

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL CRECIMIENTO Y LA RESPUESTA A LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES DE LIGAMENTO PERIODONTAL CULTIVADAS EN MATRIGEL

Sara Renata Robles-Mejía^{a,b}, Angélica Anahí Serralta-Interian^{a,b}, Geovanny I. Nic-Can^{b,c}, Beatriz Adriana Rodas-Junco^{b,c,*}

^a Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Inn, Perif. de Mérida Lic. Manuel Berzunza 13615, Chuburná de Hidalgo. Mérida, Yucatán, C.P. 97203.

^b Laboratorio Traslacional de Células Troncales-Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 61-A X Av. Itzaés Costado Sur "Parque de la Paz", Col. Centro. Mérida, Yucatán, C.P. 97000.

^c CONAHCYT-Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Kilómetro 33.5, Tablaje Catastral 13615, Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán, C.P. 97203.

Fecha de recepción: 28 de noviembre de 2023 - Fecha de aceptación: 29 de mayo de 2024

Resumen

Las células troncales mesenquimales derivadas del ligamento periodontal son una fuente prometedora de células para la ingeniería de tejido óseo. El Matrigel es una matriz 3D que contiene múltiples proteínas de la matriz extracelular, lo que puede promover la diferenciación osteogénica al imitar un microambiente con mayor afinidad a los sistemas *in vivo*. En este trabajo se evaluaron las características del crecimiento y el potencial osteogénico de las células troncales mesenquimales de ligamento periodontal cultivadas en Matrigel. El cultivo 2D de las células derivadas del ligamento periodontal demostró que éstas poseen capacidad multilínea mesenquimal y su proliferación máxima ocurre en el día ocho de cultivo. En relación con la diferenciación osteogénica las células cultivadas con Matrigel mostraron una menor respuesta a la osteogénesis comparada con las células cultivadas en 2D.

Palabras claves: Células troncales, cultivo 3D, osteogénesis, Matrigel.

IN VITRO CHARACTERIZATION OF THE GROWTH AND RESPONSE TO DIFFERENTIATION OF PERIODONTAL LIGAMENT STEM CELLS CULTURED IN MATRIGEL

Abstract

Mesenchymal stem cells derived from the periodontal ligament are a promising source of cells for bone tissue engineering. Matrigel is a 3D matrix containing multiple extracellular matrix proteins, which may promote osteogenic differentiation by mimicking a microenvironment with higher affinity to *in vivo* systems. In this study, the growth characteristics and osteogenic potential of periodontal ligament

*beatriz.rodas@correo.uady.mx

mesenchymal stem cells cultured in Matrigel were evaluated. 2D culture of periodontal ligament-derived cells demonstrated their multilineage mesenchymal capacity, with maximum proliferation occurring on the eighth day of culture. Regarding osteogenic differentiation, cells cultured with Matrigel displayed a lower response to osteogenesis compared to those cultured in 2D environments.

Key words: Stem cells, 3D culture, osteogenesis, Matrigel.

1. Introducción

Las células troncales (CT) de la cavidad oral (CTCO) se han convertido en una fuente valiosa de CT debido a que su obtención es un procedimiento no invasivo y tampoco representa conflictos éticos, a diferencia de las CT embrionarias (Cea-Sanhueza & Sánchez-Sanhueza, 2016). Las CTCO tienen características de CT mesenquimales (CTM) debido a que poseen una capacidad de diferenciación hacia los linajes adipogénicos, osteogénico y condrogénico, lo que las convierte en un blanco atractivo para la generación de terapias autólogas. Dentro de esas células, destacan las provenientes del ligamento periodontal (LP) (Serralta-Interian et al., 2022). El LP es un componente principal del periodonto que conecta la superficie de la raíz del diente y el hueso alveolar, y su función principal es el soporte dentario. El LP está constituido por poblaciones de células que incluyen los fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, el resto de Malassez, cementoblastos y CTM indiferenciadas. Las CTM del LP (CTMLP) se han encontrado tanto en la raíz como en las superficies del hueso alveolar (Zakrzewski et al., 2019). Estas tienen la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos, fibroblastos y cementoblastos (Yang et al., 2020); y cuentan con un papel fundamental en la regeneración del tejido periodontal (Zakrzewski et al., 2019).

Los estudios de las CTCO se han basado en sistemas bidimensionales (2D) y aunque se ha observado un gran potencial de diferenciación, estos sistemas presentan varias limitaciones como la carencia de fidelidad a sistemas *in vivo*. Esto se debe a que cuando están en 2D, las células tienen más superficie en contacto con el plástico y los medios

