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica; esta investigación es considerada de riesgo mínimo: estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: […], obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, […] [Título II "de la investigación en seres humanos". Capítulo I "de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos". Artículo 11]. Debido a que en este proyecto se utilizaran células troncales extraídas de tejido dental de seres humanos adultos criopreservadas, se cuenta con consentimiento informado, Se entiende por Consentimiento informado el acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o en su caso, su representante legal, autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna. [Título II "de las investigaciones de seres humanos", Capitulo 1 "de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos" Articulo 14].

Debido a que este trabajo es derivado del proyecto PCI 2016-8888 "Evaluación de la inmunomodulación de las células madres de pulpa dental, estimuladas con IFN-γ y TNF-α", no requiere de aval ético para su ejecución porque no involucra la participación de seres humanos ni la experimentación de animales u otros seres vivos. Las células a utilizar en el estudio se encuentran criopreservadas y cuentan con el aval del docente para su utilización experimental [Certificación emitida por Comité Técnico de Investigación de la Vicerrectoría de investigación – marzo 2018].

9. RESULTADOS

Evaluación de la producción de TGF- β, bajo el estímulo de TNF-α durante 24 horas.

Bajo el estímulo de TNF-α de las DPSC's a las diferentes concentraciones [200, 100 y 50 ng/ul], así como en diferentes números celulares [1000, 500 y 250 células], no se evidenció secreción de TGF- β, a excepción de la secreción a una concentración de 100ng/ul en una dilución de 250 células y una secreción a una concentración de 50 ng/ul en una dilución de 1000 células. A pesar de la secreción de TGF- β en estos dos casos, no es consistente la estimulación debido a que esta no fue igual entre ambos experimentos [Tabla 2].

Evaluación de la producción de TGF- β, bajo el estímulo de IFN-γ durante 24 horas.

La estimulación con IFN-γ evidencio en concentraciones de 200ng/ul y diferentes numeros celulares [1000, 500 y 250 células] una secreción de TGF – β en uno de los experimentos. A una concentración de 100 ng/ul se evidencio la secreción de TGF - β a una dilución de 250 células para ambos experimentos. Se evidencio secreción de TGF – β a una concentración de 100 ng/ul en uno de los experimentos a una dilución de 500 células. Finalmente, a una concentración de 50 ng/ul se evidencio secreción de TGF – β únicamente en un numero de 250 células, siendo esta expresión positiva para ambos experimentos [Tabla 2].

Tabla 2: Secreción de TGF – β por parte de las DPSC´s a diferentes numeros celulares [1000, 500 y 250 células] previamente estimuladas con TNF-α e IFN-γ a diferentes concentraciones [200, 100 y 50 ng/ul].

n* Células	TNF-α						IFN-γ						CONTROL					
	200ng/ul		100ng/ul		50ng/ul		200ng/ul		100ng/ul		50ng/ul		LPS+		Control negativo		Control KIT	
	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2
1000	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	Secreción TGF-β	
500	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+		
250	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-		

+: Presencia de secreción ≥ 1 *spot*

Tabla 3. Distribución de spots para dilución celular según la cantidad del estímulo.

Evaluación de la distribución de spots para dilución celular según la cantidad del estímulo.

	Células 250		Células 500		Células 1000		
	Me	**[RIQ]**	**Me**	**[RIQ]**	**Me**	**[RIQ]**	**Valor p**
TNF-α							
50	**0**	[0-0]	0	[0-0]	1	[0-1]	0.3679
100	**1**	[0-1]	0	[0-0]	0	[0-0]	0.3679
200	**0**	[0-0]	0	[0-0]	0	[0-0]	1.0000
IFN-γ							
50	**1**	[1-1]	0	[0-0]	0	[0-0]	0.0821
100	**1**	[1-1]	1	[0-1]	0	[0-0]	0.1889
200	**1**	[0-2]	1	[0-2]	1	[0-1]	0.8825

P calculado mediante prueba de Kruskal-Wallis

La distribución del número de spots en el experimento no fue continua según la dilución celular. A excepción de un numero de 250 células a una concentración de 50 ng/ul de IFN-γ, debido a que para el resto de los números celulares a las diferentes concentraciones no hubo una tendencia constante para producir spots ante las diferentes concentraciones de los estímulos de TNF-α o IFN-γ.

