

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL SUPLEMENTO FREEADD EN LA MORFOLOGÍA Y DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS TRONCALES DE PULPA DENTAL HUMANA

Angelica A. Serralta Interian^{1,3}, Jannet Ramos Villanueva^{2,3}, Beatriz A. Rodas Junco^{3,4}

¹ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Kilómetro 33.5. Mérida, Yucatán, CP 97302.

² Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N-Edificio 5, Centro Universitario, Santiago de Querétaro, Qro., 76017.

³ Laboratorio de Células Troncales, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, calle 61A x 90 y 92. Mérida, Yucatán, CP 97000.

⁴ SECIHTI- Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Kilómetro 33.5, Mérida, Yucatán, CP 97203

Fecha de recepción: 23 de octubre de 2025 - Fecha de aceptación: 16 de diciembre de 2026

Resumen

El cultivo celular es una técnica esencial en la investigación biológica, que facilita estudios *in vitro* sobre diversas enfermedades. En este contexto, el suero fetal bovino (SFB) es un suplemento clave, ya que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento celular. Sin embargo, su producción plantea importantes preocupaciones éticas y la variabilidad entre lotes que puede comprometer la reproducibilidad de los resultados experimentales. En respuesta a estas limitaciones, varias compañías han desarrollado medios definidos químicamente y libres de suero, como FreeAdd. Debido a ello, en este estudio se evaluó el efecto del FreeAdd en la morfología, cambios en la expresión de los genes de pluripotencia y capacidad de diferenciación osteogénica de las células troncales de pulpa dental humana (CTPDh). Utilizando el medio de cultivo convencional (Medio Eagle's alfa modificado) y un medio comercial para el uso del reemplazo de suero (F10 Ham's) suplementados con el SFB (control) o con el FreeAdd. Los resultados obtenidos mostraron una morfología celular más corta cuando se encontraban en presencia de FreeAdd a comparación de las que se encontraban en SFB que era fusiforme. A pesar de ello, no hubo cambios en los niveles de transcritos de genes de pluripotencia, sin embargo, bajo las condiciones de suplementación empleadas en este trabajo, la diferenciación osteogénica fue menor cuando se encontraban en presencia de FreeAdd.

Palabras clave: células dentales, células troncales de pulpa dental, suero fetal bovino, FreeAdd, osteogénesis

*beatriz.rodas@correo.uady.mx

Nota: Este artículo de investigación es parte de Ingeniería–Revista Académica de la Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán, Vol. 30, No. 1, 2026, ISSN: 2448-8364

ANALYSIS OF THE EFFECT OF THE FREEADD SUPPLEMENT ON THE MORPHOLOGY AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS

Abstract

Cell culture is essential in biological research, facilitating *in vitro* studies on various diseases. In this context, fetal bovine serum (FBS) is a key supplement, providing the nutrients necessary for cell growth. However, its production raises important ethical concerns, and batch-to-batch variability can compromise the reproducibility of experimental results. In response to these limitations, several companies have developed chemically defined and serum-free media, such as FreeAdd. Therefore, this study evaluated the effect of FreeAdd on morphology, changes in pluripotency gene expression, and osteogenic differentiation capacity of human dental pulp stem cells (hDPSCs). We used conventional culture medium (α -Modified Eagle's Medium), and a commercial medium designed for serum replacement (Ham's F10), supplemented with either FBS (control) or FreeAdd. The results showed that cells exhibited a shorter morphology in the presence of FreeAdd compared to the fusiform shape observed with FBS. Despite this, no changes were detected in the transcript levels of pluripotency genes. However, under the supplementation conditions used in this study, osteogenic differentiation was reduced in the presence of FreeAdd.

Keywords: Dental cells, dental pulp stem cells, fetal bovine serum, FreeAdd, osteogenesis

1. Introducción

La técnica de cultivo celular es una herramienta fundamental y ampliamente utilizada en diversas áreas de la investigación biológica, como el modelado de enfermedades, la medicina regenerativa y el estudio de células troncales, entre otras (Paradkar et al., 2019). Esta metodología ha permitido reemplazar estudios *in vivo* por sistemas menos invasivos, como los cultivos celulares *in vitro* (Verma et al., 2020).

En los cultivos celulares, el medio de cultivo y sus suplementos desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la viabilidad, crecimiento y proliferación celular. Uno de los suplementos más importantes de estos medios es el suero fetal bovino (SFB), que provee una fuente rica de hormonas, factores de crecimiento, aminoácidos, proteínas, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos, carbohidratos y lípidos, todos esenciales para el metabolismo y el crecimiento celular, lo que lo convierte en un suplemento clave en el cultivo celular (Hawkes, 2015).

Sin embargo, la creciente demanda por el uso de este compuesto plantea preocupaciones éticas, dado que la sangre necesaria para su producción se obtiene de fetos bovinos provenientes de ganado preñado. Cada año, más de dos millones de fetos bovinos son sacrificados para producir aproximadamente 800,000 litros de SFB (Brindley et al., 2012; Chelladurai et al., 2017). Además de los dilemas éticos, la variabilidad entre lotes del SFB puede comprometer la validez experimental de las investigaciones.