de cultivo que, con otras células, así obligándolas a una polarización que no refleja condiciones fisiológicas (Fontoura et al., 2020). Por lo tanto, los cultivos 2D no representan adecuadamente los nichos de CT en el cuerpo, lo que podría conllevar a la disminución e incluso pérdida de muchas propiedades beneficiosas de las CT. Mientras que en los cultivos tridimensionales (3D) se mantienen e incluso promueven muchas características celulares deseadas, respaldando aún más su uso en la investigación. Por lo tanto, para poder evaluar el comportamiento de estos cultivos en condiciones que simulen las interacciones *in vivo* de célula-célula y de célula-matriz de manera más efectiva, surge el uso de los sistemas 3D de cultivo (Ylostalo, 2020). Uno de los cultivos 3D más ampliamente aceptados es un hidrogel elaborado a partir del extracto de tumores Engelbreth-Holm Swarm, conocido y comercialmente disponible como Matrigel®. Estos tumores producen una gran cantidad de proteínas de la membrana basal. Asimismo, se ha comprobado que el cultivo de células en Matrigel puede llegar a alterar tanto la morfología como los patrones de expresión génica asociados a la diferenciación celular (Fontoura et al., 2020). Actualmente, pocos estudios han explorado la respuesta a la diferenciación osteogénica de CTMLP en cultivos con Matrigel. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue caracterizar *in vitro* el crecimiento y la respuesta a la diferenciación osteogénica de CTMLP cultivadas en Matrigel.

2. Metodología

2.1 Obtención de células troncales mesenquimales de ligamento periodontal.

Para este trabajo se emplearon CTMLP criopreservadas y obtenidas de dientes donados de un paciente de 15 años, previo consentimiento

informado y de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la UADY (CIE-06-2017). Los dientes fueron obtenidos de las Clínicas de Maestría en Odontopediatría y Cirugía Oral, Facultad de Odontología, de la UADY. Después de que el órgano dentario (OD) fuera extraído, se depositó en un tubo cónico que contenía una solución estéril de buffer de fosfatos (PBS 1X pH 7.4) suplementado con una solución al 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina [100 UI/mL] / estreptomicina [100 µg/mL], Gibco). Posteriormente el OD fue transportado en un contenedor refrigerado al laboratorio de Cultivo Celular para su procesamiento. Las células fueron obtenidas mediante el método del explante siguiendo el protocolo establecido por Mercado y colaboradores (Mercado-Rubio et al., 2021).

Las CTMLP se sembraron en cajas de cultivo de T25 con medio de cultivo α -MEM (alpha-modified Eagle's medium, Gibco) a un pH de 7.2, suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino, Gibco) y con antibiótico al 1% (penicilina/estreptomicina, Gibco). El cultivo se incubó a condiciones estándar, y el cambio de medio se realizó cada 2 días. Cuando los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia, se llevó a cabo una digestión enzimática para facilitar la separación y recolección de las células, mediante el uso de Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco) durante 5 min. Seguidamente las células fueron subcultivadas hasta alcanzar el pasaje celular 7 (P7) para los ensayos posteriores.

2.2 Cultivo celular de células derivadas de ligamento periodontal en Matrigel.

Para el cultivo en 3D de las CTMLP (P7) se siguió el protocolo previamente establecido por Josán y colaboradores para el crecimiento sobre una capa de Matrigel de 250 µm de espesor (Josán et al., 2021). Se usó una solución de 5 mg/mL de Matrigel, con una suspensión celular a una concentración final de 1×10^4 cel/pozo. Para determinar el volumen necesario de Matrigel con las células (MCC) por pozo se empleó la siguiente

ecuación que incluye el espesor teórico del gel de tal forma que su espesor se mantenga en 250 µm independientemente del área de superficie de cultivo.

$$MCC(\mu L) = VD \cdot NP$$

VD: Volumen de Matrigel a cierta concentración depositado por pozo en µL.

NP: Número de pozos.

$$VD(\mu L) = \frac{ET(\mu m) \cdot A(cm^2)}{10}$$

ET: Espesor teórico de Matrigel gelificado en µm.

Posterior a la aplicación del Matrigel con las células en las placas se realizó la incubación a 37° por 40 minutos y finalmente se añadió medio α -MEM complementado con SFB al 10% y solución antibiótica/antifúngica al 1% (penicilina/estreptomicina, Gibco).

2.3 Crecimiento y viabilidad celular de las CTMLP.

Para la proliferación y viabilidad celular se monitoreó el cultivo durante los días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12, utilizando el cultivo 2D a manera de control, siguiendo la metodología establecida por (Mercado-Rubio et al., 2021). Se sembraron 1×10^4 cel/mL en placas Petri con un 1 mL de α -MEM suplementado con SFB al 10% y solución antibiótica/antifúngica al 1%. La cuantificación de la viabilidad celular se realizó mediante el ensayo de azul de tripano (0.4% en PBS 1X), y el conteo se realizó usando un hemocitómetro y un microscopio óptico.

