

Regeneración de tejido periodontal in vitro con células madre pluripotenciales de la pulpa dental (DPPSC) del tercer molar.

Iulia Emilia Hategan

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Regeneración de tejido periodontal
in vitro **con células madre**
pluripotenciales de la pulpa dental
(DPPSC) del tercer molar

Regenerative Medicine Research Institute

UIC Barcelona

Tesis doctoral

Iulia Emilia Hategan

Director: Dr. Maher Atari Abouasi

Co-director: Dra. Sheyla Montori Pina

2015

Agradecimientos

Quisiera dedicar la finalización de esta tesis doctoral a todas las personas que me apoyaron, aconsejaron y animaron en todo este largo camino, que se me ha hecho más duro al final con la redacción que con la parte experimental.

En primer lugar agradecer a mi director de tesis, Dr. Maher Atari por ofrecerme la chance de estar en su laboratorio y descubrir el mundo de las células madre hace 3 años. Le agradezco profundamente por todo su apoyo intelectual, su tiempo invertido en lo personal, siempre apoyándome en momentos difíciles y enseñándome que las cosas son más sencillas de lo que parecen.

Los inicios en el laboratorio fueron más fáciles por mis compañeros que en todos los momentos estuvieron pendientes de mí, me enseñaron todo lo que se hace hoy en día: cultivar células madre, congelarlas, contarlas, hacer PCRs, inmunos, aislar RNA ... wow cuantas cosas...

Gracias de alma en especial a Carlos Gil, ahora doctor, por su paciencia y todos sus conocimientos que compartió conmigo, a Ester por su apoyo y alegría que me dio en todo este tiempo tanto en el lab como en algún viaje, cenas ... A Raquel, que con una sonrisa siempre me contestó y explicó cualquier duda que podría tener ... A Begoña que siempre se ofrece ayudar a todo el mundo incluso a mí, maldito encabezado al final lo conseguimos!!!!

A mi gran amiga y compañera Neus, por todos los momentos que pasamos los sábados y algún domingo en la uni, por su apoyo y cariño que me dio.

Y no en último lugar a mi co-directora de tesis y amiga, Sheyla Montori que estuvo presente incondicional y me ayudó muchísimo en redactar esta tesis, por todos sus consejos, sus conocimientos y los ánimos.

Agradecer a mi familia por guiarme los pasos desde pequeña, por creer en mí y por darme la educación que tengo hoy en día. Soy quien soy por vosotros!!!

A mi noble padre que me enseñó luchar en la vida para conseguir lo que quería y a mi madre que siempre estuvo a mi lado y me enseñó ser buena persona y humilde. A mi hermano que siempre me apoyó y me animó en mis momentos difíciles.

Y a mí Dennis, por todo su apoyo incondicional intelectual y emocional. Gracias por creer en mí!!! Gracias por tu paciencia, comprensión, cariño y el sentido de humor que me regalaste en estos momentos! Seguimos caminando juntos!!!

A todos mis amigos que en algún momento sufrieron los efectos de escribir una tesis, por su apoyo y escucha en los momentos de estrés.

Índice

1. Abreviaturas	13
2. Justificación.....	17
3. Introducción	21
3.1. <i>El tejido periodontal</i>	23
3.1.1. Desarrollo embrionario del tejido periodontal	23
3.1.2. Anatomía del periodonto	25
3.1.2.1. Encía	26
3.1.2.2. Ligamento periodontal	27
3.1.2.2.1. Composición del ligamento periodontal	27
3.1.2.2.2. Funciones del ligamento periodontal	30
3.1.2.2.3. Vascularización e inervación del ligamento periodontal	31
3.1.2.3. Cemento	31
3.1.2.4. Hueso alveolar	32
3.2. <i>La enfermedad periodontal</i>	33
3.2.1. Epidemiología	34
3.2.2. Etiología	35
3.2.3. Tratamiento.....	36
3.2.3.1. Injertos óseos.....	37
3.2.3.2. Regeneración tisular guiada	37
3.2.3.3. Factores de crecimiento.....	38
3.3. <i>Células madre</i>	39
3.3.1. Células madre embrionarias	39
3.3.2. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)	41
3.3.3. Células madre adultas	42
3.3.3.1. Células madre de la médula ósea	42
3.3.3.2. Células madre de origen dental.....	43
3.3.3.1.1. Células madre de la pulpa dental (DPSC: Dental Pulp Stem Cells)	44
3.3.3.1.2. Células madre del ligamento periodontal (PDLSC: Periodontal Ligament Stem Cells)	45
3.3.3.1.3. Células madre de dientes temporales exfoliados (SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth).	45

3.3.3.1.4. Células madre de la papila dental (SCAP: Stem Cells from the Apical Papilla).....	46
3.3.3.1.5. Células madre del folículo dental (DFPC: Dental Follicle Precursor Cells).	46
3.3.3.1.6. DPPSC (Dental Pulp Pluripotent-like Stem Cells)	47
3.4. <i>Terapia celular en la regeneración periodontal</i>	48
4. Objetivos	55
5. Hipótesis de trabajo	59
6. Metodología	63
6.1. <i>Diseño experimental</i>	65
6.2. <i>Recogida de terceros molares y obtención del cultivo primario</i>	66
6.2.1. Selección de pacientes.....	66
6.2.2. Obtención del cultivo primario de las DPPSC a partir de terceros molares.....	66
6.3. <i>Caracterización de las DPPSC</i>	67
6.3.1. Microscopía óptica - Morfología DPPSC	68
6.3.2. Microscopia electrónica de transmisión - Morfología DPPSC	68
6.3.3. Citometría de Flujo (FACS)- Fenotipo DPPSC indiferenciadas.....	68
6.3.4. Análisis de inmunofluorescencia - Fenotipo DPPSC indiferenciadas .	69
6.3.5. Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) - Genotipo DPPSC indiferenciadas	70
6.3.6. Hibridación genética comparativa corta (Short-CGH) - Estabilidad genética DPPSC indiferenciadas	71
6.4. <i>Diferenciación de las DPPSC a tejido periodontal</i>	72
6.4.1. Preparación de las muestras de dientes.....	72
6.4.2. Diferenciación periodontal	72
6.4.3. Procesado de las muestras para microscopia electrónica de barrido (SEM).....	75
6.4.4. Procesado de las muestras para el examen histológico.	75
6.4.5. Procesado de las muestras para el estudio de los genes específicos.	76
7. Resultados	79
7.2. <i>Caracterización de las DPPSC</i>	81
7.2.1. Morfología mediante microscopio óptico.	81

7.2.2. Morfología mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM)	82
7.2.3. Citometría de flujo.	82
7.2.4. Inmunofluorescencia.	83
7.2.5. RT-PCR.	84
7.2.6. Hibridación genética comparativa corta (Short-CGH).	85
7.3. <i>Diferenciación de las DPPSC a tejido periodontal</i>	85
7.3.1. Morfología celular a lo largo de la diferenciación.	85
7.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).	86
7.3.3. Análisis histológico.	88
7.3.4. Análisis de los resultados mediante RT-PCR.	89
8. Discusión	91
9. Conclusiones	99
10. Perspectivas de futuro	103
11. Bibliografía	107
12. Anexos	119
12.1. <i>Anexo 1: Resumen</i>	121
12.2. <i>Anexo 2: Carta de aprobación del proyecto de tesis</i>	129
12.3. <i>Anexo 3: Carta de aprobación del estudio para el CER</i>	130
12.4. <i>Anexo 4: Carta de aprobación para nombrar a co-director del estudio</i>	131

1. Abreviaturas

ALP = Alkaline Phosphatase (Fosfatasa Alcalina)

BGN = Biglycan (Biglicano)

CD13 = Cluster of differentiation 13 (Cluster de diferenciación 13)

COL I = Collagen type I (Colágeno tipo 1)

COL III = Collagen type III (Colágeno tipo 3)

DFSC = Dental Follicle Precursor Cells (Células madre del folículo dental)

DPMSC = Dental Pulp Mesenchymal stem cells (Células Madre Mesénquimales de la Pulpa Dental)

DPSC = Dental Pulp Stem Cells (Células Madre de la Pulpa Dental)

DPPSC = Dental Pulp Pluripotent-like Stem Cells (Células Madre Pluripotentes de la Pulpa Dental)

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido Etilendiaminotetraacético)

ESC = Embryonic Stem Cells (Células Madre Embrionarias)

FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting (Clasificación de células activadas por fluorescencia)

FBS = Fetal Bovine Serum (Suero bovino fetal)

FIG = Figura

GF = Growth Factor (Factor de Crecimiento)

GAPDH = Glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa)

HK = Housekeeping (Marcador de referencia)

iPSC = Induced pluripotent stem cells (Células madre pluripotentes inducidas)

MSC = Mesenchymal Stem Cells (Células madre mesenquimales)

NaOCl = Sodium_hypochlorite (Hipoclorito de Sodio)

OC = Osteocalcin (Osteocalcina)

OCT 4 = Octamer-binding transcription factor 4 (Factor de transcripción de unión a octámero 4)

PBS = Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)

PDLSC = Periodontal Ligament Stem Cells (Células madre del ligamento periodontal)

PLAP-1 = Periodontal ligament-associated protein-1 (Ligamento periodontal asociado a la proteína-1)

POSTN = Periostin (Periostina)

RUNX2 = Runt-related transcription factor 2 (Factor de transcripción 2 relacionado con Runt)

RT-PCR = Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

S100A4 = Calcium-Binding Protein A4 (Proteína de unión a calcio A4)

SCAP = Stem Cells from the Apical Papilla (Células madre de la papila dental)

SEM = Scanning Electron Microscopy (Microscopio electrónico de barrido)

SHED = Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (Células madre de dientes primarios exfoliados)

Short-CGH = Short-chromosome genetic hybridisation (Hibridación genómica comparativa corta)

SOX2 = Sex determining region Y-box 2

TGF- β = Transforming Growth Factors- beta (Factor de crecimiento transformante beta)

2. Justificación

La enfermedad periodontal es la mayor causa de pérdida de las piezas dentarias y se caracteriza por la destrucción del periodonto, el cual está compuesto por el hueso alveolar, el cemento radicular y el ligamento periodontal. La regeneración del periodonto implica la reconstrucción de más de un tejido, lo que dificulta la obtención de resultados terapéuticos óptimos.