En las últimas décadas, se han explorado varias alternativas al SFB como suplementos en los medios de cultivo celular, pero la búsqueda de un sustituto que no comprometa los avances científicos sigue siendo el desafío principal (Chelladurai et al., 2017; Gstraunthaler, 2003).

Entre estas alternativas, los medios químicamente definidos, libres de suero, han ganado popularidad en la producción clínica y farmacéutica debido a

que sus componentes y concentraciones están bien definidos y no contienen productos derivados de animales o humanos, incluyendo la albúmina (Piletz et al., 2018; van der Valk et al., 2010). Sin embargo, cada tipo de célula tiene requisitos específicos para su supervivencia, crecimiento y diferenciación.

Las células troncales de pulpa dental humana (CTPDh), han demostrado un alto potencial de diferenciación hacia el linaje osteogénico (Mercado-Rubio et al., 2021), por lo que representan un modelo prometedor para estudiar la regeneración ósea en diversas condiciones clínicas. No obstante, el proceso de diferenciación osteogénica puede ser modulado por varios factores, incluyendo suplementos nutricionales y compuestos bioactivos que actúan sobre los mecanismos celulares y moleculares involucrados (de Girolamo et al., 2007; Kyllönen et al., 2013). Además, para su futura aplicación en terapias autólogas, es necesario sustituir el SFB en los medios de diferenciación.

En ese contexto, el suplemento FreeAdd, podría ser una alternativa prometedora para sustituir el SFB en los medios de diferenciación osteogénica debido a su formulación rica en minerales y compuestos antioxidantes. Estudios preliminares han sugerido que este tipo de suplementos puede mejorar la proliferación celular y potenciar los procesos de diferenciación, aunque su impacto específico en la osteogénesis de CTPDh aún no ha sido estudiado a fondo (Cowper et al., 2019; Eydt et al., 2016; Pilgrim et al., 2022).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto *in vitro* del suplemento FreeAdd sobre la morfología celular y la capacidad de diferenciación osteogénica de las CTPDh. La comprensión de cómo FreeAdd influye en estos procesos podría proporcionar información valiosa para futuras aplicaciones terapéuticas en el campo de la regeneración ósea.

2. Metodología

2.1 Cultivo celular en los medios libres de SFB

Para este estudio, se utilizaron CTPDh en fase 6 y 7 (P6 y P7) criopreservadas de un paciente masculino de 18 años, con previa firma del consentimiento informado (Número de Aprobación: CIE-06-2017). Las CTPDh se sembraron en placas de cultivo de 12 pozos a una densidad de 1×10^4 células/pozo y se mantuvieron en el medio esencial mínimo Eagle (α -MEM, Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco) y 1% de Antibiótico/Antimicótico, conformado por penicilina/estreptomicina, Gibco a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda, hasta alcanzar una confluencia del 60%. Para las evaluaciones con FreeAdd, se emplearon dos tipos de medios de cultivo: α -MEM y el medio F10 de Ham's (Biowest), diseñado específicamente para el crecimiento celular en ausencia de suero fetal bovino (SFB).

La combinación de los tratamientos evaluados fueron las siguientes: α -MEM + SFB (α -MEM + 10% SFB + 1% A/A) el cual sirvió como control, α -MEM + FreeAdd (α -MEM + 20% FreeAdd + 1% A/A), F10 + SFB (F10 + 10% SFB + 1% A/A) y F10 + FreeAdd (α -MEM + 20% FreeAdd + 1% A/A).

2.2 Evaluación de los cambios morfológicos

Los cambios morfológicos de las CTPDh en respuesta a los distintos medios con y sin SFB fueron evaluados mediante microfotografías durante 6 días. Al finalizar este periodo, se realizó una tinción con cristal violeta para facilitar una observación clara de la morfología celular. Para ello, las células fueron lavadas previamente con el amortiguador de fosfatos (PBS 1x pH 7.4) y posteriormente incubadas durante 30 minutos con una solución al 0.05% final de cristal violeta (Sigma-Aldrich). Transcurrido el tiempo de la tinción, se realizaron lavados con agua destilada

para eliminar el exceso de colorante. Las microfotografías fueron obtenidas mediante un microscopio invertido (TCM400, LABOMED).

2.3 RT-PCR de los marcadores de pluripotencia

Para evaluar si las CTPDh cultivadas en presencia de los diferentes medios libres de SFB mantenían su pluripotencia y autorrenovación, se analizaron los transcritos de los genes marcadores de pluripotencia (*SOX2*, *OCT4* y *NANOG*). La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. La concentración y pureza del ARN total extraído fueron determinados mediante espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, la síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó con el kit

PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis (TaKaRa) de acuerdo con el protocolo reportado por el proveedor. La amplificación de los genes se llevó a cabo mediante RT-PCR punto final, empleando un termociclador (C1000 #185-1196, Bio-Rad) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a una temperatura específica para cada par de cebadores por 30 seg, y extensión a 72 °C por 30 seg; con una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Gold (Invitrogen) utilizando un transiluminador (Gel Doc XR+, Bio-Rad). Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los genes marcadores de pluripotencia empleados en este estudio