2.4 Ensayo de clonogenicidad.

La capacidad de las células aisladas de formar agregados clonogénicos durante su crecimiento se evaluó mediante un ensayo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para dicho ensayo, se inocularon 200 cel/pozo en una placa de 6 pozos en 1 mL de medio α -MEM complementado con SFB al 10% y solución antibiótica/antifúngica al 1%, utilizando el cultivo 2D a manera de control. Las células se incubaron en condiciones estándar con cambios de medio cada 2 días. Los conteos de las UFC se realizaron

mediante una tinción celular con cristal violeta al 0.5% (p/v). Para ello, primeramente, se lavaron las células con una solución de PBS 1X pH 7.4 y posteriormente se adicionó 1 mL por pozo de la solución de cristal violeta dejándola actuar durante 20 minutos, y para eliminar el exceso de colorante se realizaron lavados con agua destilada. Finalmente, para el conteo de las colonias celulares, se consideraron como colonias aquellos agregados que tuvieran >50 células y se calculó la eficiencia de UFC (E_{UFC}) a partir del promedio del conteo de todas las réplicas (M_{UFC}) y el número inicial de células (N_i) (Montero et al., 2021), mediante la ecuación:

$$E_{UFC} = \left(\frac{M_{UFC}}{N_i} \right) \times 100 [=] \%$$

2.5 Capacidad de diferenciación multilínea de CTMLP.

Para evaluar la capacidad de diferenciación multilínea de CTMLP (P7) se sembraron un total de 1×10^4 cel/pozo. Los cambios morfológicos se evaluaron mediante la captura de microfotografías con un microscopio invertido (LABOMED) a lo largo de su proceso de diferenciación. El área teñida de los cultivos celulares se cuantificó después de la tinción, en términos de porcentaje, utilizando el software ImageJ (Mercado-Rubio et al., 2021).

2.5.1 Diferenciación condrogénica de CTMLP.

La diferenciación condrogénica implicó el uso del medio de inducción de StemPro, siguiendo el protocolo del fabricante (StemPro™, Gibco™). El cultivo se mantuvo durante 14 días, tiempo en el cual se analizaron los cambios morfológicos, y en el día 14 se evaluó la diferenciación de las células mediante tinción con cristal violeta. Para la comparación se realizó la inducción hacia el linaje condrogénico en Matrigel y utilizando el cultivo 2D a manera de control.

2.5.2 Diferenciación adipogénica de CTMLP.

La diferenciación adipogénica implicó el uso del medio de inducción constituido por α -MEM suplementado con 10% de SFB, 1 μ M

dexametasona (DEX), 1.7 μ M insulina (INS), 60 μ M indometacina (INDO) y 500 μ M de isobutilmetil-xantina (IBMX) y 1% antibiótico/antimicótico. El cultivo se mantuvo durante 21 días, tiempo en el cual se analizaron los cambios morfológicos, y en el día 21 se evaluó la diferenciación de las células mediante tinción con Aceite Rojo Oleoso (*Oil Red O*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para la comparación se realizó la inducción hacia el linaje adipogénico en Matrigel y utilizando el cultivo 2D a manera de control.

2.5.3 Diferenciación osteogénica de CTMLP.

La diferenciación osteogénica implicó el uso del medio de proliferación (α -MEM + SFB al 10 %) suplementado con 50 μ M de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato y 10 nM de DEX (todos adquiridos de Sigma-Aldrich, EE. UU.). El cultivo se mantuvo durante 14 días, tiempo en el cual se analizaron los cambios morfológicos, y en el día 14 se evaluó la diferenciación de las células mediante tinción con Rojo de Alizarina (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para la comparación se realizó la inducción hacia el linaje osteogénico en Matrigel y utilizando el cultivo 2D a manera de control.

3. Resultados

3.1 Proliferación y viabilidad celular de Células Troncales de Ligamento Periodontal.

Con el objetivo de evaluar el potencial de proliferación y viabilidad *in vitro* de las CTMLP de un paciente masculino de 15 años (CLP-H15) se realizó una curva de proliferación y un análisis morfológico durante los 12 días de cultivo. En la Figura 1A, se puede observar en las microfotografías que la proliferación de las CLP-H15 incrementa en el transcurso del tiempo, obteniendo una viabilidad promedio del 90% (Figura 1C), lo que confirma que las CLP-H15 pueden proliferar en condiciones *in vitro*. Adicionalmente, los cambios observados en las microfotografías coinciden con la curva de proliferación, donde se observó la presencia de la fase de latencia hasta el día 2 después de la

siembre, la fase exponencial hasta el día 8 y la estacionaria del día 10 al 14 (Figura 2B), lo que sugiere un patrón típico de crecimiento del cultivo celular. Las células aisladas demostraron su

capacidad de formar agregados clonogénicos, con una eficiencia del del 7% \pm 0.7% en el día 9 de formación (Figura 2).