Actualmente, los objetivos terapéuticos para el tratamiento de la patología periodontal son la prevención de la pérdida de inserción de los tejidos de soporte y la regeneración de dichos tejidos. Sin embargo, los tratamientos convencionales no han conseguido los resultados deseados de una regeneración completa, al no restaurar en totalidad la arquitectura y la función de los tejidos perdidos o dañados. Por esta razón se plantea la terapia celular como una posibilidad futura para regenerar el periodonto, la cual requiere la implicación de:

- Células madre.
- Factores de crecimiento y moléculas de señalización, que actúan como señal para las células madre.
- Matriz extracelular tridimensional, que puede actuar imitando la estructura del órgano dañado o como vehículo para transportar las células a la zona de interés.

Hoy en día se pueden aislar células madre adultas prácticamente de todo el cuerpo humano: médula ósea, sangre periférica, músculo esquelético, hígado, páncreas, epitelio de la piel y del intestino, pulpa dental, córnea, retina del ojo, sistema nervioso central y corazón. Sin embargo, la obtención de estas células madre resulta laboriosa, en algunos casos y, en otros, las células obtenidas tienen una capacidad de diferenciación limitada.

Nuestro grupo de investigación del Regenerative Medicine Research Institute de la UIC Barcelona ha conseguido aislar una nueva población de células madre adultas a partir de la pulpa dental de los terceros molares, siendo estos molares la fuente dental más común para el aislamiento de células madre. El tercer molar, también conocido como muela del juicio, es el último diente en desarrollarse y contiene una cantidad óptima de tejido pulpar para la extracción de células madre. Estas características de los terceros molares, junto con la utilización de un protocolo de cultivo específico, permitieron el aislamiento

de una nueva población de células madre de la pulpa dental, las DPPSC (dental pulp pluripotent-like stem cells). Estas células, a diferencia de otras células madre adultas, tienen una capacidad regenerativa similar a la de las células madre embrionarias y a las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), al expresar marcadores de pluripotencia (Oct4, Nanog, Sox2 y Lin28) y tener la capacidad de diferenciarse a tejidos de las tres capas embrionarias, lo cual las convierte en una fuente muy prometedora de células madre para los estudios de medicina regenerativa.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido investigar el potencial regenerativo de las DPPSC para formar tejido periodontal nuevo *in vitro* usando dientes sanos y estériles como soporte. Nuestro estudio pretende reproducir la topografía de la superficie de la raíz natural del diente para favorecer la elongación celular perpendicular, condición óptima para la regeneración de las fibras periodontales.

Hasta la fecha, ningún investigador ha conseguido diferenciar tejido periodontal a partir de las DPPSC. Dado que estas células pueden tener una capacidad regenerativa mayor que la de otras células madre adultas, sería novedoso e importante estudiar su capacidad de diferenciación y de regeneración a tejido periodontal *in vitro* para, posteriormente, valorar su posible aplicación clínica.

3. Introducción

3.1. El tejido periodontal

El periodonto es la parte de los tejidos bucales que rodea y soporta los dientes en el proceso alveolar maxilar y mandibular [1]. Como el objeto de esta tesis es evaluar la regeneración del tejido periodontal, en primer lugar, se profundizará en los procesos del desarrollo embrionario del periodonto, para comprender mejor los procesos celulares y moleculares que deberían producirse durante la regeneración periodontal.

3.1.1. Desarrollo embrionario del tejido periodontal

El origen embriológico del germen dentario deriva del ectodermo del primer arco braquial y del ectomesénquima de la cresta neural. Después de iniciar las interacciones epitelio-ectomesenquimáticas se producen los estadios de brote, de casquete y de campana, que tienen como resultado la formación del diente y los tejidos periodontales. Una vez iniciado el desarrollo de la raíz se empieza a formar también el ligamento, cuya formación definitiva termina cuando el diente entra en oclusión con su antagonista [2].

El ligamento periodontal proviene del tejido mesenquimal del saco dentario [2]. El desarrollo de los tejidos periodontales comienza en la fase embrionaria, cuando células de la cresta neural migran al interior del primer arco branquial. En este momento se crea una banda ectomesenquimal, que tendrá un papel importante en el desarrollo del diente. En el estadio de casquete se forma una afluencia de células ectomesenquimáticas que derivarán al órgano dental (DO), la papila dental (DP) y el folículo dental (DF) del cual se originarán los tejidos periodontales [1]. El órgano dental dará origen al esmalte, la papila dental generará la dentina y los tejidos pulpares, mientras que el folículo dental será el órgano formador del aparato de inserción (cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar) (Fig.1) [3, 4].

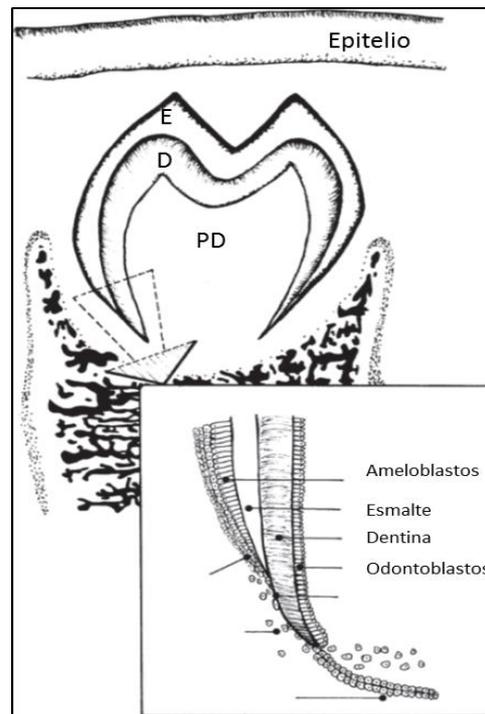


Figura 1. Formación del diente y de los componentes del ligamento periodontal. E: esmalte; D: dentina; PD: pulpa dental. Imagen modificada del artículo de Lin *et al.*[4].

El desarrollo de la raíz y los tejidos periodontales es posterior al desarrollo de la corona. La confluencia entre las células del epitelio interno y externo del órgano del esmalte forma una doble capa, que se denomina vaina epitelial de Hertwig y que determina la aparición de la raíz del diente (Fig.2). La vaina epitelial de Hertwig se rompe para formar los restos epiteliales de Malassez, dando lugar al espacio donde se generará el ligamento periodontal [5].

Durante la formación de la raíz, las células de la papila dental se diferencian en odontoblastos para formar dentina radicular, y la vaina epitelial Hertwig secreta en la superficie de la dentina una matriz homogénea mineralizada de proteínas llamada capa hialina de Hopewell-Smith [2]. Las células ectomesenquimáticas del folículo dental migran a esta capa hialina y se diferencian en cementoblastos. El desarrollo apical de la raíz seguirá con la deposición de cemento. Los fibroblastos del folículo dentario también se adhieren a la capa de hialina y dan origen a las fibras de Sharpey. Estas fibras de colágeno se entrelazan en el cemento. A continuación, los osteoblastos del folículo dentario depositan hueso alveolar en todo el espacio del alveolo del diente.

Finalmente, la inserción de las fibras de Sharpey en la zona del hueso alveolar completa el desarrollo del periodonto [3].

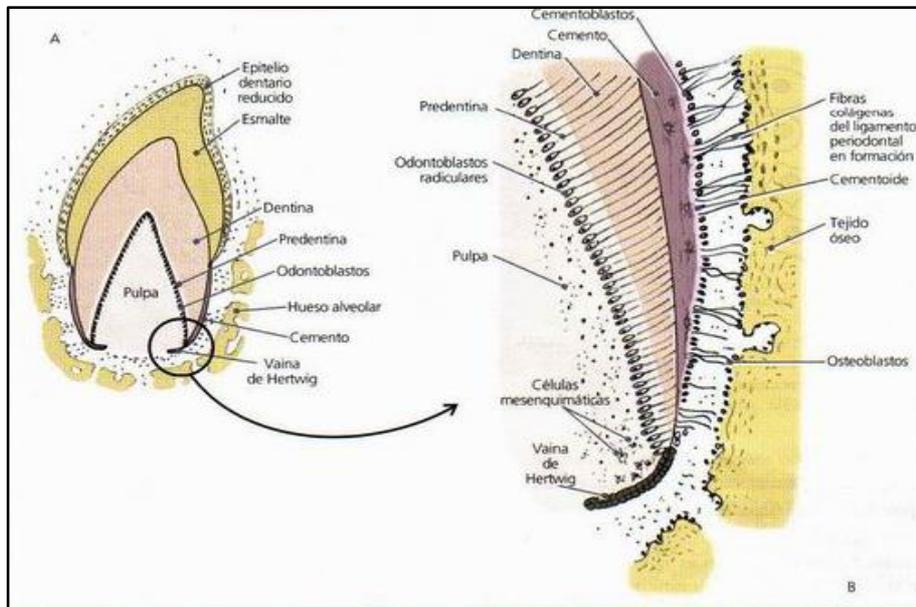


Figura 2. **A:** Formación radicular, estado de folículo dentario. **B:** La vaina de Hertwig y la cementogénesis. Imagen obtenida de [6].

3.1.2. Anatomía del periodonto

El periodonto está formado por varios tejidos: la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar (Fig.3). El periodonto tiene dos funciones fundamentales: protección e inserción. La función de protección la realizan la encía y el epitelio de unión, mientras que la función de inserción se desempeña a través del ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar.

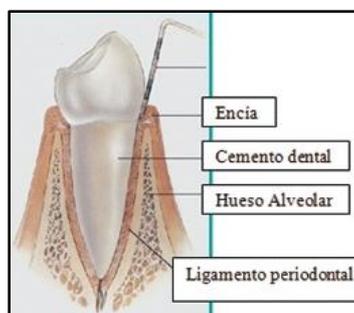


Figura 3. Los componentes del tejido periodontal: encía, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento. Imagen obtenida de [7].

3.1.2.1. Encía

La encía es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. Está compuesta de una capa epitelial y de un tejido conectivo subyacente denominado lámina propia. La encía adquiere su forma y textura definitivas con la erupción de los dientes [2].

En el sentido coronario, se presenta la encía libre (EL) de color rosa y consistencia firme (Fig.4). Se termina con el margen gingival libre, que presenta el contorno festoneado. En el sentido apical, la encía está adherida (EA) firmemente al hueso alveolar subyacente y al cemento por fibras del tejido conectivo. La EA se continúa con la mucosa alveolar laxa, de color rojo oscuro, de la cual está separada por una línea conocida como la unión mucogingival o la línea mucogingival (Fig.5).