Genes	Secuencia forward 5'→3'	Secuencia Reverse 5'→3'	TA (°C)	Ref.
<i>SOX2</i>	ACACCAATCCCATCCACACT	CCTCCCCAGGTTTCTCTGT	62	Lefterova et al., 2014
<i>OCT4</i>	GAAAGGGACCGAGGAGTA	CCGAGTGTGGTTCTGTAAC	62	Qiao et al., 2014
<i>NANOG</i>	TGCTGAGATGCCTCACACGGA	TGACCGGGACCTTGTCTTCCTT	60	Lefterova et al., 2014
<i>18S</i>	GGACAGGATTGACAGATTGAT	AGTCTCGTTCGTTATCGGAAT	60	Diseño propio

TA: Temperatura de alineamiento. Ref.: Referencia

2.4 Diferenciación osteogénica

Previo a la diferenciación osteogénica, las CTPDh fueron cultivadas durante 6 días en presencia de los medios listados en el apartado 2.1. Finalizado el tiempo, las células fueron sometidas a diferenciación osteogénica durante 14 días utilizando el medio de inducción osteogénico

(MIO), compuesto por α -MEM suplementado con 10 % de SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico, 50 μ M de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato y 10 nM de Dexametasona (todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich).

2.5 Tinción con rojo de alizarina

Para confirmar la formación de depósitos de calcio las CTPDh fueron teñidas con rojo de alizarina S. Las CTPDh fueron fijadas durante 30 min con formaldehído al 10%. Posteriormente se lavaron con PBS 1X y se tiñeron con una solución de 2 % de rojo de alizarina S (Sigma-Aldrich) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con agua y se realizó un registro fotográfico mediante un microscopio invertido. Adicionalmente, se realizó el análisis de la deposición de calcio mediante microfotografías empleando el programa Image J.

2.6 Análisis estadísticos

Para evaluar las diferencias significativas entre datos de deposición de calcio, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando graphpad y una prueba de Dunnet como un análisis *post hoc*.

3. Resultados

3.1 Cambios morfológicos de las células de pulpa dental humana en el medio de cultivo con FreeAdd

En el medio de cultivo control (α -MEM o F10 con SFB), las CTPDh mostraron una morfología fusiforme característica de este linaje celular, con una disposición dispersa, alargada y sin cambios notables en la organización celular (Figura 1, microfotografías a, e, i, m y microfotografías c, g, k, o).

Tras el reemplazo con el suplemento FreeAdd, se observó cambios en la morfología de las CTPDh, las cuales presentaron una morfología más aplanada y corta en comparación con las células control (Figura 1, microfotografías b, f, i, n y microfotografías d, h, l, p). Estos cambios fueron más notorios al día 6 de crecimiento celular cuando se tiñeron con cristal violeta, donde las CTPDh cultivadas en presencia de SFB presentaron un crecimiento característico fusiforme con una confluencia óptima en el crecimiento (Figura 1, microfotografías m y o); sin embargo, las CTPDh cultivadas en presencia de FreeAdd presentaron una reducción en la elongación celular, adoptando una morfología poligonal o estrellada, además de una disminución en la confluencia celular (Figura 1, microfotografías n y p).

3.2 Evaluación de la expresión de los genes marcadores de pluripotencia

Con el objetivo de evaluar si el medio de cultivo suplementado con FreeAdd contribuye al mantenimiento del estado pluripotente de las CTPDh, se analizó la expresión de los genes *SOX2*, *OCT4* y *NANOG* — factores de transcripción esenciales para la pluripotencia— mediante RT-PCR. Los resultados no mostraron diferencias en la intensidad de las bandas correspondientes a estos genes entre las condiciones de cultivo con SFB y aquellas con FreeAdd (Figura 2). Esto indica que la expresión de estos marcadores de pluripotencia se mantiene estable bajo ambas condiciones. Por lo tanto, el FreeAdd pudiera emplearse como un sustituto del SFB para el cultivo celular, aunque es necesario complementar estos resultados con análisis cuantitativos para confirmar su eficiencia.