Evaluación de la distribución de spots para las diferentes concentraciones de estímulo según la disolución celular.

La distribución del número de spots en el experimento no fue continua según las diferentes concentraciones empleadas en el experimento de TNF-α o IFN-γ, en la cual no hubo una tendencia constante para producir spots en ninguna condición del estímulo utilizado.

Tabla 4. Distribución de spots para las diferentes concentraciones de estímulo según la disolución celular.

	TNF-α 50		TNF-α 100		TNF-α 200		
	Me	**[RIQ]**	**Me**	**[RIQ]**	**Me**	**[RIQ]**	**Valor p**
Células 250	**0**	[0-0]	1	[0-1]	**0**	[0-0]	0.3679
Células 500	**0**	[0-0]	0	[0-0]	0	[0-0]	1.000
Células 1000	**1**	[0-1]	0	[0-0]	0	[0-0]	0.3679
	IFN- γ 50		**IFN- γ 100**		**IFN- γ200**		
Células 250	**1**	[1-1]	1	[1-1]	1	[0-2]	10000
Células 500	**0**	[0-0]	1	[0-1]	1	[0-2]	0.5220
Células 1000	**0**	[0-0]	0	[0-0]	1	[0-1]	0.3679

P calculado mediante prueba de Kruskal-Wallis

Evaluación de secreción de TGF- β según el porcentaje de spots según el estímulo de TNF-α o IFN-γ.

La presente gráfica permite observar por medio del porcentaje de spots en un promedio de 100 DPSC's, de manera en general, se evidencia una mayor secreción de TGF-β al ser previamente estimuladas con INF-γ hasta un 18%, en comparación con la estimulación presentada con el TNF-α en la cual se evidenció una producción menor al 5%.