Figura 4. Encía libre y encía adherida. Las flechas de arriba indican la encía adherida (EA) y las flechas de abajo indican la encía libre (EL). Imagen modificada [1].

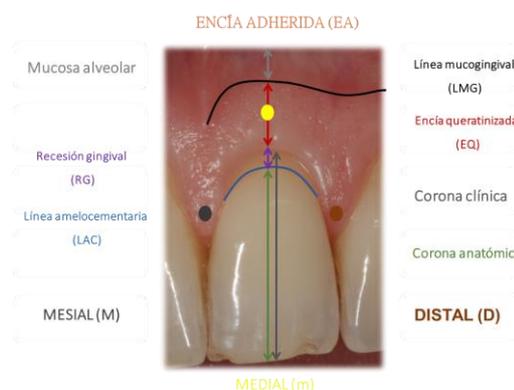


Figura 5. Ilustración de las delimitaciones entre la encía adherida (EA), la encía queratinizada (EQ), la corona clínica del diente y la corona anatómica.

El epitelio bucal es plano, estratificado, queratinizado y contiene, además de las células productoras de queratina (queratinocitos), que representan alrededor de 90% de la población celular total, los siguientes tipos celulares: melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y células inflamatorias, incluyendo linfocitos. Por otro lado, el tejido conectivo o lámina propia es el componente tisular predominante en la encía y contiene fibroblastos (5%), vasos y nervios (35%), y una matriz extracelular de fibras colágenas (60%) y no-colágenas [1, 2].

3.1.2.2. Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es un tejido celular altamente vascularizado que rodea la raíz del diente. Se compone por haces de fibras de tejido conectivo fibroso que unen el cemento radicular y la pared del alveolo, teniendo un espesor que varía entre los 0,10 mm y 0,38 mm (Fig.6). Presenta una mayor anchura en el extremo cervical, apical y en dientes funcionales, siendo más estrecho en la parte central y en dientes no funcionales [8].

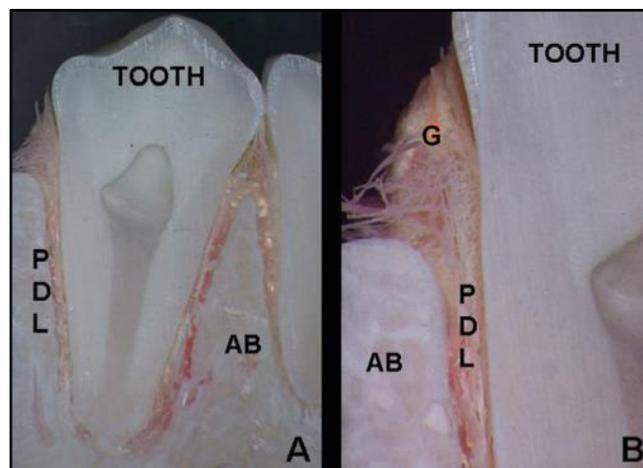


Figura 6. Ilustración del ligamento periodontal alrededor de un diente. PDL: ligamento periodontal; AB: hueso alveolar; G: encía. Imagen modificada del artículo de Marchesan *et al.* [9].

3.1.2.2.1. Composición del ligamento periodontal

Como cualquier tejido conectivo, el ligamento periodontal contiene células y componentes extracelulares de fibras colágenas y no- colágenas [2].

Las fibras son los elementos más importantes del ligamento periodontal y están formadas por fibrillas colágenas dispuestas en haces. Las terminaciones de estas fibras se insertan por un lado en el cemento y, por el otro, en el hueso alveolar, formando así las fibras de Sharpey [10]. En la composición de estas fibras encontramos colágeno tipo I, III y V, además de elastina, reticulina y oxitalina. Estas fibras permiten un cierto grado de movimiento al diente, a la vez que se oponen a fuerzas de mayor intensidad [2]. Dependiendo de la inserción y su recorrido, las fibras del ligamento periodontal se dividen en los siguientes grupos:

- a) *Grupo crestalveolar*: se extienden desde la cresta alveolar hasta debajo de la unión cementoamantina y tienen como función principal la de evitar los movimientos de extrusión.
- b) *Grupo horizontal*: se distribuyen en ángulo recto, desde el cemento al hueso por debajo del grupo anterior y su función se basa en resistir las fuerzas laterales y horizontales del diente.
- c) *Grupo oblicuo*: se orientan de modo oblicuo con inserciones en el cemento y se extienden más oclusalmente en el alveolo. La función es la de resistir a fuerzas masticatorias, transformando las fuerzas y las tensiones que van hacia el hueso.
- d) *Grupo apical*: se localizan desde el ápice del diente hasta el hueso. No se encuentran en raíces incompletas [11].

Por otro lado, las células del ligamento periodontal, funcionalmente, (Fig. 7) se dividen en:

A) Células formadoras:

- *Fibroblastos*: son las células más predominantes, representando el 20% del total de las células que componen el ligamento periodontal [8]. Los fibroblastos son células multipotentes, siendo responsables de la formación del nuevo ligamento periodontal y de la regeneración de los tejidos periodontales [12]. Producen el tejido conectivo, incluyendo el colágeno, los proteoglicanos y la elastina, siendo el único tipo celular que realiza la síntesis y la degradación del colágeno [13].
- *Osteoblastos*: son las células encargadas de sintetizar la matriz ósea y cubren la superficie periodontal del hueso alveolar. Funcionalmente existen dos tipos de

osteoblastos: los activos, que sintetizan laminillas óseas; y los inactivos o de reserva, que serían activados por las fuerzas tensionales ortodónticas [14].

- *Cementoblastos*: son las células que producen el cemento del diente, y se encuentran principalmente en los dos tercios apicales de la raíz, en especial en la zona cementógena. En el estudio de Cho y Garant observaron que los cementoblastos que se desprendieron de la superficie de cemento, contribuyeron a formar a las primeras poblaciones de fibroblastos del ligamento periodontal [15].

B) Células de reabsorción:

- *Osteoclastos*: son los responsables de la destrucción del tejido óseo. Su presencia en el tejido normal se debe a que permanentemente hay procesos de resorción y aposición [13].
- *Cementoclastos*: células encargadas de reabsorber el cemento. Sólo aparecen en ciertos procesos patológicos o durante la rizoclasia fisiológica de los dientes temporales [13, 16].

C) Células defensivas:

- *Macrófagos*: son células con un alto contenido de lisosomas, que por su capacidad de ingerir, destruir y digerir, desempeñan una función de desintoxicación y defensa. Representan el 4% del ligamento periodontal, su distribución en el ligamento es heterogénea [1].
- *Mastocitos*: células que se encuentran cerca de los vasos sanguíneos, contienen y producen sustancias vasoactivas como gránulos densos de heparina, histamina y enzimas proteolíticas [1, 5].
- *Eosinófilos*: células de defensa que proliferan en etapas crónicas de la inflamación [5].

D) Células epiteliales de Malassez:

Se localizan frecuentemente en el ligamento que está en contacto con la superficie cementaria. Estas células son restos desorganizados de las vainas epiteliales de Hertwig. Su frecuencia y distribución cambian con la edad, siendo más habitual en niños. Hasta la segunda década de la vida se encuentran en la región apical, localizándose

posteriormente más próximas a nivel gingival. Son células no funcionales que generalmente desaparecen, aunque si persisten significaría que no son totalmente inactivas. En este caso, al ser activas pueden proliferar y producir quistes, tumores o acúmulos calcificados [8].

E) Células madre ectomesenquimáticas:

Se encuentran en gran cantidad en el tejido conectivo periodontal. Son células multipotentes [17] que se sitúan alrededor de los vasos sanguíneos. Tras dividirse parte de estas células permanece en la zona periodontal vascular y el resto se diferencian a fibroblastos, cementoblastos u osteoblastos [17].

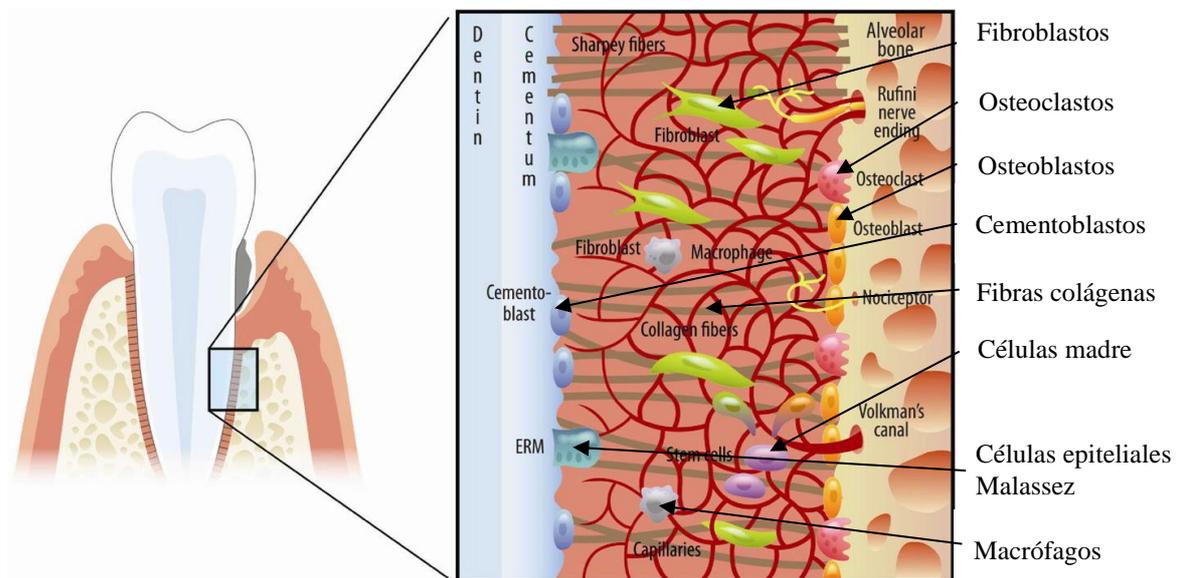


Figura 7. Esquema con los componentes del complejo periodontal. Los diferentes componentes se representan con diferentes colores: los osteoblastos y osteoclastos en naranja, y en rosa cuando están en proximidad del hueso; fibroblastos en verde, siguiendo la orientación de las fibras de colágeno; las células madre en lila; cementoblastos en azul; las células epiteliales de Malassez (ERM) en aguamarina en las proximidades del cemento y los macrófagos en gris. Imagen modificada del artículo de Marchesan *et al.* [9].