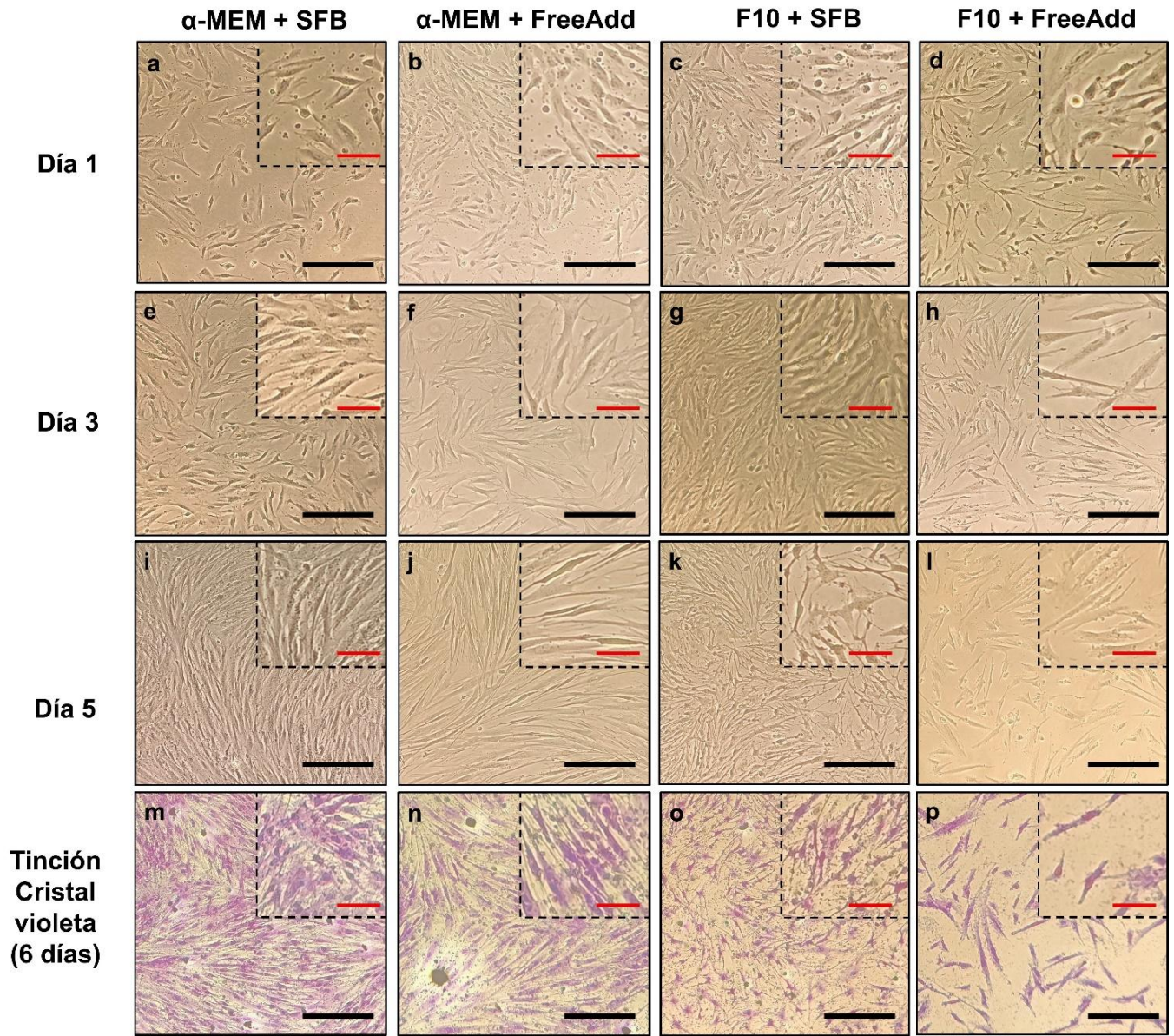


Figura 1. Efecto de los medios de cultivo (α -MEM y F10) suplementados con SFB y/o FreeAdd sobre la morfología de las CTPDh durante 6 días de cultivo. Los cambios en la morfología se señalan con recuadros con líneas punteadas. La barra de escala negra representa 300 μ m, mientras que la barra de escala roja corresponde a 100 μ m. Imágenes tomadas a 10X en un microscopio invertido.

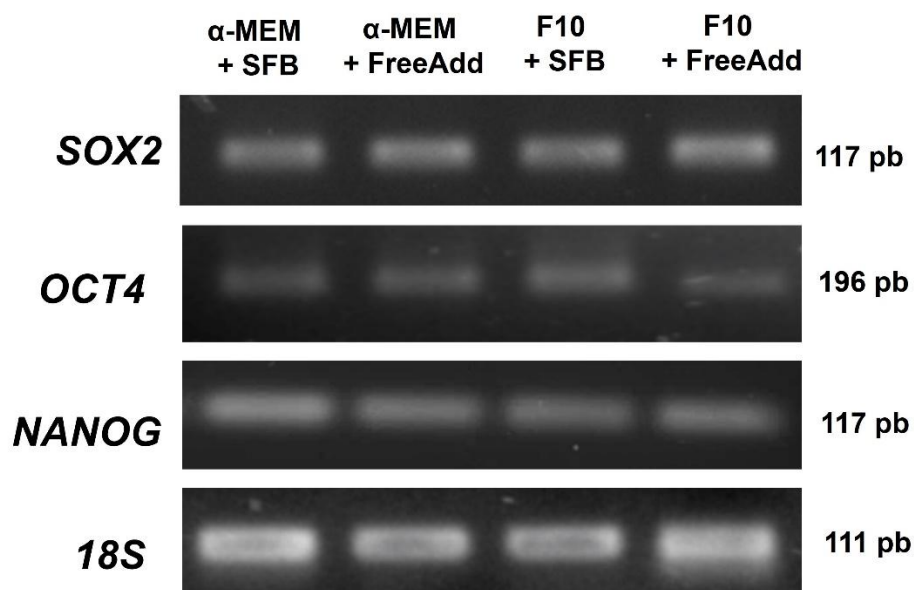


Figura 2. Expresión de los genes *SOX2*, *OCT4* y *NANOG* en CTPDh cultivadas en medios suplementados con SFB y/o FreeAdd. La imagen muestra la expresión de estos genes, amplificados mediante RT-PCR, en CTPDh después de 6 días de cultivo en los medios correspondientes. Imagen obtenida por un transiluminador de un gel de agarosa al 1.2%, teñido con Sybr Gold.