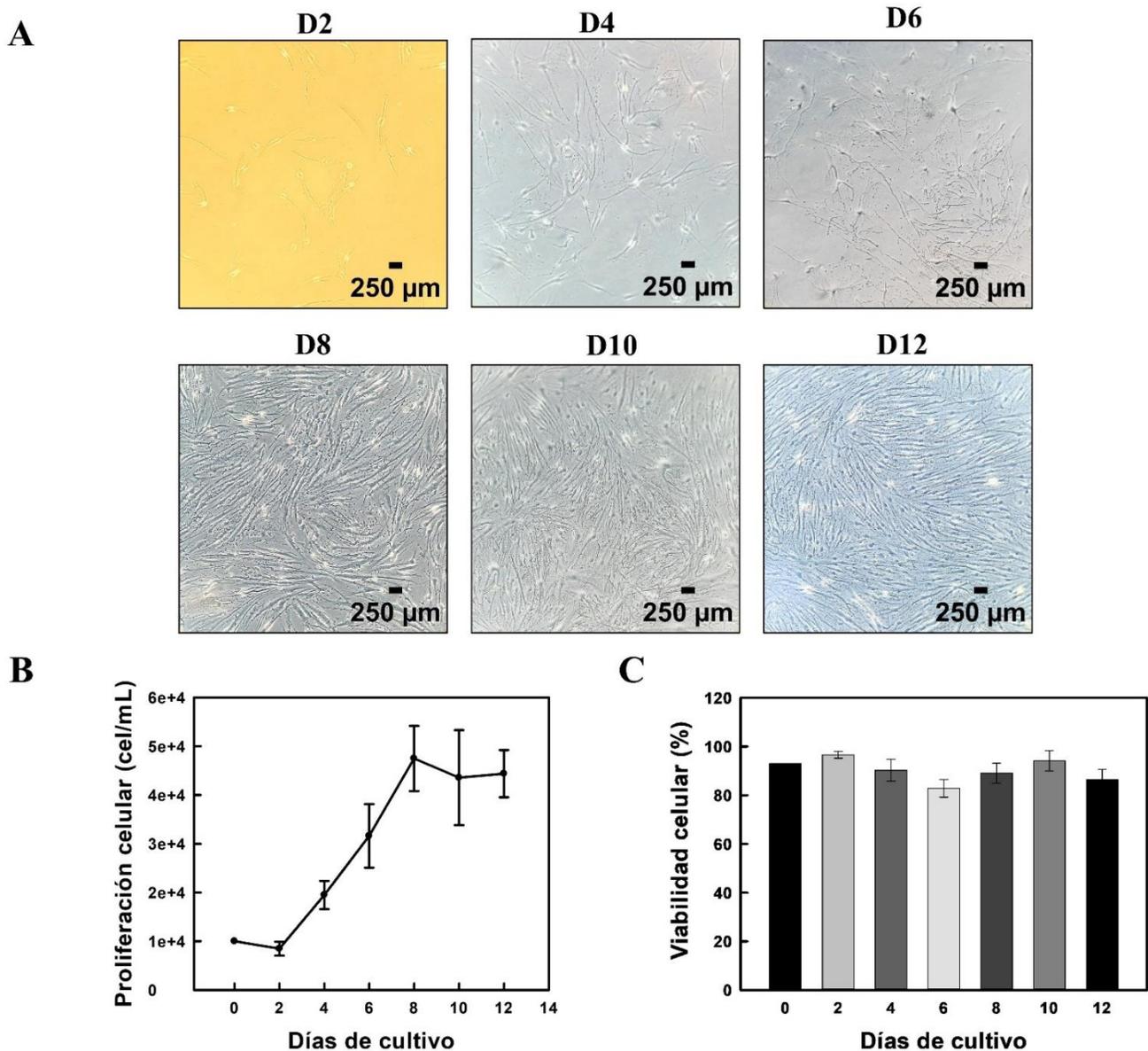


Figura 1. Proliferación y viabilidad de Células Troncales de Ligamento Periodontal. (A) Microfotografías representativas del crecimiento del día 0-12 de CLP-H15. (B) Proliferación celular de CLP-H15. (C) Viabilidad celular de CLP-H15. Las gráficas representan la media $n=5$. D: día de cultivo celular.