3.1.2.2.2. Funciones del ligamento periodontal

Las funciones del ligamento periodontal son de carácter físico, formativo y de remodelación. Por un lado, proporciona resistencia mecánica para la absorción de fuerzas masticatorias sobre el diente a través de las densas masas de haces de fibras de colágeno [8]. Además, el ligamento periodontal tiene gran capacidad de adaptación para

incrementar o disminuir las cargas mecánicas mediante el control de su anchura total hasta un 50%, sin perder su arquitectura original. Finalmente, provee una función propioceptiva para el control neuromuscular durante la masticación [2].

3.1.2.2.3. Vascularización e inervación del ligamento periodontal

La irrigación del periodonto proviene de las arterias dentarias superior e inferior, que son arterias perforantes porque sus ramificaciones siguen un camino intraóseo, atravesando el hueso del alvéolo y éstas, a su vez, establecen numerosas anastomosis arteriovenosas. Los vasos sanguíneos forman una red poliédrica que rodea la raíz y este plexo sanguíneo se sitúa más cerca del hueso que del cemento [1].

La inervación se da en las terminaciones nerviosas mielínicas y amielínicas y en las terminaciones nerviosas complejas (proceden de nervios maxilar superior y dentario inferior), que presentan mecano-receptores capaces de captar diferencias de tacto, presión y dolor [5].

3.1.2.3. Cemento

El cemento es un tejido mineralizado y avascular que cubre toda la superficie radicular del diente (Fig.8). Está compuesto de una parte inorgánica de hidroxapatita (45-50%) y una parte orgánica representada de fibras colágenas y no-colágenas, que constituyen el otro 50% [1].

El cemento puede ser clasificado en celular y acelular, pero existen por lo menos 5 tipos identificados y descritos, dependiendo también de la presencia intrínseca o extrínseca de fibras de colágeno. El cemento acelular, con fibras extrínsecas, se encuentra en el tercio coronal y medio de la raíz y contiene haces de fibras de Sharpey; su función es la de anclar los haces de fibras del ligamento periodontal al diente. Recubriendo la parte apical de la raíz se encuentra el cemento celular, que contiene cementocitos y cuyo papel adaptativo permite el movimiento del diente dentro del maxilar durante el tratamiento ortodóntico [1, 2, 18].

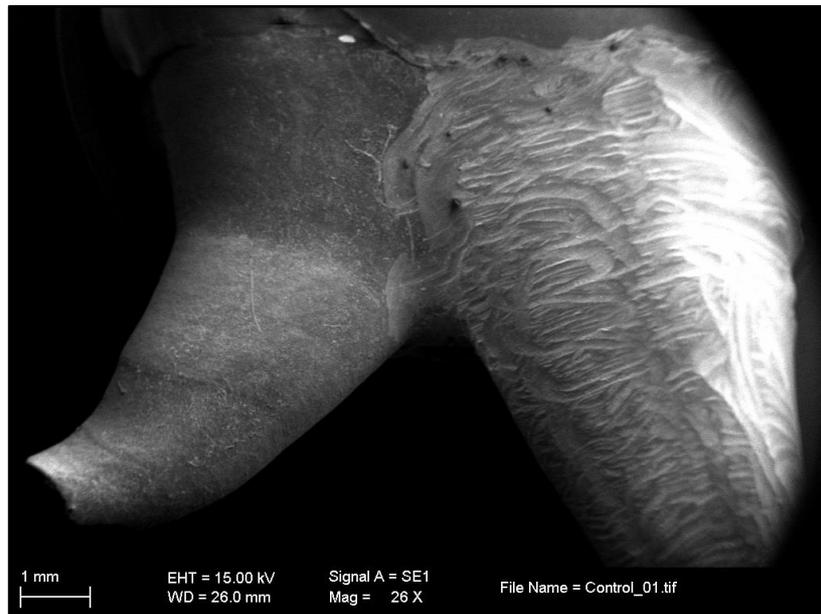


Figura 8. Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las raíces del molar superior. Una de las raíces (izquierda) está cubierta del cemento dental y, en la otra (derecha), el cemento se eliminó con una fresa.

3.1.2.4. Hueso alveolar

El hueso alveolar constituye el proceso alveolar que está adherido al hueso basal de la mandíbula y es parte de los tejidos periodontales [16]. El hueso que recubre las superficies radiculares es mucho más grueso en la cara palatina que en la cara vestibular del maxilar. Las paredes de los alvéolos están revestidas por hueso cortical, mientras que el área entre los alvéolos y las paredes de hueso compacto del maxilar está ocupada por hueso esponjoso [1]. Revistiendo al alvéolo dental está el hueso compacto, que se encuentra perforado por numerosos conductos por donde pasan vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas, que van desde el hueso alveolar hasta el ligamento periodontal. Esta capa de hueso, en la cual se insertan los haces de fibras de Sharpey, es el hueso alveolar propiamente dicho o "hueso fasciculado" [5]. El hueso alveolar se somete a la remodelación durante la función normal y durante el aumento de la carga mecánica [2].

3.2. La enfermedad periodontal

Las enfermedades periodontales son un conjunto de entidades patológicas de causa infecciosa y naturaleza inflamatoria que afectan a los tejidos que rodean los dientes. Su etiología es multifactorial y, por lo tanto, numerosos factores pueden influir tanto en la iniciación como en el progreso de esta enfermedad [19]. Entre estos factores, además del factor microbiano, se encuentran factores genéticos, factores inmunológicos, factores ambientales, etc.

La enfermedad periodontal es un importante problema de salud pública y el desarrollo de terapias efectivas para tratar esta enfermedad debería ser un objetivo principal de la comunidad científica [20].

Dependiendo del grado de afectación y de la susceptibilidad del individuo se distinguen dos tipos de enfermedad periodontal: la gingivitis y la periodontitis (Fig.9).

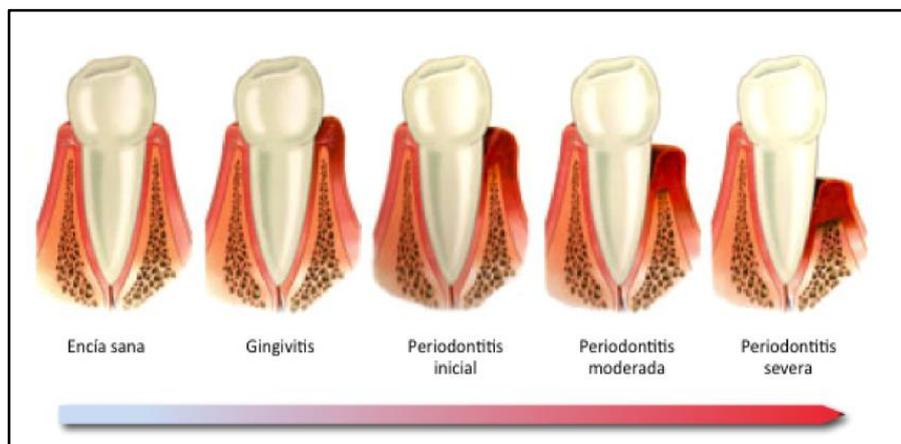


Figura 9. Clasificación del proceso degenerativo de las encías. Imagen obtenida de [21].

La gingivitis se define como la inflamación de los tejidos gingivales sin que exista pérdida ósea y se trata de la enfermedad periodontal más habitual. Sin embargo, si no se trata a tiempo, la gingivitis puede derivar a periodontitis, una enfermedad menos habitual pero con peores consecuencias, ya que afecta al 90% de la población por encima de los 35 años y es la primera causa de pérdida de dientes en todo el mundo. La periodontitis se caracteriza por la destrucción del tejido periodontal, incluyendo el ligamento periodontal, el cemento, el hueso alveolar y la encía (Fig.10) [22, 23].

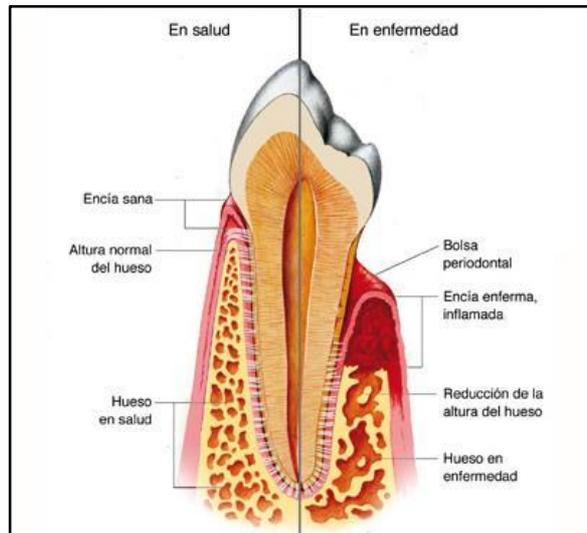


Figura 10. Periodontitis y los procesos que se producen en este estado de enfermedad: inflamación gingival, pérdida y destrucción del ligamento periodontal, reducción de la altura del hueso y la aparición de las bolsas periodontales. Imagen recuperada de [24].

3.2.1. Epidemiología

Los últimos estudios epidemiológicos han mostrado un incremento de la prevalencia de periodontitis en poblaciones adultas con acceso a cuidados bucodentales. Eke *et al.* [25] encontraron una prevalencia de esta enfermedad del 47% en una muestra de 3.742 adultos en Estados Unidos.

En España, los datos epidemiológicos obtenidos de la encuesta más completa del año 2005, indicaban que en el rango de edad comprendido entre 35 y 44 años solo el 14,8% de los individuos presentaban buen estado de salud periodontal, el 59,8% tenían gingivitis y el 25,4%, padecían periodontitis. Estos datos empeoraban en el grupo de edad comprendida entre 65 y 74 años, donde un 10,3% presentaban salud periodontal, el 51,6% padecían gingivitis y el 38% sufrían periodontitis [26].

La importancia de la periodontitis no está en su prevalencia sino en la morbilidad asociada que conlleva la pérdida de dientes, consecuencia final de la enfermedad periodontal destructiva. Los dientes perdidos como secuela de la enfermedad, no son registrados en los estudios epidemiológicos y, por lo tanto, se subestima la prevalencia y la severidad de esta enfermedad [1].