3.3 Evaluación del potencial de diferenciación osteogénica en células tratadas con FreeAdd

Al inicio de la inducción, las CTPDh en presencia de SFB mostraban una morfología fusiforme (Figura 3A, microfotografías a y e), mientras que las tratadas con FreeAdd presentaban una forma más corta y aplanada (Figura 3A, microfotografías c y g).

A los 14 días, la tinción con rojo de alizarina S indicó una mayor formación de depósitos de calcio en las células cultivadas con SFB (Figura 3A microfotografías b y f). En contraste, las células tratadas con α -MEM + FreeAdd mostraron una diferenciación osteogénica reducida (Figura

3A, microfotografía d), mientras que en las CTPDh cultivadas en F10+FreeAdd la diferenciación fue prácticamente nula (Figura 3A, microfotografía h). Estos resultados se correlacionan con la cuantificación de los depósitos de calcio realizada mediante ImageJ, donde se observó aproximadamente un 35% de formación de depósitos de calcio en las CTPDh tratadas con SFB. En comparación, las células cultivadas con α -MEM+FreeAdd presentaron aproximadamente un 2% de formación de depósitos de calcio y aquellas cultivados en F10+FreeAdd apenas alcanzaron un 0.4% (Figura 3B).

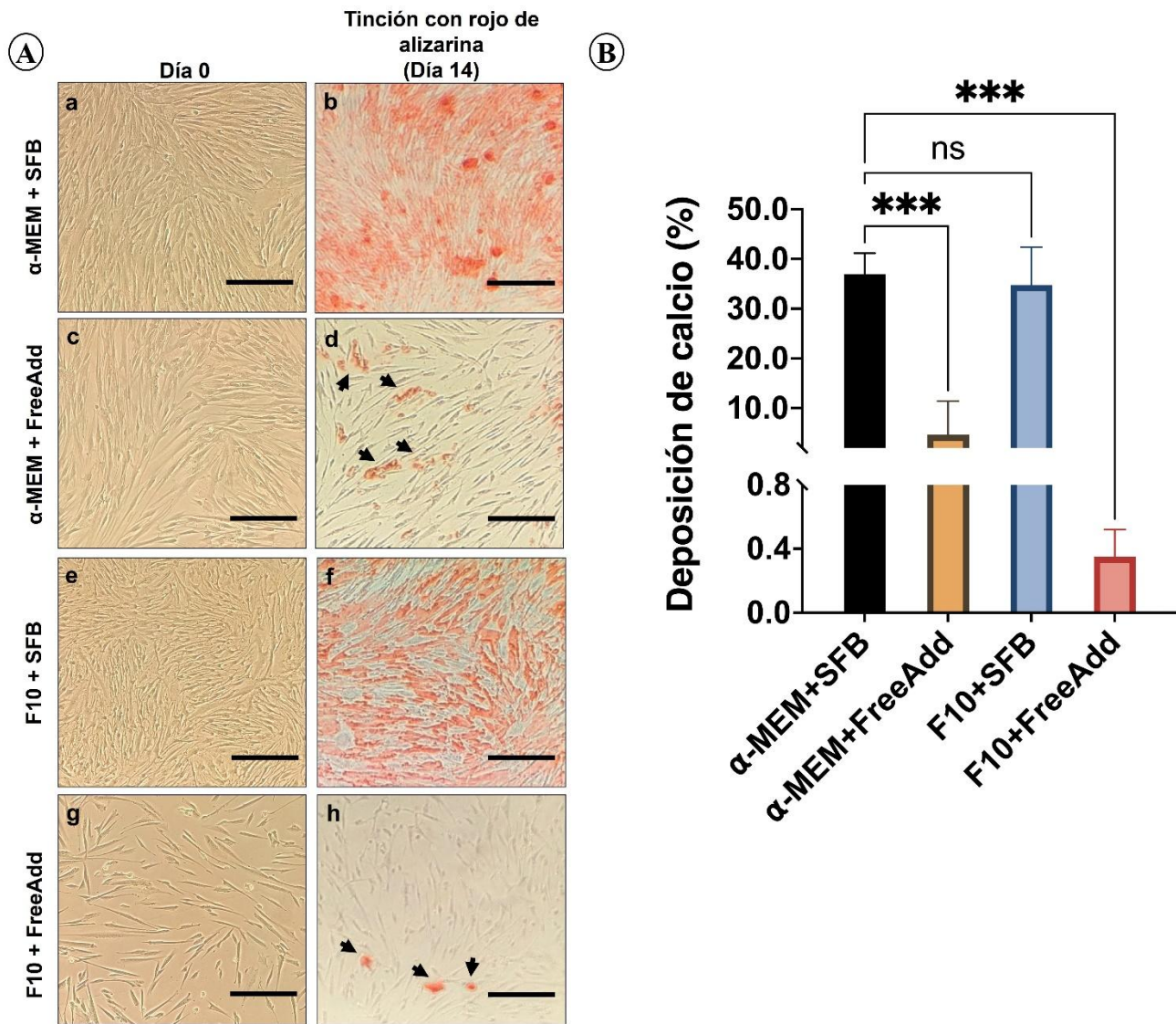


Figura 3. Evaluación de la diferenciación osteogénica de CTPDh cultivadas en medios con SFB y FreeAdd. (A) Microfotografías de las CTPDh al día 0 y 14 de diferenciación osteogénica. Las flechas indican áreas representativas donde se evidencia escasa o nula mineralización. Microfotografías tomadas a 10X; la barra de escala representa 300 μ M. (B) Porcentaje de la deposición de calcio utilizando el software ImageJ. Los resultados representan la media \pm error estándar (ES) para $n=3$. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de pruebas *post hoc* de Dunnet. *** diferencia significativa $p \leq 0.05$; ns: sin diferencia significativa.