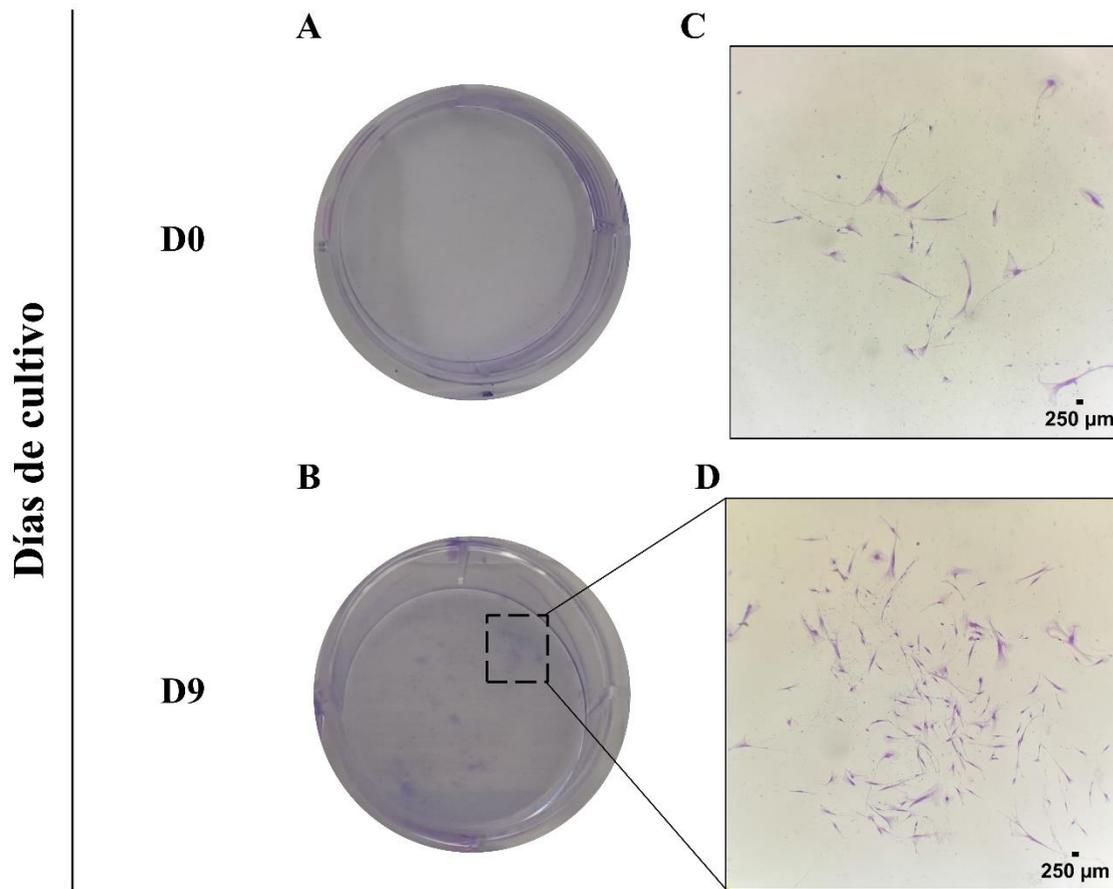


Figura 2. Unidades de Formadoras Colonias en Células Troncales del Ligamento Periodontal. (A-B) Fotografía representativa de una UFC en el día 0 y 9. (C-D) Microfotografía representativa de una UFC en el día 0 y 9. Las colonias se consideraron a partir de agregados de 50 o más células. Microfotografías tomadas con el objetivo 4x (C-D). D: día del cultivo celular.

3.2 Capacidad de diferenciación multilínea de Células Troncales de Ligamento Periodontal.

Los resultados demostraron que las CTMLP evaluadas en este estudio, poseen la capacidad de diferenciarse a los tres linajes mesenquimales, adipogénico, osteogénico y condrogénico (Figura 3). Tras el proceso de inducción, en cada uno de los linajes se observaron cambios morfológicos. Por ejemplo, en el condrogénico, se observó un patrón de crecimiento en espiral característico del linaje condrogénico y esto fue corroborado con la tinción con cristal violeta (Figura 3D). En el caso

del linaje adipogénico, se detectaron la formación de las vacuolas lipídicas, corroborada con la tinción con Aceite Rojo Oleoso (Figura 3E). Mientras que la osteogénesis se observó la formación de los depósitos de calcio mediante tinción con Rojo de Alizarina (Figura 3F).

Los resultados en su conjunto mostraron la capacidad multilínea de las CLP-H15 lo cual infiere que estas células cuentan con las características correspondientes a las células troncales mesenquimales.