En general, se estima que la periodontitis provoca el 30-35% de todas las extracciones dentales, mientras que las caries y sus secuelas son la razón del 50% de éstas. En España, el promedio es de 3 dientes ausentes en los adultos de entre 35 y 44 años, y de 13,8 dientes entre los 65 y los 74 años [26]. Esta pérdida dentaria provoca un importante deterioro estético y funcional [27].

Por otro lado, cada vez cobra más relevancia la repercusión de las enfermedades periodontales sobre ciertas enfermedades sistémicas. Se ha demostrado que la infección periodontal es un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, el parto prematuro, la descompensación de la diabetes o las patologías pulmonares [28].

3.2.2. Etiología

Las enfermedades periodontales son patologías inflamatorias crónicas causadas por las bacterias de los biofilms bacterianos dentales, que afectan a los tejidos periodontales. Específicamente, en la periodontitis, el proceso infeccioso provoca la destrucción de los tejidos de soporte del diente y puede llevar a la movilidad y pérdida dentaria [29]. Aunque la periodontitis se considera una enfermedad infecciosa, es necesario también un huésped susceptible en el que se produzca la reacción inflamatoria crónica que origina la destrucción periodontal. Se comprobó que la gingivitis, que es la inflamación superficial, no siempre evoluciona a periodontitis, lo que hace necesario identificar a los pacientes más susceptibles a ésta [30].

La etiología de la enfermedad periodontal es multifactorial. El agente causal que inicia este proceso es la agresión bacteriana, y se ha comprobado que la presencia de ciertas bacterias representan un factor de riesgo para la destrucción periodontal, en concreto, las especies bacterianas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* [29]. Estas bacterias presentan factores de virulencia que les permiten colonizar el área subgingival y producir factores que dañan al huésped. Se organizan en biofilms, lo cual les confiere propiedades adicionales que aumentan la patogenicidad y su resistencia [31].

Entre otros factores causantes de estas enfermedades existen los factores de riesgo genéticos, entre los cuales se incluyen las alteraciones en los leucocitos

polimorfonucleares, diferentes polimorfismos genéticos y anomalías congénitas o hereditarias asociadas a sobrecrecimiento gingival o a inmunodepresión [32].

Entre los factores de riesgo sociales y de comportamiento se destacan el tabaco, el estrés y la dieta. Por otro lado, entre los factores de riesgo adquiridos se evidencian la diabetes y otras patologías que se asocian con inmunodepresión como el SIDA, o la ingesta de medicamentos que producen el crecimiento gingival, como fenitoína, ciclosporina, grupo del nifedipino, etc. [33].

Finalmente, los factores de riesgo locales, que pueden ser de tipo dentario (malposición y maloclusión dentaria, proximidad radicular, contactos abiertos, fracturas dentarias, reabsorciones radiculares externas) o iatrogénico (reconstrucciones dentarias defectuosas, invasión de estructuras anatómicas, perforaciones radiculares) [34].

3.2.3. Tratamiento

El objetivo principal del tratamiento periodontal es de prevenir la pérdida de inserción y de regenerar los tejidos del soporte periodontal [35].

En los últimos años se han utilizado diferentes técnicas de tratamiento periodontal. El tratamiento ideal debería eliminar la inflamación y los defectos de la anatomía periodontal que favorecen la infección [2]. Las técnicas no-quirúrgicas como la terapia mecánica convencional y los procedimientos quirúrgicos resectivos, intentan curar los tejidos dañados, limpiando la raíz para favorecer la reinsertión de tejidos [36, 37]. En la mayoría de los casos se consigue una curación a través de un epitelio largo de unión, pero no se consigue una reparación del cemento o el hueso [4].

Sin embargo, el tratamiento de regeneración periodontal engloba aquellos métodos destinados a reproducir o reconstituir una parte perdida o dañada de los tejidos de soporte dentario con el objetivo de restaurar la arquitectura y función de estos tejidos [38]. Para ello, en la actualidad, se han desarrollado un gran número de técnicas quirúrgicas y materiales regenerativos, como por ejemplo la regeneración tisular guiada, el uso de injertos óseos, la aplicación de factores de crecimiento y la modulación de factores del huésped, así como la combinación de varias de estas técnicas [35, 39, 40]. A continuación, profundizaremos en algunos de ellos.

3.2.3.1. Injertos óseos

Diferentes tipos de injertos óseos se han estudiado para determinar su habilidad de estimular la formación de hueso nuevo [4]. El empleo de injertos óseos es variado, pudiendo usarse materiales fabricados sintéticamente (injertos aloplásticos o sintéticos), hueso del mismo individuo (injertos autólogos o autógenos) o de otro individuo de la misma especie pero genéticamente diferente (injertos homólogos, alogénicos o aloinjertos) o injertos de otra especie animal (injertos heterólogos o xenoinjertos) [2].

Muchos estudios observaron que el uso de estos injertos puede resultar en un aumento del nivel de inserción clínica, una reducción de la profundidad de sondaje y un relleno del defecto óseo. Los resultados a nivel histológico ponen de manifiesto que, lejos de producirse la regeneración periodontal, lo que se produce con mayor frecuencia es el fenómeno de reparación periodontal. Este fenómeno se caracteriza por la curación de la lesión periodontal con un tejido que restaura la continuidad pero que no reconstruye completamente la arquitectura y la función de las estructuras de soporte [41, 42].

3.2.3.2. Regeneración tisular guiada

Esta técnica se ha convertido recientemente en un procedimiento clínico ampliamente aceptado. El procedimiento se basa en la prevención de la migración de las células epiteliales mediante la interposición de una membrana situada entre el defecto infraóseo y el colgajo, que hace de barrera física. Así se crea un ambiente y un espacio necesarios para permitir la recolonización de la superficie radicular con células del ligamento periodontal procurando el desarrollo de una nueva inserción periodontal [2].

La eficacia de las membranas fue demostrada en diferentes publicaciones [43-45]. Se demostró que las células provenientes del ligamento tienen un alto nivel de actividad de la fosfatasa alcalina y un gran potencial de diferenciación celular, así que estas células juegan un rol importante en la regeneración tisular [44].

Inicialmente se utilizaron las membranas no reabsorbibles [46] pero requerían de una segunda cirugía después de 4-6 semanas para retirarla. Posteriormente, se utilizaron las membranas reabsorbibles [47, 48].

Sin embargo, aunque ciertos estudios han demostrado regeneración periodontal, los resultados muestran gran variabilidad en cuanto al grado de predictibilidad clínica, eficacia y resultados histológicos [49-51].

3.2.3.3. Factores de crecimiento

Hoy en día se están estudiando nuevos recursos para conseguir regeneración periodontal basándose en las propiedades que los factores de crecimiento y las proteínas morfogenéticas ejercen sobre los tejidos. A pesar del gran potencial de dichas técnicas, se trata de una línea de investigación aún en desarrollo y, actualmente, con escasas aplicaciones a nivel clínico [35].

La aplicación en el tratamiento regenerativo periodontal de los factores de crecimiento de polipéptidos bioactivos ha demostrado la formación de nuevo cemento y de tejido conectivo. Algunos de estos factores son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento insulínico tipo-I (IGF-I), que han conseguido mejorar la regeneración en perros Beagle y monos con enfermedad periodontal [52, 53].

Las proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) son el producto más probado clínicamente que tiene la capacidad de regular las interacciones epiteliales mesenquimales implicadas en la formación inicial de los dientes. Estas proteínas son producidas por vaina epitelial de Hertwig, y desempeñan un papel importante en la cementogénesis y el desarrollo del aparato de inserción periodontal. Conocido con el nombre comercial Emdogain® (Straumann AG, Basilea, Suiza), se trata de una mezcla de proteínas de la matriz de esmalte conteniendo, principalmente, amelogeninas derivadas de los dientes en desarrollo de la especie porcina [2].

Se ha comprobado que las EMD son capaces de inhibir el crecimiento epitelial, lo cual da más tiempo al desarrollo de los acontecimientos que promueven la regeneración periodontal [54, 55]. Así, la revisión Cochrane de 13 ensayos clínicos reveló que las EMD mejoraban significativamente los niveles de inserción y reducción de la profundidad de sondaje. No obstante, los datos no pudieron ser bien interpretados debido al alto grado de heterogeneidad observada entre los ensayos incluidos [56]. En general, se encontró que el tratamiento con Emdogain® tiene efectos similares a los

observados con el uso convencional de la regeneración tisular guiada, no habiendo diferencias entre ambas técnicas con respecto a la recesión gingival ni con respecto a la aparición de infecciones tras el tratamiento [56].

Aunque la regeneración periodontal se consigue parcialmente mediante el uso de estos procedimientos, son técnicas limitadas, especialmente en situaciones clínicas difíciles [20], por lo que se hace necesaria una regeneración efectiva mediante el desarrollo de la terapia celular. Las células madre parecen tener un potencial terapéutico prometedor en la medicina regenerativa debido a su plasticidad y su capacidad de diferenciarse en diferentes linajes celulares, lo cual parece dar esperanzas para la regeneración de los diferentes tejidos periodontales (ligamento periodontal, cemento y hueso) [20], que no consiguen solucionar eficazmente las técnicas aplicadas hasta este momento.

Para poder comprender el potencial y la eficiencia de esta terapia celular en la regeneración periodontal, es necesario conocer previamente la biología de las células madre.

3.3. Células madre

El término de célula madre (stem cell) apareció en la literatura durante el siglo XIX. Por definición, una célula madre es una célula indiferenciada que es capaz de autorenovarse y de diferenciarse hacia múltiples tipos celulares [3, 4]. Estas dos propiedades, en conjunto, permiten a las células madre proliferar y regenerar los tejidos perdidos o dañados. Las células madre se han podido aislar de una amplia variedad de tejidos y se pueden clasificar en 3 categorías: células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas y células madre adultas [2].

3.3.1. Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (ESC) son células pluripotentes, que se aíslan de la masa celular interna del blastocito, un estadio del embrión que tiene lugar 5-6 días tras la fecundación [57]. El blastocito consta de dos capas de células, la masa celular interna,

que dará lugar al embrión y la masa celular externa, también conocida como trofoblasto, que formará la placenta. Las células de la masa celular interna son separadas del trofoblasto y se transfieren a un plato de cultivo bajo unas condiciones muy específicas para formar las líneas de ESC [58]. Las ESC tienen la capacidad de proliferar extensamente manteniéndose en un estadio indiferenciado [59] pero, bajo unas condiciones adecuadas, son capaces de diferenciarse en células con características de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) [60] (Fig. 11). Las ESC se caracterizan por la expresión de factores de transcripción como Nanog y Oct 4 [61, 62], que son los factores que les permiten mantenerse en un estadio indiferenciado y autorenovarse [62, 63]. Aunque presentan un gran potencial de proliferación y se pueden mantener indefinidamente en cultivo en un estado indiferenciado, su uso en terapias regenerativas está limitado por cuestiones legales y éticas, ya que para su obtención es necesaria la utilización de embriones [64].