4. Discusión

En este estudio, se evaluó el efecto del suplemento FreeAdd sobre la morfología y diferenciación osteogénica de las CTPDh. Los resultados obtenidos indicaron que el FreeAdd induce cambios en la morfología celular, las cuales

adoptaron una forma más corta y aplanada en comparación con la morfología fusiforme

observada en las células cultivadas en medios con SFB (Figura 1).

Hasta la fecha, no existen reportes específicos acerca efecto del FreeAdd sobre la morfología de las células troncales. Sin embargo, se ha reportado que el FreeAdd, proveen ventajas sobre el crecimiento de las células troncales al ser suplementos definidos y libres de componentes animales. Aunque, la información sobre la formulación de este compuesto por parte de las empresas es a menudo limitada y, por lo tanto, impide considerarlos completamente definidos, lo cual limita su reproducibilidad y puede presentar efectos en el crecimiento y morfología dependiente del linaje celular (van der Valk et al., 2010).

Estudios previos donde emplearon sustitutos de suero químicamente definidos como el isoMATRIX en células mesenquimales humanas mostraron una reducción en el tamaño celular, aunque con una tasa de proliferación mayor en comparación con aquellas cultivadas en SFB; sin embargo, los autores reportan que el uso de este compuesto aún debe ser optimizado (Thamm et al., 2022). Por otro lado, (Simões et al., 2013) observaron que las células del cordón umbilical humano cultivadas en el medio StemPRO® MSC SFM XenoFree no presentaron diferencias significativas en su crecimiento respecto a las cultivadas en SFB. A diferencia con estos reportes, el FreeAdd no promovió una morfología favorable ni mantuvo la forma fusiforme característica de las CTPDh. Esta diferencia podría atribuirse a que la respuesta morfológica a suplementos libres de SFB es altamente dependiente del tipo y linaje celular. Además, la falta de información precisa sobre la composición del FreeAdd dificulta conocer qué componentes podrían estar modulando negativamente la morfología. En este contexto, resulta fundamental evaluar si estos suplementos afectan el estado de pluripotencia de las células. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la expresión de los genes *SOX2*, *OCT4* y *NANOG*, factores de transcripción fundamentales para el mantenimiento del estado pluripotente e indiferenciado de las células troncales (Foroutan and Foroutan, 2016; Liu et al., 2009; Yuan et al., 2017). Estos genes forman una red de regulación

genética que asegura la autorrenovación y previene la diferenciación prematura. Su alta expresión es indicativa de un fenotipo pluripotente, mientras que su disminución suele asociarse al inicio de programas de diferenciación (Li et al., 2021; Kashyap et al., 2009).

De forma interesante, en este estudio no se detectaron diferencias significativas en la expresión de *SOX2*, *OCT4* y *NANOG* entre los cultivos suplementados con FreeAdd y los tratados con SFB (Figura 2), lo que sugiere que FreeAdd no compromete la pluripotencia de las CTPDh. Esta conservación del perfil de pluripotencia podría ser importante para aplicaciones donde se requiere mantener las células en un estado indiferenciado antes de inducir su diferenciación.

En este contexto, surge la interrogante sobre cómo el suplemento FreeAdd influye en el proceso de diferenciación osteogénica de estas células, las cuales poseen una predisposición natural hacia la diferenciación osteogénica (Mercado-Rubio et al., 2021). De manera interesante, las CTPDh precultivadas en FreeAdd demostraron una capacidad reducida para diferenciarse hacia el linaje osteogénico en comparación con aquellas cultivadas en medios suplementados con SFB (Figura 3A). Estos resultados sugieren que, aunque FreeAdd puede preservar la pluripotencia, su formulación actual podría requerir una optimización para favorecer eficazmente la diferenciación osteogénica.

El efecto del FreeAdd en la morfología de las CTPDh pudiera estar asociada con una menor capacidad de diferenciación osteogénica, ya que se observó una menor formación de depósitos de calcio en los cultivos con FreeAdd en comparación con los que contenían SFB (Figura 3B). Esto sugiere que este suplemento no es tan eficiente como el SFB para inducir la osteogénesis.

Estos resultados son coherentes con estudios previos que señalan que la morfología celular puede ser un indicador temprano de la capacidad

de diferenciación, donde las células troncales que mantienen una forma más alargada tienden a diferenciarse más fácilmente hacia el linaje osteogénico (Matsuoka et al., 2013). Asimismo, se ha reportado que el uso de sustitutos comerciales o químicamente definidos del SFB, puede influir positivamente en la diferenciación adipogénica, favoreciendo la maduración de las células mesenquimales humanas (Lee et al., 2017; Panella et al., 2021).