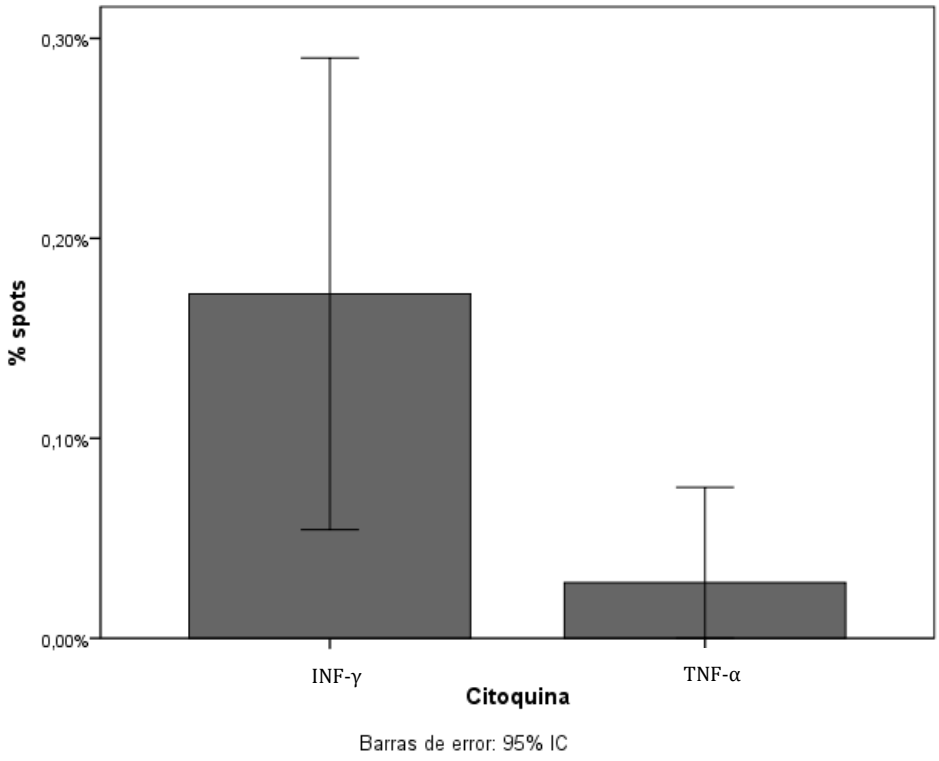

Figura 2. Evaluación de secreción de TGF- β según el porcentaje de spots. De acuerdo a los resultados obtenidos, se logra establecer que existe mayor probabilidad de que se generen spots de TGF-β estando las células estimuladas con IFN-γ con respecto a la estimulación con TNF-α.

Evaluación de la producción de TGF – β en los pozos del Elispot:

La evaluación de los spots de TGF – β fue reducida por la presencia de un precipitado de color no acorde al que se debía encontrar, sobre toda la superficie de cada pozo, donde se realizaron los experimentos. Se contabilizaron solamente aquellos spots de forma y tamaño similar capaces de ser captados por el ojo humano a través del estereoscopio. En la figura 3 A, B y C, se refleja el precipitado sobre toda la superficie del pozo, en la fig. 3A hubo presencia de 1000 células con un estímulo de 24 horas de IFN-γ a 200 ng/ul, en la fig. 3B hubo presencia de 1000 células con un estímulo de 24 horas de TNF-α a 200 ng/ul y en la Fig. 3C se evidencia la secreción de TGF – β como un control negativo sin ningún tipo de estímulo durante 24 horas.

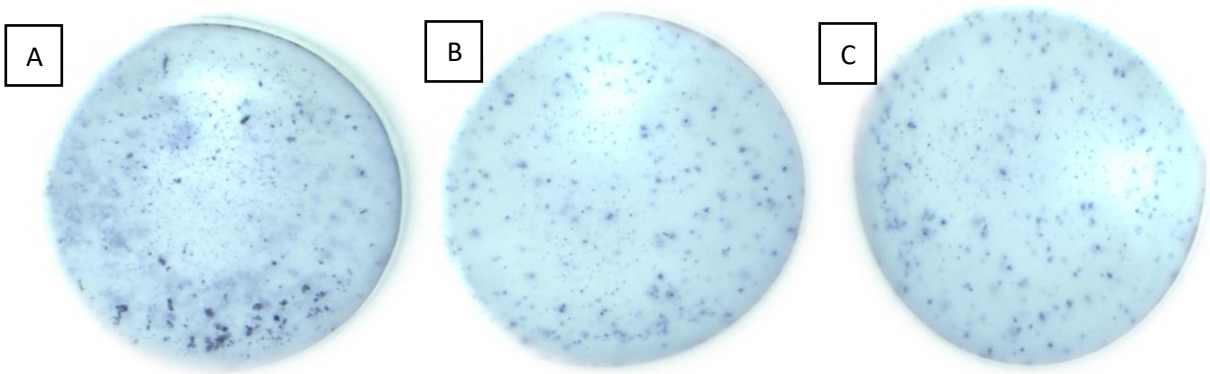

Figura 3 A, B, C. Figura 3 A, B y C, se evidencia un precipitado de color sobre toda la superficie de cada pozo. Fig. 3A hubo presencia de 1000 células con un estímulo de 24 horas de IFN-γ a 200 ng/ul. Fig. 3B hubo presencia de 1000 células con un estímulo de 24 horas de TNF-α a 200 ng/ul. Fig. 3C se evidencia la secreción de TGF – β como un control negativo sin ningún tipo de estímulo durante 24 horas.

Evaluación de la Inmunofenotipificación celular de las DPSC's por citometría de flujo.