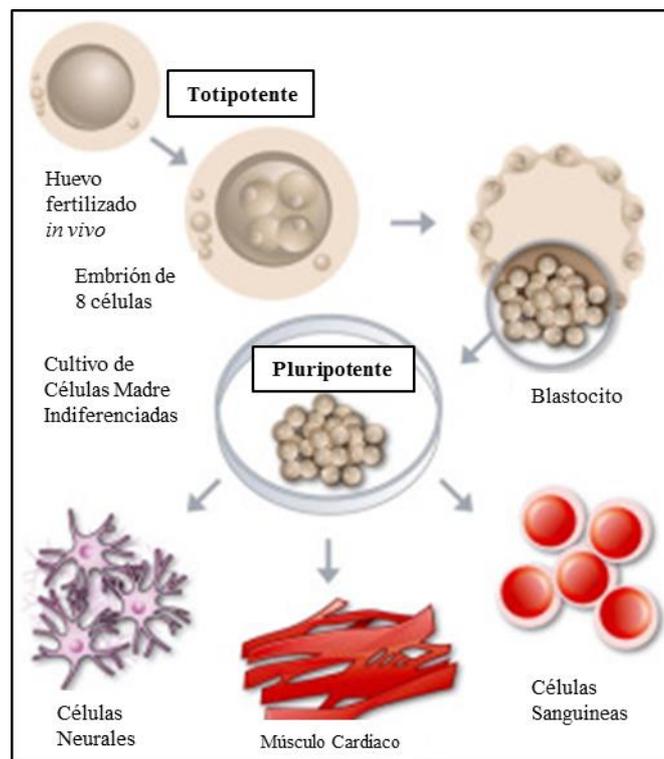


Figura 11. Obtención de células madre embrionarias (ESC). Las ESC se aíslan de la masa celular interna del blastocisto y son pluripotentes, es decir, pueden formar cualquier otro tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo). Imagen modificada de [65].

3.3.2. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Debido a los problemas éticos ocasionados por las ESC, se intentaron conseguir poblaciones de células madre pluripotentes a partir de células somáticas mediante modificación genética, utilizando algunos de los factores de transcripción que se había visto que se expresaban en las ESC. Así, en el año 2006, se describió por primera vez este proceso a partir de fibroblastos de ratón utilizando retrovirus que vehiculizaban e inducían dentro de la célula infectada la expresión de cuatro genes, Oct 3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4 [66]. Las células obtenidas se llamaron células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y la técnica utilizada para obtenerlas se conoce como reprogramación celular (Fig. 12). Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) son células similares a las células madre embrionarias por su morfología, sus perfiles de expresión génica y su capacidad de proliferación y diferenciación. La reprogramación celular se puede lograr utilizando varios tipos de técnicas para conseguir células iPSC a partir de células diferenciadas [67]. Actualmente, la mayoría de las técnicas empleadas se basan en la sobreexpresión heteróloga de un conjunto de factores de transcripción mediante la utilización de virus, lo que induce la pluripotencia en las células somáticas. El conjunto de factores más usado para inducir pluripotencia está formado por los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc pudiéndose reemplazar Klf4 y c-Myc por Nanog y Lin-28 [68]. Estas células tienen la ventaja de ser autólogas, al provenir del propio individuo, lo que evitaría los problemas de rechazo. Sin embargo, las manipulaciones genéticas pueden alterar el crecimiento y desarrollo de las células reprogramadas, lo que dificulta la previsibilidad de su comportamiento y, como tal, limita su aplicación terapéutica en la regeneración de tejidos [69]. Recientemente se ha descubierto que determinadas moléculas pequeñas como el ácido valproico son capaces de ejercer o potenciar el efecto de algunos de los factores de transcripción citados. El uso de tales moléculas se presenta como una alternativa a la expresión o administración de los factores de transcripción en sí [70, 71].

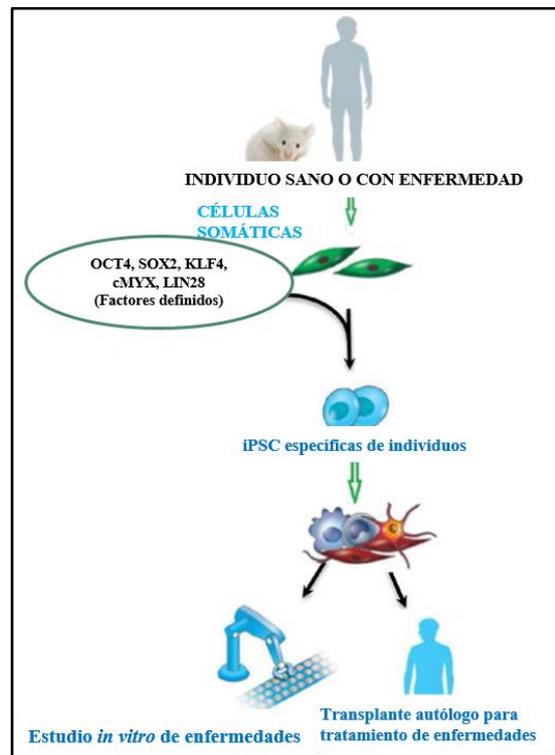


Figura 12. Obtención de iPSC mediante reprogramación celular y sus aplicaciones. Imagen modificada de [72].

3.3.3. Células madre adultas

Las células madre adultas se han identificado en muchos tejidos del organismo. Desde su descubrimiento, se ha reconocido que su capacidad de desarrollo es mayor de lo que inicialmente se había pensado. Debido a su fácil acceso y a sus características, el uso de estas células madre adultas en la regeneración tisular se ha incrementado en los últimos años [2]. Una de las ventajas de estas células, al igual que las iPSC, es su uso en el trasplante autólogo, ya que pueden ser extraídas del mismo paciente que se debe tratar, disminuyendo de ese modo la probabilidad de que surjan complicaciones de rechazo inmunológico [64]. Además, *a priori*, estas células son más seguras que las iPSC, al no estar modificadas genéticamente, con lo que su aplicación terapéutica es más viable.

3.3.3.1. Células madre de la médula ósea

La fuente más común de células madre adultas es la médula ósea, que contiene células madre hematopoyéticas o células madre mesenquimales [73]. Las células madre

hematopoyéticas fueron las primeras células madre que se utilizaron con éxito en terapia celular, en particular en el tratamiento de leucemia y síndromes de inmunodeficiencia, pero no son capaces de dar lugar a los tejidos conectivos de soporte [74]. Por otro lado, se ha observado el potencial terapéutico de las células madre mesenquimales (MSC) en el tratamiento de una serie de anomalías musculoesqueléticas, enfermedades cardíacas y defectos inmunológicos [73]. Las MSC son capaces de autorenovarse y diferenciarse en tipos celulares funcionales específicos [75, 76], y se caracterizan por la expresión positiva de los marcadores CD105, CD13 y CD73, y la expresión negativa para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 [76]. Después del subcultivo, las MSC exhiben un alto potencial de expansión manteniendo su cariotipo normal, presentan una capacidad proliferativa alta, incluso pueden formar colonias y tienen un potencial de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos [77]. Diferentes estudios han demostrado que las MSC son capaces de formar cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar *in vivo* después de la implantación en defectos periodontales en perros Beagle [78, 79], lo que sugiere que la médula ósea puede ser una fuente útil de MSC para la regeneración periodontal.

3.3.3.2. Células madre de origen dental

Las células madre de origen dental poseen un potencial de multidiferenciación, teniendo la capacidad de formar células con carácter osteo/odontogénico, adipogénico y neurogénico. Sin embargo, se puede afirmar que, en comparación con las células madre de la médula ósea, las células madre de origen dental tienen predilección por el desarrollo odontogénico [80].

Existen 5 tipos de células madre de origen dental: de la pulpa (DPSC), del ligamento periodontal (PDLSCs), de dientes primarios exfoliados (SHED), de la papila dental (SCAP) y del folículo dental (DFSCs) (Fig. 13). A continuación se estudiará cada una de ellas más detalladamente.

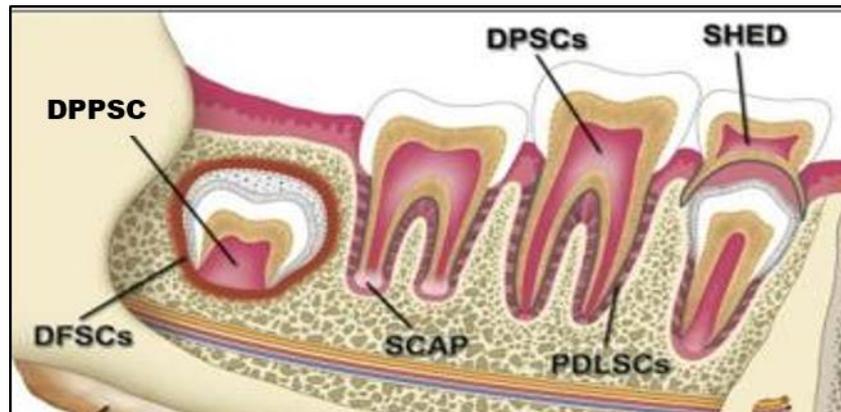


Figura 13. Células madre adultas de origen dental. DPSCs: células madre de la pulpa dental; PDLSCs: células madre del ligamento periodontal; SHED: células madre de dientes primarios exfoliados; SCAP: células madre de la papila dental; DFSCs: células madre del folículo dental; DPPSC: células madre pluripotentes de la pulpa dental. Imagen modificada de [81].

3.3.3.1.1. Células madre de la pulpa dental (DPSC: Dental Pulp Stem Cells)

Las primeras células madre dentales humanas, aisladas de la pulpa dental de los molares extraídos, presentan características de morfología similares con los fibroblastos. [82]. Esta población de células madre adultas llamadas DPSC (células madre de la pulpa dental) tiene un gran potencial de diferenciación, al igual que las otras células madre adultas [83]. Estas células expresan marcadores de tipo: STRO-1 y CD146, que también se expresa en MSC y BMMSC [82].