Por otro lado, alternativas al SFB, como el suero humano (huS) y el lisado de plaquetas (hPL), han demostrado mejorar significativamente el potencial de diferenciación osteogénica en fibroblastos humanos y células troncales derivadas de tejido adiposo, en comparación con cultivos en SFB (Witzeneder et al., 2013).

De manera similar, se ha demostrado que el uso transitorio de suero humano promueve la diferenciación osteogénica de células mesenquimales humanas, e incrementa significativamente los niveles de los componentes osteogénicos, como la fosfatasa alcalina y la 25-hidroxivitamina D (Popov et al., 2019). Lo que sugiere la importancia de investigar acerca de nuevas alternativas al SFB, incluyendo suplementos comerciales como FreeAdd y otras fuentes biológicas como el suero humano, plasma rico en plaquetas, extractos de plantas, entre otros. Estas alternativas pudieran mejorar la diferenciación osteogénica en las CT de origen dental y superar las limitaciones asociadas al uso del SFB.

En conjunto, estos resultados sugieren que FreeAdd altera la morfología y la capacidad osteogénica de las CTPDh, pero no tiene un impacto negativo sobre la expresión de genes de

pluripotencia. Sin embargo, será necesario realizar estudios adicionales para definir la mejor estrategia de implementación de FreeAdd en medios de cultivo y evaluar si ajustes en su formulación pueden mejorar su capacidad de inducir diferenciación osteogénica sin comprometer la morfología ni la viabilidad celular.

5. Conclusión

Este estudio demostró que el suplemento FreeAdd altera la morfología celular y disminuye la capacidad osteogénica de las CTPDh, sin afectar la expresión de genes de pluripotencia como *SOX2*, *OCT4* y *NANOG*. Estos resultados sugieren que, si bien FreeAdd mantiene el estado indiferenciado de las células, su aplicación en protocolos de diferenciación osteogénica debe ser cuidadosamente ajustado. Además, se recomienda implementar estudios futuros para la optimización de su concentración y modo de aplicación en el medio de cultivo para mejorar su desempeño según el objetivo celular específico, ya sea promover la proliferación, preservar la pluripotencia o inducir la diferenciación celular.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto Ciencia de Frontera-SECIHTI (Núm. 429849, B.R.J), al programa Investigadores por México (No. de proyecto 1882, B.R.J) y al programa estancias posdoctorales por México (Núm. 474112, A.S.I). Asimismo, se agradece a la Facultad de Ingeniería Química y a la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán por el apoyo brindado.

Referencias

Brindley, D. A., Davie, N. L., Culme-Seymour, E. J., Mason, C., Smith, D. W., & Rowley, J. A. (2012). Peak serum: Implications of serum supply for cell therapy manufacturing. *Regenerative Medicine*,

- 7(1), 7–13. <https://doi.org/10.2217/RME.11.112/ASSET//CMS/ASSET/5E1ED6BA-4F9D-4CDA-B254-4FD5463796D1/RME.11.112.FP.PNG>
- Chelladurai, K. S., Durairaj, J., Christyraj, S., Rajagopalan, K., Yesudhasan, B. V., Venkatachalam, S., Mohan, M., Chellathurai Vasantha, N., Retnaraj, J., & Selvan Christyraj, S. (2017). Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon*, e07686. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07686>
- Cowper, M., Frazier, T., Wu, X., Curley, J. L., Ma, M. H., Mohiuddin, O. A., Dietrich, M., McCarthy, M., Bukowska, J., & Gimble, J. M. (2019). Human Platelet Lysate as a Functional Substitute for Fetal Bovine Serum in the Culture of Human Adipose Derived Stromal/Stem Cells. *Cells*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS8070724>
- de Girolamo, L., Sartori, M. F., Albisetti, W., & Brini, A. T. (2007). Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(2), 154–157. <https://doi.org/10.1002/TERM.12>
- Eydt, C., Geburek, F., Schröck, C., Hambruch, N., Rohn, K., Pfarrer, C., & Staszyc, C. (2016). Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): investigations considering the sampling site and the use of different culture media. *Veterinary Medicine and Science*, 2(3), 200–210. <https://doi.org/10.1002/VMS3.36>
- Foroutan, T., & Foroutan, T. (2016). International Journal of Organ Transplantation Medicine Comparison of Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells and Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells to Osteoblast: Osteogenesis versus Pluripotency. *Int J Organ Transplant Med.*, 7, 91–96. www.ijotm.com
- Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 20(4), 275–281. <https://doi.org/10.14573/ALTEX.2003.4.257>
- Hawkes, P. W. (2015). Fetal bovine serum: Geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/S40643-015-0063-7/TABLES/1>
- Kashyap, V., Rezende, N. C., Scotland, K. B., Shaffer, S. M., Persson, J. L., Gudas, L. J., & Mongan, N. P. (2009). Regulation of Stem Cell Pluripotency and Differentiation Involves a Mutual Regulatory Circuit of the Nanog, OCT4, and SOX2 Pluripotency Transcription Factors With Polycomb Repressive Complexes and Stem Cell microRNAs. *Stem Cells and Development*, 18(7), 1093. <https://doi.org/10.1089/SCD.2009.0113>
- Kyllönen, L., Haimi, S., Mannerström, B., Huhtala, H., Rajala, K. M., Skottman, H., Sándor, G. K., & Miettinen, S. (2013). Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/SCRT165/FIGURES/7>
- Lee, M. S., Youn, C., Kim, J. H., Park, B. J., Ahn, J., Hong, S., Kim, Y. D., Shin, Y. K., & Park, S. G. (2017). Enhanced Cell Growth of Adipocyte-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Chemically-Defined Serum-Free Media. *International Journal of Molecular Sciences 2017, Vol. 18, Page 1779*, 18(8), 1779. <https://doi.org/10.3390/IJMS18081779>
- Lefterova, M. I., Haakonsson, A. K., Lazar, M. A., & Mandrup, S. (2014). PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(6), 293–302. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2014.04.001/ASSET/1EA18CED-407F-4A5A-82B9-402CBB145082/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Li, K., Jiang, Y., Yang, Z., Heng, B. C., Tian, H., & Ge, Z. (2021). Can Upregulation of Pluripotency Genes Enhance Stemness of Mesenchymal Stem Cells? *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(4), 1505–1507. <https://doi.org/10.1007/S12015-021-10154-6/METRICS>