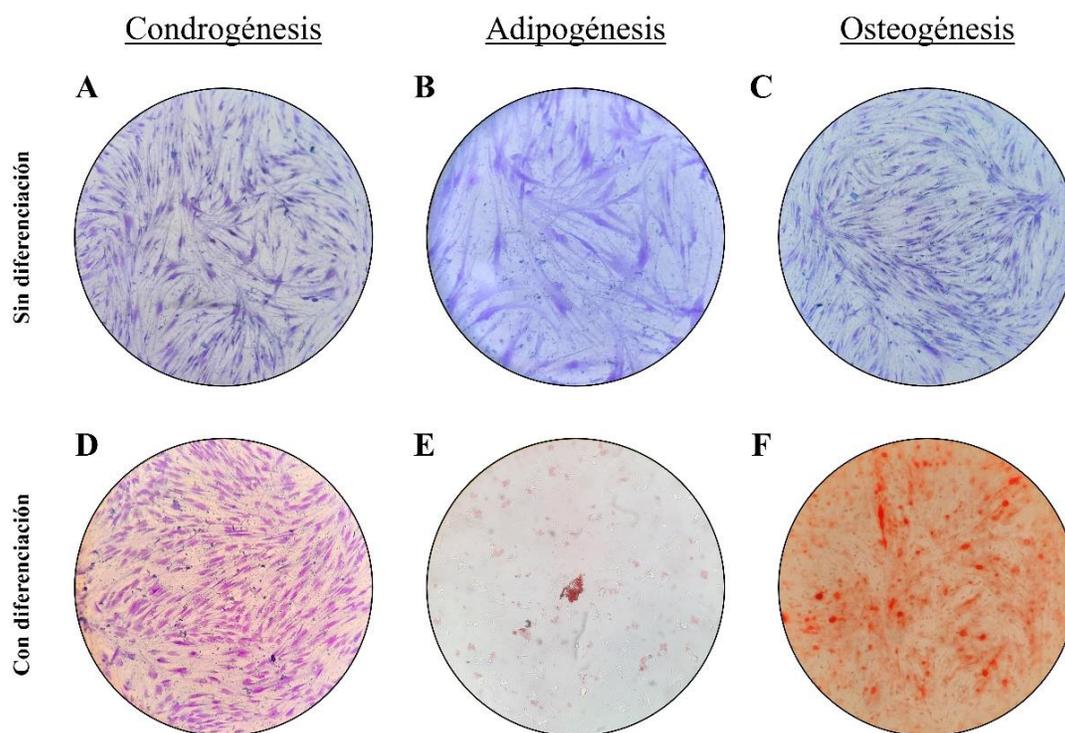


Figura 3. Caracterización celular del potencial de diferenciación multilineaje de células derivadas del ligamento periodontal humano. (A-C) Control de cultivo células sin inducción condrogénica, adipogénica y osteogénica (tinción con cristal violeta). (D) Linaje condrogénico teñido con cristal violeta. (E) Linaje adipogénico teñido con aceite rojo oleoso. (F) Linaje osteogénico teñido con rojo de alizarina. Microfotografías tomadas con el objetivo 10x (A, C, D, y F) y 20x (B y E).

3.3 Efecto del Matrigel en la diferenciación osteogénica de las Células Troncales del Ligamento Periodontal.

Para evaluar la respuesta de las CLP-H15 (P7) a los ambientes de cultivo 3D, las células fueron sometidas a la inducción osteogénica en Matrigel (Figura 4). De los resultados obtenidos se aprecia que el cultivo en 2D presentó una mayor retención del colorante de rojo de alizarina (Figura 4A; microfotografía a), lo que indica una mayor generación de depósitos de calcio (teñidos en rojo)

comparado con lo detectado en las células cultivadas con Matrigel (Figura 4A; microfotografía b). Esto infiere que las CTMLP tienen una mejor respuesta hacia el linaje osteogénico en un cultivo 2D. Esto coincide con los datos del análisis ImageJ que permitió la cuantificación por área teñida con el colorante (Figura 4B), donde células en cultivo 2D presentaron un 32.45% de tinción comparado con el 21.20% detectado en el cultivo con Matrigel.

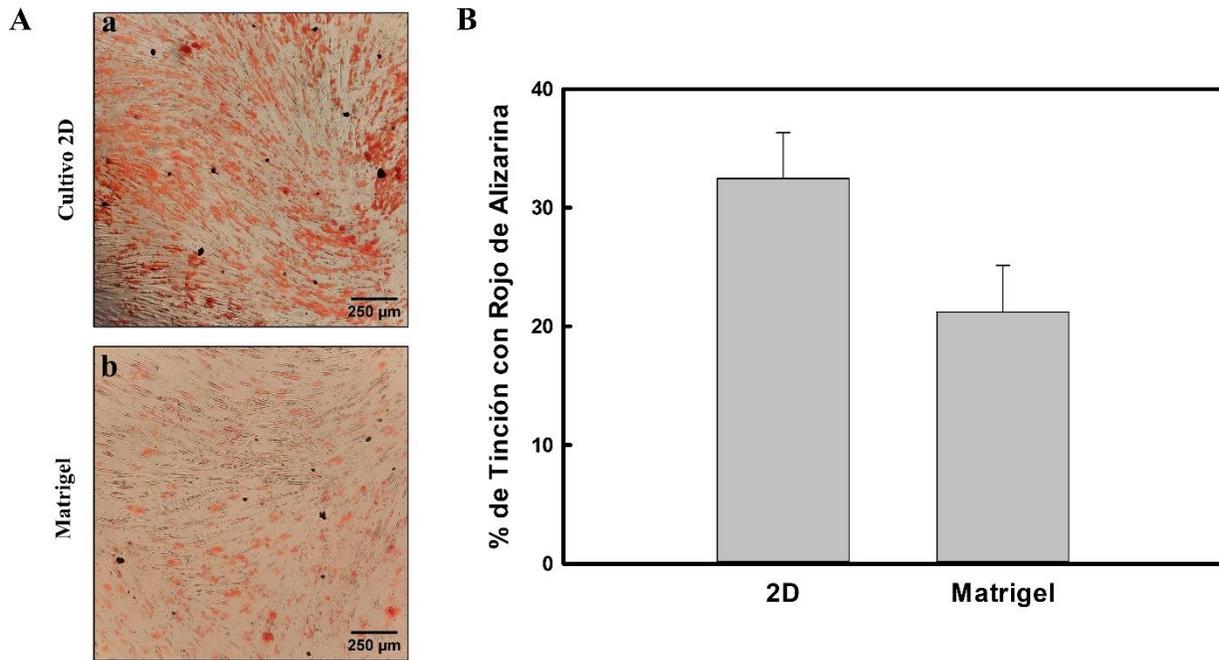


Figura 4. Diferenciación osteogénica de células derivadas del ligamento periodontal humano. (A) Microfotografías representativas de los depósitos de calcio formados durante la diferenciación osteogénica de las células del ligamento periodontal teñidas con Rojo de Alizarina, CLP-H15 en cultivo 2D (a), CLP-H15 cultivadas en Matrigel (b). Las microfotografías fueron tomadas con la magnificación a 10X. (B) Porcentaje de la superficie teñida con Rojo de alizarina analizadas con el software ImageJ.