Las colonias de DPSC se cultivan y crecen a ritmos diferentes y se componen de un grupo heterogéneo de células, con diferentes morfologías y tamaños. Huang *et al.* compararon diferentes métodos de aislamiento para DPSC y determinaron que el rendimiento de estas células es diferente y que la digestión enzimática aumenta el grado de proliferación [80].

También hay estudios que analizaron si la edad de los pacientes era importante o no a la hora de aislar estas células. Se observó que las DPSC extraídas de personas mayores de 30 años de edad no parecían ser diferentes de las DPSC de pacientes más jóvenes [84].

En el estudio de Alongi *et al.* se examinó si las DPSC que derivan de pulpas inflamadas (DPSC-IP) podrían ser utilizadas para la regeneración del tejido dental. La

pulpa inflamada se desecha habitualmente tras pulpectomías y podría ser una posible fuente de células madre. No sólo se consiguieron aislar y cultivar estas células, sino que, además, los implantes DPSC-IP mostraron potencial de regeneración de tejidos *in vivo*, a pesar de que parecían perder algunas de sus propiedades de células madre de acuerdo a los estudios *in vitro* [85].

3.3.3.1.2. Células madre del ligamento periodontal (PDLSC: Periodontal Ligament Stem Cells)

Otras células madre aisladas de los tejidos dentales son las células madre del ligamento periodontal (PDLSC). Varios estudios afirman que el ligamento periodontal tiene poblaciones de células que pueden diferenciarse tanto hacia cementoblastos como hacia osteoblastos [17, 86, 87]. Entre los múltiples tipos de células que existen en el periodonto se ha observado la presencia de células madre, llamadas PDLSC (Periodontal Ligament Stem Cells), que se encargan de mantener la homeostasis y la regeneración del tejido periodontal [16]. Los análisis *in vivo* con PDLSC realizados en ratones inmunocomprometidos sugirieron la participación de estas células en la regeneración de hueso alveolar, al propiciar la formación de una fina capa de tejido muy similar al cemento. Esta capa de tejido contenía fibras colágenas y se asociaba íntimamente al hueso alveolar próximo al periodonto regenerado [17, 88].

3.3.3.1.3. Células madre de dientes temporales exfoliados (SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth).

Se han aislado células de la pulpa remanente de los dientes deciduos exfoliados, denominadas SHED, que contenían una población de células madre multipotenciales diferentes a las aisladas anteriormente de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSC). Las SHED, comparándolas con las DPSC, presentan una mayor velocidad de proliferación y una mayor capacidad de especialización [84]. Un revelador ejemplo es el de la existencia, hasta ahora ignorada, de células epiteliales en la pulpa de estos dientes. Aisladas de manera exitosa, se estudia la posibilidad de que jueguen un papel importante en la composición epitelial para la reparación o regeneración del diente, ya que sus características morfológicas se corresponden con el fenotipo de células madre epiteliales, pudiendo llegar a expresar marcadores epiteliales [89].

También se ha probado el potencial de las SHED para diferenciarse en células angiogénicas, cuya capacidad de inducción se considera fundamental para cualquier tipo de regeneración con tejido conjuntivo. Es necesario el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) para que las SHED se diferencien hacia células endoteliales [90]. En cuanto a la capacidad osteoinductora, un estudio en ratones ha demostrado que las SHED pueden reparar defectos de formación ósea. Así, los dientes deciduos no sólo favorecerían la guía eruptiva de los dientes permanentes, sino que también podrían estar involucrados en la inducción ósea durante la erupción del permanente [91].

3.3.3.1.4. Células madre de la papila dental (SCAP: Stem Cells from the Apical Papilla).

La papila apical hace referencia al tejido blando situado en los ápices del diente permanente que se está formando. Existe una zona muy rica en células entre la papila apical y la pulpa. Las SCAP son las precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular, mientras que las células madre de la pulpa (DPSC) son, probablemente, las precursoras de los odontoblastos que forman la dentina reparativa [80]. Además, éstas últimas, contienen un mayor componente vascular y celular que las SCAP. Se utilizaron las SCAP para conseguir raíces mediante ingeniería tisular utilizando cerdos como modelo experimental y así demostrar que son una fuente prometedora de células madre para las futuras aplicaciones clínicas [92].

3.3.3.1.5. Células madre del folículo dental (DFPC: Dental Follicle Precursor Cells).

El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación. Este tejido contiene células madre que son las que acabarán formando el periodonto, constituido por cemento, ligamento, hueso alveolar y encía [84]. Las DFPC han sido aisladas de los folículos dentales de los terceros molares impactados. Son semejantes al resto de células madre de origen dental pero constituyen colonias clonogénicas en menor número que los demás tipos. *In vitro*, estas células muestran una morfología típica de fibroblastos [93]. Mediante inducción se ha demostrado su capacidad de diferenciación osteogénica,

neurogénica y adipogénica [94, 95].

3.3.3.1.6. DPPSC (Dental Pulp Pluripotent-like Stem Cells)

Los terceros molares son una fuente muy accesible de células, debido a que el procedimiento de extracción de la muela del juicio es habitual en pacientes que necesitan tratamiento ortodóntico o por malposición de estas piezas. Como el tercer molar es el último diente en desarrollarse en los seres humanos, se encuentra en una etapa temprana de desarrollo en la que es capaz de producir una cantidad óptima de tejido de la pulpa dental para el aislamiento de células madre. En la pulpa dental de estos terceros molares se ha identificado una subpoblación de células de las DPSC que son capaces de diferenciarse *in vitro* a tejidos de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo [96-98] y, por tanto, poseen características de pluripotencia similares a las de las células madre embrionarias [98]. Esta subpoblación fue aislada por nuestro grupo de investigación, utilizando unas condiciones de cultivo determinadas y un medio específico [97]. Debido a sus características de pluripotencia se las denominó DPPSC: Dental Pulp Pluripotent-like Stem Cells (células madre pluripotentes de la pulpa dental). Aunque el porcentaje de DPPSC disminuye con la edad, siempre existe una cantidad suficiente para aislar la población de estas células, incluso en pacientes de edad avanzada [96, 97]. Para el aislamiento de las DPPSC se utiliza el mismo protocolo de aislamiento que el utilizado para las DPSC, por lo que comparten algunas características. Sin embargo, difieren en los niveles de expresión de los marcadores embrionarios, que son más elevados en las DPPSC, así como en la expresión de algunas proteínas de la membrana como CD73, que está ausente en las DPSC. En cuanto a las condiciones de cultivo también existen diferencias entre las dos poblaciones. Así, las DPPSC necesitan cultivarse a baja densidad y en un medio específico que contiene factores de crecimiento tales como EGF, PDGF y LIF, lo que les permite mantenerse en ese estado pluripotente. También se ha demostrado, por ejemplo, que las DPPSC tienen una mayor capacidad de generación de células óseas en comparación con las DPSC [98], y, además, las DPPSC no presentan ninguna anomalía cromosómica cuando se cultivan *in vitro* [96].

Las DPPSC son capaces de diferenciarse a células procedentes de otros linajes, no solo

en aquellas de su tejido de origen. Este hecho podría relacionarse con la expresión por parte de estas células de marcadores como SSEA4+, OCT4+, NANOG+, SOX2+, LIN28+, c-Myc+, CD13+, CD34-, CD45-, CD90 bajo, CD29+, CD73 bajo, STRO-1 bajo y CD146- [96-98]. Debido a que SSEA4, OCT4, NANOG, SOX2, LIN28 y c-Myc son marcadores característicos de las células pluripotentes, se reveló su pluripotencia, su capacidad de autorenovarse y de diferenciarse hacia tejidos de las tres capas embrionarias (lo que las asemeja a las ESC). Todo ello nos permite pensar en un futuro muy esperanzador para las DPPSC en el campo de la medicina regenerativa y la terapia celular.

3.4. Terapia celular en la regeneración periodontal

La terapia celular es un campo emergente de la ciencia que abarca los principios de la biología celular, la biología del desarrollo y la ciencia de biomateriales para generar nuevas estructuras necesarias para reemplazar la pérdida o los tejidos dañados. La terapia celular permite tener un enfoque alternativo a los tratamientos actuales, que pueden ayudar a aliviar las carencias de las opciones terapéuticas convencionales de la regeneración de las estructuras dentales vitales y funcionales. El concepto de la terapia celular se ha integrado en la investigación y las aplicaciones de la odontología regenerativa, incluyendo periodoncia, endodoncia y cirugía maxilofacial. Todos ellos tienen como objetivo gestionar los tejidos orales dañados y perdidos a través de la reconstrucción y regeneración del periodonto, el complejo dentino-pulpar, y los tejidos oro-faciales [64].

La terapia celular abarca muchas estrategias diferentes, incluyendo la inyección celular, el cultivo de tejidos, las matrices porosas e inyectables y la impresión tridimensional; pero está más encaminada al suministro de células dentro de matrices biocompatibles [3]. Esta última estrategia elimina algunas de las limitaciones de los procedimientos regenerativos convencionales, porque los factores de crecimiento y las células progenitoras se colocan directamente en el sitio del defecto (Fig.14) [4].

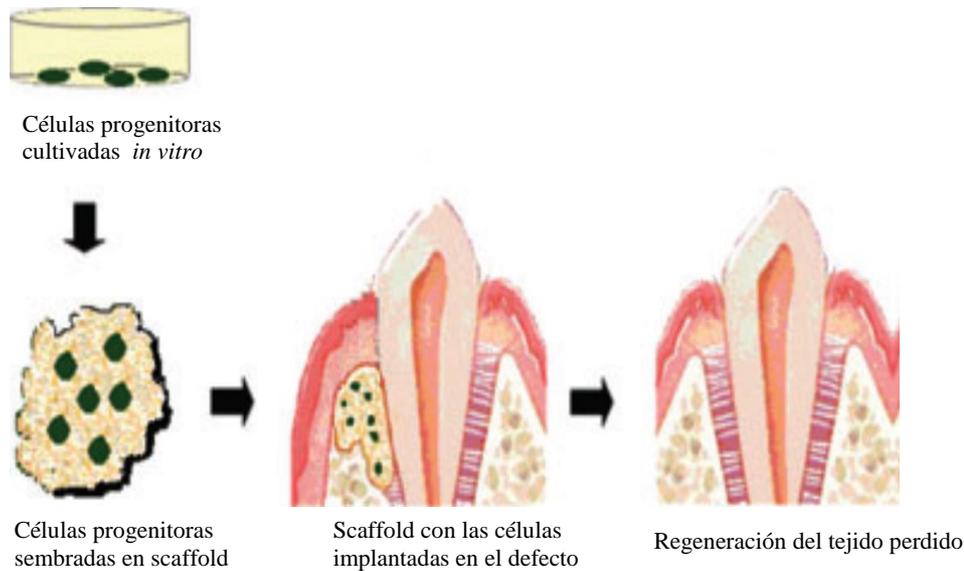


Figura 14. Esquema representativo de la ingeniería de tejidos en el tratamiento periodontal. Imagen modificada del artículo de Lin *et al.* [4].