La evaluación de las células troncales de pulpa dental se realizó a partir de células criopreservadas que se encontraban en el 8vo pasaje provenientes de pulpa dental de dientes sanos. Las DPSC's que se utilizaron se encontraban cultivadas con DMEM bajo en glucosa con 4.00 mM L-glutamina, 1000 ng/l glucosa, 110 mg/L piruvato sódico suplementado con 10% suero fetal bovino [SFB], 1% de antibióticos [10,000 u/ml penicilina G, 10,000ug/ml

estreptomicina, 25ug/ml anfotericina B], se incubaron a 37°C, atmósfera húmeda y CO^2 [5%], hasta obtener un 90% de confluencia celular, se utilizó tripsina neutralizada [Clonetics, Lonza. Walkersville USA] durante 5 minutos, se centrifugó a 1300rpm durante 5 minutos y al Pellet celular obtenido se le realizó un conteo celular con azul tripano para incubar 10.000 células con 250µL de PBS y los anticuerpos CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34 Y CD45 MSC Phenotyping Kit Human [Miltenyi- Biotec, 130-095-198, Macs®, Bergisch Gladbach, Alemania].

La evaluación del fenotipo, fue para el control de isotipos con anticuerpos anti-CD146-FITC 99.6%, anti-CD73-PE 94,6%, anti-CD146 y 73 - FL3 99,7%, anti-CD146 y 73 – FL4 99.4%. El fenotipo celular de las DPSC's sin estimular con TNF-α o IFN-γ, fue para el anticuerpo CD34 0%, anti-CD45 con el 0%, anti-CD105 con el 96.7%, anti-CD73 con el 93.3% y anti-CD90 con el 50%.

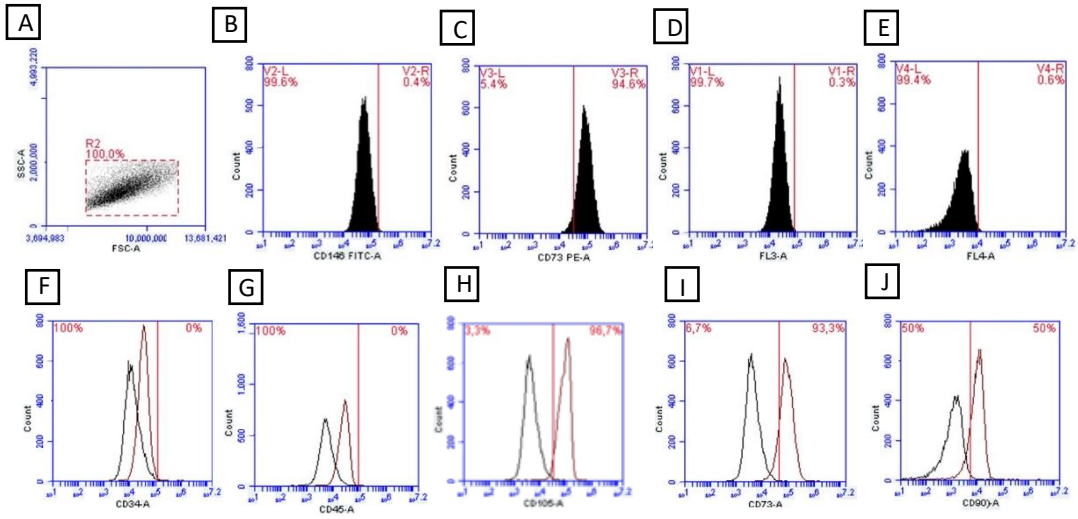

Figura 4. Caracterización fenotípica de las células troncales de pulpa dental: Control del número de células a evaluar [Fig. 4A]. Los controles de isotipo [Fig. 4B, C, D, E], con anticuerpos anti-CD146-FITC 99.6% [Fig. 4B], anti-CD73-PE 94,6% [Fig. 4C], anti-CD146 y 73 - FL3 99,7% [Fig. 4D], anti-CD146 y 73 – FL4 99.4% [Fig. 4E]. El fenotipo de las DPSC´s sin el estímulo previo de TNF-α y IFN-γ [Fig. 4F, G, H, I, J], negativo menor o igual al 4%, para anti-CD34 0% [Fig. 4F], anti-CD45 0%[Fig. 4G], Positivo mayor o igual al 95%, para anti-CD105 96.7% [Fig. 4H], anti-CD73 93.3% [Fig. 4I] y anti-CD90 50% [Fig. 4J].