4. Discusión

La determinación de los parámetros de crecimiento de los cultivos derivados del LP se realizó con el objetivo de conocer la dinámica de las poblaciones celulares en condiciones *in vitro*. Los análisis de proliferación, viabilidad y UFC permiten comparar la respuesta presentada en los cultivos de CTMLP 2D con otras líneas de CTMLP, ya que se ha reportado que la capacidad de proliferación celular también está relacionada con las características biológicas del donador del cual provienen, como la edad y el sexo (Tec et al., 2022). En 2015, Bressan y colaboradores evaluaron el efecto de la edad (16 a >66 años) y el pase celular (P2, P5 y P8) en la capacidad de

proliferación y potencial de diferenciación en CTM de la pulpa dental (CTMPD). Los resultados obtenidos demuestran que las CTMPD que obtuvieron el mayor tiempo de duplicación fueron las correspondientes al sector de 16-25 años en P2. Después de los 25 años, en todos los pases, esta capacidad disminuyó en proporción al pase *in vitro*, y fue hasta los 56 años que se presentó un alto nivel de proliferación en el P2 (Bressan et al., 2012).

Mercado y colaboradores reportaron los parámetros de proliferación, viabilidad y formación de colonias de CTMLP de un masculino de 12 años en P4. La viabilidad celular se mantuvo cerca al 95% hasta el día 10; en la

curva de proliferación se puede observar la presencia de la fase de latencia hasta el día 4 después de la siembra, y la fase exponencial hasta el día 14 (Mercado-Rubio et al., 2021). Por lo tanto, los resultados obtenidos concuerdan con lo

Las células mesenquimales poseen características biológicas establecidas por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés). Entre ellas se encuentra su capacidad de diferenciación hacia tres linajes mesenquimales, el adipogénico, el osteogénico y el condrogénico (Dominici et al., 2006). Los resultados obtenidos demuestran que las CTMLP presentan la capacidad característica de las CTM de diferenciarse a estos tres linajes (Figura 3). En cuanto a la diferenciación osteogénica, fue interesante detectar que la respuesta obtenida en este trabajo fue menor en las CTMLP en Matrigel comparada con las células cultivadas en 2D (Figura 4). En ese sentido, se ha reportado que el Matrigel puede acelerar la formación ósea y la mineralización de la matriz de osteoide en un modelo animal de rata *in vivo* donde se utilizó el Matrigel como andamio para las CT de folículo dental de rata (CTFDr) para promover la formación de hueso ectópico *in vivo* (Fu et al., 2019). En otro estudio, Kang y colaboradores investigaron el efecto del Matrigel sobre el potencial osteogénico de las CTM derivadas del tejido adiposo canino (CTM-Adc), donde las células caninas se cultivaron en matrices 2D y 3D y se implantaron en bolsas subcutáneas de perros con o sin Matrigel. En el cultivo, las células cultivadas con Matrigel mostraron mayor adherencia, proliferación y diferenciación osteogénica que aquellas cultivadas sin Matrigel; y en el sistema *in vivo*, las células implantadas con Matrigel mostraron un mayor potencial osteogénico que aquellas sin Matrigel (Kang et al., 2012). Adicionalmente, Eslaminejad y colaboradores demostraron que las CTM humanas aisladas de los aspirados de médula cultivadas en Matrigel presentaron una mayor respuesta a la diferenciación osteogénica que el cultivo 2D convencional, donde los depósitos de calcio en los

reportado y sugieren que estas células presentan una alta proliferación lo que demuestra su capacidad de autorrenovación y clonogenicidad, características de las CT.

cultivos de Matrigel fueron más extensos en comparación con la de los cultivos 2D (Eslaminejad et al., 2010).

La baja respuesta a la diferenciación osteogénica obtenida en las CTMLP pudiera explicarse debido a la naturaleza del tejido, ya que se ha reportado que células troncales aisladas del folículo dental (CTMFD), CTMPD y CTMLP humano al ser inducidas a los linajes adipogénico y osteogénico, su capacidad de diferenciación varía de acuerdo con el origen celular, siendo las CTMPD las que presentaron una capacidad mayor de diferenciación osteogénica en comparación con las dos anteriores, concluyendo así que el origen celular puede afectar la respuesta a la diferenciación en cultivos (Mercado-Rubio et al., 2021). De igual forma, la baja respuesta pudiera deberse al pase celular con el que se evaluó el potencial de diferenciación. Watt y colaboradores reportaron que la formación de depósitos de calcio de CTM derivadas del tejido adiposo humano cultivadas en medio osteogénico disminuyó en las células de los pases 4 a 7. No obstante, se observó que en el pase 10, los niveles de formación de depósitos de calcio volvieron a alcanzar valores cercanos o incluso superiores a los observados en las células primarias (Wall et al., 2007). Igualmente, se sugiere que esta baja diferenciación osteogénica pudiera deberse a las escasas interacciones que podrían haberse presentado entre los componentes de la matriz extracelular (MEC) y las CTMLP, ya que se sabe que el Matrigel imita adecuadamente las propiedades mecánicas y químicas de la MEC *in vivo*, recreando la interfaz tejido-tejido que imita la microarquitectura que se encuentra en los órganos (Fontoura et al., 2020). Se ha reportado que con una solución de Matrigel con una concentración de 9-12 mg/mL y una suspensión celular a una concentración de 2×10^5 cel/pozo incrementó el potencial osteogénico de CTM-Adc

(Kang et al., 2012), lo que representa 2 veces la concentración de Matrigel que se empleó en este trabajo y 20 veces la concentración celular.