- Liu, L., Ling, J., Wei, X., Wu, L., & Xiao, Y. (2009). Stem Cell Regulatory Gene Expression in Human Adult Dental Pulp and Periodontal Ligament Cells Undergoing Odontogenic/Osteogenic Differentiation. *Journal of Endodontics*, 35(10), 1368–1376. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2009.07.005>
- Matsuoka, F., Takeuchi, I., Agata, H., Kagami, H., & Shiono, H. (2013). Morphology-Based Prediction of Osteogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(2), 55082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055082>
- 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), 738. <https://doi.org/10.3390/JPM11080738/S1>
- Panella, S., Muoio, F., Jossen, V., Harder, Y., Eibl-Schindler, R., & Tallone, T. (2021). Chemically Defined Xeno- and Serum-Free Cell Culture Medium to Grow Human Adipose Stem Cells. *Cells* 2021, Vol. 10, Page 466, 10(2), 466. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020466>
- Paradkar, P. H., Db Vaidya, A., Talwalkar, S. C., Mishra, L. S., Agashe, S. V., & Vaidya, R. A. (2019). Bovine whey protein and other biological fluids as alternative to fetal bovine serum in supplementing cell culture media. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57, 123–130.
- Piletz, J. E., Drivon, J., Eisenga, J., Buck, W., Yen, S., McLin, M., Meruvia, W., Amaral, C., & Brue, K. (2018). Human Cells Grown With or Without Substitutes for Fetal Bovine Serum. <https://doi.org/10.1177/2155179018755140>, 10, 215517901875514. <https://doi.org/10.1177/2155179018755140>
- Pilgrim, C. R., McCahill, K. A., Rops, J. G., Dufour, J. M., Russell, K. A., & Koch, T. G. (2022). A Review of Fetal Bovine Serum in the Culture of Mesenchymal Stromal Cells and Potential Alternatives for Veterinary Medicine. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 859025. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.859025>
- Popov, A., Scotchford, C., Grant, D., & Sottile, V. (2019). Impact of Serum Source on Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation in Culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/IJMS20205051>
- Qiao, Y., Wang, R., Yang, X., Tang, K., & Jing, N. (2014). Dual Roles of Histone H3 Lysine 9 Acetylation in Human Embryonic Stem Cell Pluripotency and Neural Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(4), 2508. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.603761>
- Simões, I. N., Boura, J. S., Dos Santos, F., Andrade, P. Z., Cardoso, C. M. P., Gimble, J. M., Da Silva, C. L., & Cabral, J. M. S. (2013). Human mesenchymal stem cells from the umbilical cord matrix: Successful isolation and ex vivo expansion using serum-/xeno-free culture media. *Biotechnology Journal*, 8(4), 448–458. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201200340>,
- Thamm, K., Möbus, K., Towers, R., Baertschi, S., Wetzels, R., Wobus, M., & Segeletz, S. (2022). A chemically defined biomimetic surface for enhanced isolation efficiency of high-quality human mesenchymal stromal cells under xenogeneic/serum-free conditions. *Cytotherapy*, 24(10), 1049–1059. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2022.06.003>
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053–1063. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2010.03.016>
- Verma, A., Verma, M., & Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*, 269–293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>

- Witzeneder, K., Lindenmair, A., Gabriel, C., Höller, K., Theiß, D., Redl, H., & Hennerbichler, S. (2013). Human-Derived Alternatives to Fetal Bovine Serum in Cell Culture. *Transfus Med Hemother*, 40, 417–423. <https://doi.org/10.1159/000356236>
- Yuan, J., Liu, X., Chen, Y., Zhao, Y., Liu, P., Zhao, L., & Han, W. (2017). Effect of SOX2 on osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 63(1), 41–44. <https://doi.org/10.14715/CMB/2017.63.1.8>