10. DISCUSIÓN

El TGF-β es una citoquina que está formada por un gran grupo de polipéptidos extracelulares con ciertas características estructurales comunes, que participan en procesos de crecimiento, desarrollo, diferenciación y homeostasis a través de su interacción con receptores de la membrana celular. La secreción de esta citoquina por parte de las DPSC's se da ante reacciones inmunológicas, permitiendo establecer una clara reacción supresora de la respuesta inmune del huésped y la regeneración del tejido del lecho receptor. [Prieto *et al.,* 2002; Kyurkchiev *et al.*, 2014].

En diferentes estudios se ha reportado, que las DPSC's bajo la estimulación con TNF-α, tienen la capacidad de secretar factores solubles anti-inflamatorios sin afectar el fenotipo, proliferación y capacidad de supervivencia celular [Shinagawa *et al.,* 2017]. Contrario a lo reportado en el estudio de Shinagawa *et al.,* [2017], la viabilidad celular en el presente estudio se vio afectada durante largos periodos 48 y 72 horas de estimulación con TNF-α en altas y bajas concentraciones [200, 100 y 50 ng/ml], en comparación al número de células sembradas por pozo.

En el presente estudio, la estimulación con TNF-α no demostró diferencias significativas en la secreción de TGF- β a diferentes concentraciones y números celulares, debido a que se observó que sin importar el numero celular ni la concentración de estímulo era eventual la producción de TGF – β. Sin embargo, Ucelli *et al.,* [2008] reportó que la estimulación de las células troncales con TNF-α promueve la inhibición de la proliferación de las células T por medio de la síntesis de óxido nítrico causada por los factores solubles secretados de las DPSC's como el TGF-β, la cual demostró secreción a diferentes concentraciones de TNF-α y numeros celulares.

Por otro lado, diferentes estudios mencionan que la estimulación de las DPSC's con IFN-γ potencializa las propiedades de las células participando en las funciones inmunomoduladoras por medio de la secreción de factores solubles como el TGF-β [Golshayan D. *et al.,* 2008; Strojny *et al.,* en el 2015 y Quin *et al.,* 2015; Sonoda *et al* 2016]. El presente estudio no demostró una diferencia significativa de la secreción de TGF- β a las diferentes concentraciones de estimulación con IFN-γ, pero si entre los diferentes números

celulares [250, 500 y 1000 células], debido a que se observó que a menor cantidad de células hubo mayor producción de TGF–β.

Contrario a lo reportado por Polchert *et al.,* [2008] y Strojny *et al.,* [2015], demostró que a altas concentraciones de IFN-γ 500 U/ul en cultivo durante 0, 1, 2, 7, 14, 21 y 30 días, hubo una secreción de TGF–β que aumento progresivamente según la concentración inicial, presentando un comportamiento directamente proporcional, es decir, que a mayor concentración mayor secreción de TGF–β.

En el presente estudio se obtuvieron resultados similares al realizado por Yongkang *et al.,* [2017] donde se evaluó la capacidad de secreción de TGF – β bajo un estímulo de 200, 100 y 50 ng/ul de IFNγ e IL-6 durante 24 horas, con números celulares de 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31.25, con el método de Elispot y Elisa. En el estudio mencionado anteriormente, se evidenció mayor secreción de TGF – β con la técnica de Elisa en comparación con el método de Elispot. Adicionalmente con esta técnica fue incontable el número de spots en donde se presentarán más de 500 células por pozo. Por lo tanto, el resultado entre ambas pruebas no pudo analizarse en ambas condiciones porque no se encontraban resultados registrados para realizar la comparación entre estas dos técnicas.