Por lo tanto, se sugiere indagar más en los mecanismos bioquímicos o moleculares que pudieran estar afectando el proceso de diferenciación en las CTMLP. Así como, analizar otros linajes en las CTMLP y concentraciones de Matrigel para poder determinar si esta respuesta solo ocurre en el linaje osteogénico.

5. Conclusión

Los resultados demostraron que las CT aisladas del ligamento periodontal humano tienen características mesenquimales; sin embargo, las células que fueron cultivadas en Matrigel no

presentaron una mejoría en el proceso de diferenciación osteogénica en comparación con el cultivo 2D, lo cual no concuerda con lo reportado. Por lo que es necesario, indagar en los mecanismos que pudieran estar afectando la respuesta a la diferenciación.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto Ciencia de Frontera CONAHCYT (BR-J, CF: 429849). También se agradece al Laboratorio Traslacional de Células Troncales de la Cavity Bucal de la Facultad de Odontología. Finalmente, un agradecimiento al pasante C.D. Sergio Puc Moo por su apoyo clínico en la obtención del ligamento periodontal.

Referencias

- Bressan, E., Ferroni, L., Gardin, C., Pinton, P., Stellini, E., Botticelli, D., Sivoletta, S., & Zavan, B. (2012). Donor Age-Related Biological Properties of Human Dental Pulp Stem Cells Change in Nanostructured Scaffolds. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049146>
- Cea-Sanhueza, M., & Sánchez-Sanhueza, G. (2016). Oral mesenchymal stem cells: State of the art in dentistry. *Av. Odontoestomatol*, 32(2), 97–105.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Eslaminejad, M. B., Bagheri, F., & Zomorodian, E. (2010). Matrigel Enhances in vitro Bone Differentiation of Human Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. In *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* (Vol. 13, Issue 1). www.SID.ir
- Fontoura, J. C., Viezzer, C., dos Santos, F. G., Ligabue, R. A., Weinlich, R., Puga, R. D., Antonow, D., Severino, P., & Bonorino, C. (2020). Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering C*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110264>
- Fu, T., Liang, P., Song, J., Wang, J., Zhou, P., Tang, Y., Li, J., & Huang, E. (2019). Matrigel scaffolding enhances BMP9-induced bone formation in dental follicle stem/precursor cells. *International Journal of Medical Sciences*, 16(4), 567–575. <https://doi.org/10.7150/ijms.30801>
- Josan, C., Kakar, S., & Raha, S. (2021). Matrigel® enhances 3T3-L1 cell differentiation. *Adipocyte*, 10(1), 361–377. <https://doi.org/10.1080/21623945.2021.1951985>
- Kang, B. J., Ryu, H. H., Park, S. S., Kim, Y., Woo, H. M., Kim, W. H., & Kweon, O. K. (2012). Effect of Matrigel on the osteogenic potential of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(7), 827–836. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0484>
- Mercado-Rubio, M. D., Pérez-Argueta, E., Zepeda-Pedreguera, A., Aguilar-Ayala, F. J., Peñaloza-Cuevas, R., Kú-González, A., Rojas-Herrera, R. A., Rodas-Junco, B. A., & Nic-Can, G. I. (2021).

- Similar features, different behaviors: A comparative in vitro study of the adipogenic potential of stem cells from human follicle, dental pulp, and periodontal ligament. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/jpm11080738>
- Montero, J. A., Toro, D., Can, G. N., Adriana, B., & Junco, R. (2021). CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO in vitro DE CÉLULAS AISLADAS EN DIFERENTES PORCIONES DE LA PULPA DENTAL HUMANA. *Ingeniería-Revista Académica de La Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán*, 25(3).
- Serralta-Interian, A., Teresa Hernández-Sotomayor, S. M., & Rodas-Junco, B. A. (2022). El futuro de la medicina está en tu boca: Las células madre de los dientes. *Desde El Herbario CICY*, 14, 32–35. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Tec, C., Juan, J., Angélica, I., Fernando, A. A., Rendiz Diana, E., Can Geovanny, N., Sotomayor Teresa, H., Junco, R., & Adriana, B. (2022). COMPARACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS AISLADAS DE LA PULPA DENTAL OBTENIDAS DE TERCEROS MOLARES DE UN SOLO DONADOR MORPHOLOGICAL COMPARISON OF CELLS ISOLATED FROM DENTAL PULP OBTAINED FROM THIRD MOLARS FROM A SINGLE DONOR. *Ingeniería-Revista Académica de La Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán*, 26(1).
- Wall, M. E., Bernacki, S. H., & Lobo, E. G. (2007). Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 13(6), 1291–1298. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0275>
- Yang, J. W., Shin, Y. Y., Seo, Y., & Kim, H. S. (2020). Therapeutic functions of stem cells from oral cavity: An update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1–24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21124389>
- Ylostalo, J. H. (2020). 3D Stem Cell Culture. In *Cells* (Vol. 9, Issue 10). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9102178>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>