La metodología planteada en el presente estudio para la evaluación del TGF – β fue por medio de Elispot debido a que es una técnica derivada de ELISA, que es 400 veces más sensible que un ELISA convencional, por su capacidad de captar proteínas directamente en la placa del Elispot ya sea de células en el sobrenadante o células adherentes [Turner *et al.,* 2014] como las DPSC's. De igual forma Wu *et al.,* [2017] determinó la producción de IL-6 e IFN- γ por ELISPOT, estableciendo así que el ensayo de ELISPOT es una herramienta útil para poder determinar la secreción de citoquinas, por parte de células adherentes.

Ante la sensibilidad de la técnica y las inconsistencias presentadas entre los experimentos realizados según cada condición, se sugiere la posibilidad de haber existido un error en la aplicación de la técnica, al encontrarse en la mayoría de los casos un precipitado de color en abundancia en la cual no se observó secreción evidente de la citoquina, como se esperaba tal y como lo reportan Sonoda *et al* 2016; Golshayan D. *et al.,* 2008; Strojny *et al.,* en el 2015 y

Quin *et al.,* 2015, que a pesar de no utilizar la misma técnica si encontraron una secreción de TGF-β.

11. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de la evaluación de la capacidad de secreción TGF- β de las células troncales de pulpa dental bajo el estímulo de las citoquinas IFN-γ o TNF-α en un modelo *in vitro*, fueron limitados debido a que el ELISPOT es una técnica muy sensible con resultados sin diferencias significativas en este estudio.

Dentro de los límites de esta investigación se puede concluir que:

1. La secreción de TGF- β, no es comparable con la reportada en estudios anteriores, debido a que los datos obtenidos no fueron significativos.

2. La estimulación con IFN-γ en comparación con el TNF-α; permitió una mayor estimulación de las DPSC's dando como resultado una mayor secreción de TGF- β.

3. La estimulación con TNF-α demostró ser una citoquina capaz de estimular las DPSC's en menor proporción que el IFN-γ.

4. Se observó mayor secreción de TGF- β a menor número celular siendo las DPSC´s estimuladas con IFN-γ.

12. REFERENCIAS:

1. Aileen I, Hsiang H, Lin W, Fu J, Chang C, Wang I, Weng C, Wei C. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp. Biomed Res Int. 2017: 2851- 906.

2. Arévalo J, Páez D, Rodríguez V. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. Nova. 2007.5: 8.

3. Baum B, Mooney D. The impact tissue engineering on dentistry. J Am Dent Assoc 2000; 131 [3]: 309-18

4. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Nat Rev Immunol. 2012; 12[3]:180-90.

5. Ding G, Niu J, Liu Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor-β1. Hum Cell. 2015; 28[2]:81-90.

6. Ferrer B. Influencia de la citoquina Interleuquina 6 [IL-6] adipocitaria y muscular en el control del metabolism. Universitat Autonoma de Barcelona. 2013.

7. Filella, X, MolinA, R., Ballesta, AM. Estructura y función de las citoquinas. Med Integr. 2002; 39[2]:63-71

8. Flanders K y Burmester J. Medical Applications of Transforming Growth Factor-β. Clinical Medicine & Research, 2003; 1[1]:13-20.

9. Golshayan D, Pascual M. Tolerance-inducing immunosuppressive strategies in clinical transplantation: an overview. Drugs. 2008; 68[15]:2113-30.

10. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells [DPSC's] in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97[25]:13625-30.

11. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. J Endod. 2008; 34[6]:645-51.

12. Kikuiri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, Chen C, Chen W, Wang S, Le AD, Shi S. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. J Bone Miner Res. 2010 Jul; 25[7]:1668-79.

13. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. World J Stem Cells. 2014 Nov 26; 6[5]:552-70.

14. Macías CA, Pérez LO, Hernández PR, Ballester JM. Phenotypical and functional features of the mesenchymal and endothelial stem cells. Rev cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2010; 26[4]:256-75.

15. Mata D, Hernández R. Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. Rev. Investigación clínica. 2008; 60 [5]; 421-431.

16. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100[10]:5807-12.

17. Montoya J, Velilla A, Rugeles T. Characterization of regulatory T cells by flow cytometry: current status and controversies. Biomédica 2010; 30[1]:37-44.

18. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells [PCs] from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biol. 2005; 24[2]:155-65.

19. Phinney D, Prockop J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. Stem Cells. 2007; 25[11]:2896-902.

20. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara P. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. Transplantation. 2005; 80[6]:836-42.

21. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, Genrich K, Mehrotra S, Setty S, Smith B, Bartholomew A. IFN-γ amma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. Eur J Immunol. 2008; 38[6]:1745-55.

22. Prieto M, Rivas V, López M, Pérez F. El TGF-β: síntesis y mecanismo de acción. Nefrología.2002; 22[2]:0-211

23. Romero S, Córdoba K, Martínez C, Gutiérrez J, Durán J, Munévar J. Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSC's como terapia celular en odontología. Rev. Odont. Mex. 2014; 18[3]: 156-68.

24. Shi M, Liu Z, Wang F. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol. 2011; 164 [1]:1-8.

25. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. Trends Immunol. 2012; 33[3]:136-43.

26. Shinagawa S, Okazaki T, Ikeda M, Yudoh K, Kisanuki YY, Yanagisawa M, Kawahata K, Ozaki S. T cells upon activation promote endothelin 1 production in monocytes via IFN-γ and TNF-α. Sci Rep. 2017; 7 [1]:14500.

27. Siachoque H, Satisteban N, Iglesias-Gamarra A. T regulatory lymphocytes: subpopulations, mechanism of action and importance in the control of autoimmunity. Rev. Colomb. Reumatol. 2011; 18[3]:203-20.

28. Somoza, R. Secreción de TGF-β3 por células madre mesenquimáticas y su aplicación en ingeniería de tejidos. Pontificia Universidad Católica De Valparaíso Universidad Técnica Federico Santa Maria. 2015.

29. Sonoda S, Yamaza H, Ma L, Tanaka Y, Tomoda E, Aijima R, Nonaka K, Kukita T, Shi S, Nishimura F, Yamaza T. Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. Sci Rep. 2016; 18; 6: 19286.

30. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS One. 2006;1.

31. Strojny C, Boyle M, Bartholomew A. Interferon Gamma–treated Dental Pulp Stem Cells Promote Human Mesenchymal Stem Cell Migration in Vitro. J Endod. 2015:1–6.

32. Rose S. IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-inflammatory Activities of IL-6. Int J Biol Sci. 2012; 8[9]: 1237–47.

33. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008; 8[9]:726-36.

34. Wang A, Armstrong E, and Armstrong A. Corticoesteroids and would healing: clinical considerations in the perioperative period. Am J Surg. 2013 Sep;206[3]:410-7

35. Wu, Y, Hoogduijn, M. Baan, C. Korevaar, S. Kuiper, R. Yan, L. Wang, L and Besouw, N. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have a Heterogenic Cytokine Secretion Profile. Stem cells International. 2017.

36. Yongkang W, Martin J, Baan C, Korevaar S, Kuiper R, Yan L, Wang L, Besouw N. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have a Heterogenic Cytokine Secretion Profile. Stem Cells Int. 2017:4960 - 831.

37. Zhao Y, Wang L, Jin Y, Shi S. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. J Dent Res. 2012; 91[10]:948-54.

38. Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, Shi S, Le AD, Wang SL. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. J Dent Res. 2009 Mar;88[3]:249