El concepto de trasplantar las células en los defectos periodontales fue descrita por primera vez por van Dijk *et al.* [99]. Desde entonces, otros estudios han tratado de inducir la regeneración periodontal mediante la implantación de cultivos de fibroblastos del ligamento periodontal y células del hueso alveolar. Estas investigaciones tuvieron algunos éxitos pero, en general, las estrategias de tratamiento fueron limitadas debido a la naturaleza heterogénea de las células utilizadas en estos estudios. Más recientemente, se han utilizado células madre purificadas para facilitar la regeneración periodontal [4].

Los requisitos de la regeneración tisular para poder aplicarlos en la regeneración periodontal son (Fig. 15):

- *Células progenitoras/células madre* con capacidad de diferenciarse en osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos.
- *Moléculas bioquímicas* que actúan como señal para modular la diferenciación periodontal.
- *Matriz extracelular* de soporte, para crear estructuras 3D del órgano que se requiere regenerar o como vehículo para transportar las células y las moléculas,

con el fin de poder sustituir los tejidos dañados no solo de forma morfológica, sino también de forma funcional [2, 40, 64].

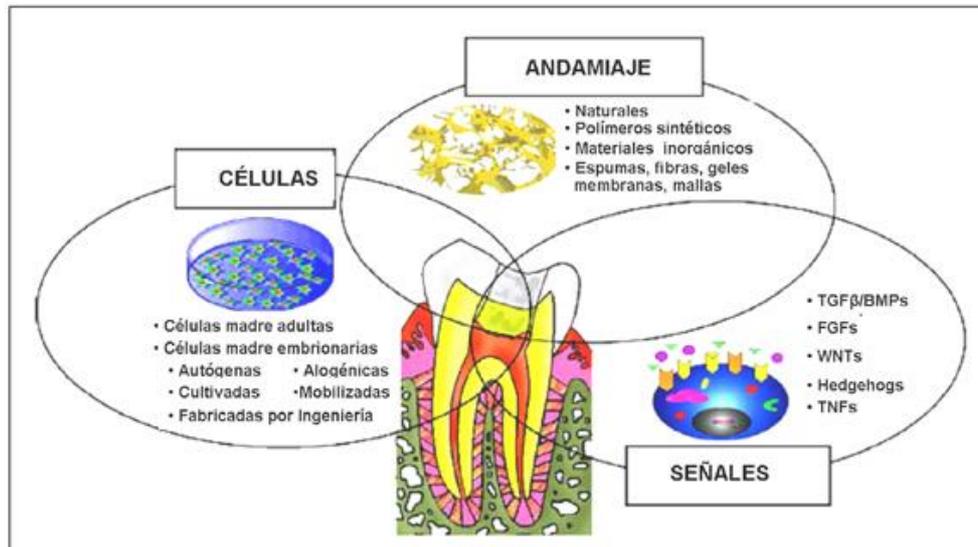


Figura 15. Los componentes de la Regeneración Tisular. Imagen modificada del artículo de Nakashima *et al.* [100]

El componente más crítico para la regeneración tisular es elegir la población de células madre adecuada. Muchos estudios han dirigido su línea de investigación hacia el hallazgo de obtener alta calidad de células madre adultas de fuentes fáciles de abordar. Como se ha descrito en el apartado anterior, se han aislado y cultivado células madre procedentes del tejido pulpar de dientes permanentes (DPSCs), células madre del ligamento periodontal (PDLSCs), de dientes temporales (SHED), de la papila apical de dientes inmaduros (SCAP) y del folículo dental (DFPCs) [64], que resultan muy interesantes debido a su fácil acceso y obtención.

Hay muchos grupos de investigación que han estudiado el potencial de las células madre adultas de origen dental para la regeneración periodontal. A continuación se resume la información disponible sobre el potencial de estas células para la regeneración de tejido periodontal en modelos animales (**Tabla 1**).

Referencia	Tipo de células	Tipo de defecto	Modelo animal	Matriz	Resultados obtenidos
Liu et al. 2008	Autólogos PDLSC	Defectos periodontales creados quirúrgicamente en mesial del primer molar. Inducción de inflamación mediante inserción de ligaduras.	Cerdos pequeños	Matriz HA/ TCP	Formación de nuevo hueso, cemento y ligamento periodontal. Mejoría en los parámetros clínicos y en la altura del hueso alveolar en el grupo: células + HA/TCP.
Park et al. 2011	Autólogos PDLSC, DFSC y DPSC	Defectos circunferenciales apicales creados quirúrgicamente	Perros Beagle	No matriz	PDLSC tuvieron el mejor potencial regenerativo. La regeneración periodontal no se obtuvo en el grupo DPSC.
Wei et al. 2012	Autólogos de vitamina C de capas PDLSC inducidas; La parte superior de la placa de células en capas de PDLSC; Autólogos de PDLSC disociadas	Defectos periodontales creados quirúrgicamente en mesial del primer molar. Inducción de inflamación mediante inserción de ligaduras.	Cerdos pequeños	No matriz para las células en capas,	Se observó regeneración de los defectos más que los niveles normales en el grupo de Vitamina C de capas PDLSC inducidas.
				Espuma de gel para los autólogos de PDLSC disociadas	Formación de fibras de Sharpey en todos los grupos.
					Porcentaje alto de formación de nuevo hueso alveolar en el grupo de la Vitamina C.
Ding et al. 2010	Autólogos de capas de PDLSC; Alogénicos de capas de PDLSC; Autólogos heterogéneos de células del ligamento periodontal (PDLSC)	Defectos periodontales creados quirúrgicamente en mesial del primer molar. Inducción de inflamación mediante inserción de ligaduras.	Cerdos pequeños	Matriz de HA/TCP	Resultados clínicos y histológicos significativos en los grupos de alogénicos y autólogos en capas de PDLSC. Ninguna evidencia de rechazo inmunológico en el grupo alogénico PDLSC.
Mrozik et al. 2013	Alogénicos PDLSC	Defectos de dehiscencias creadas quirúrgicamente	Ovejas	Matriz de esponja de espuma de gel	Todos los parámetros de regeneración fueron mejorados en ambos grupos comparando con los defectos no tratados.
Guo et al. 2014	Lámina de células monocapa PDLSC (MCS); Pelet de monocapa PDLSC (MCP); Pelet de multicapas PDLSC (MUCP)	Defectos periodontales creados quirúrgicamente en la parte mesial del maxilar superior del primer molar	Ratas Sprague Dawley	Ninguna	Se observó la inserción perpendicular de las fibras en los defectos en los grupos MUCP y MCP. Formación importante de tejido mineralizado fue encontrada en el grupo MUCP.
Seo et al. 2004	Xenogénicos (humano) PDLSC	Defectos periodontales creados quirúrgicamente en la superficie vestibular en molares inferiores	Ratones inmunodeprimidos	Matriz de HA/TCP	Las PDLSC humanas se integraron en el tejido periodontal en 2 de 6 muestras.
Iwasaki et al. 2014	Xenogénicos (humano) PDLSC	Defectos de furca clase II creados quirúrgicamente	Ratones inmunodeprimidos	Membrana amniótica	Se obtuvo regeneración. La cantidad de hueso nuevo fue elevada en el grupo PDLSC + membrana amniótica comparándolo con el grupo solo con la membrana.

Tabla 1. Estudios de animales de regeneración periodontal que utilizaron células adultas de origen dental. DFSC: Dental Follicle-derived Stem Cells (Células madre derivadas del folículo dental); DPSC: Dental Pulp-derived Stem Cells (Células madre derivadas de la pulpa dental) HA/TCP: Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate (Hidroxiapatita/ Fosfato tricálcico); PDL: periodontal ligament (ligamento periodontal); PDLSC: periodontal Ligament-derived Stem Cells (Células madre derivadas del ligamento periodontal). Tabla modificada del artículo de Bassir et al. de 2015 [20].

Otra revisión sobre los ensayos clínicos de la regeneración periodontal que utilizaron la terapia celular (**Tabla 2**) demuestra una mejoría de los parámetros periodontales:

Referencia	Tipo del estudio	Tipo celular	Tipo del defecto	Matriz	Resultados
Yamada et al. 2006	Caso clínico (n=1)	Autólogos BMSSC (de la cresta iliaca)	Defecto angular interproximal	PRP	Reducción del sondaje periodontal y ganancia del nivel clínico de inserción después de 1 año.
Yamada et al. 2013	Series de casos (n=17)	Autólogos BMSSC (de la cresta iliaca)	Defecto angular interproximal	PRP	Reducción de la profundidad del sondaje (PPD) de 5.12 ± 2.45 mm; El nivel clínico de inserción (CAL) de 4.29 ± 1.32 mm y la altura de hueso radiográficamente de $3.12 + 1.23$.
Feng et al. 2010	Series de casos (n=3)	Autólogos PDLP y PDLSC (de los terceros molares)	Defecto intraóseo de 6mm	Matriz de cerámica hidroxiapatita	Mejorías significativas en los parámetros periodontales se observaron en todos los pacientes.

Tabla 2. Ensayos clínicos de regeneración periodontal utilizando células madre. BMSSC: Bone Marrow skeletal stem cells (Células madre de la medula ósea); CAL: Clinical attachment level (El nivel de inserción clínico); PDLP: Periodontal ligament progenitor cells (Células precursoras del ligamento periodontal); PDLSC: Periodontal ligament derived stem cells (Células madre derivadas del ligamento periodontal); PPD: Periodontal probing depths (Profundidad del sondaje periodontal); PRP: Platelet-Rich Plasma (Plasma rico en plaquetas). Tabla modificada del artículo de Bassir et al. de 2015 [20].

Sin embargo, la característica de pluripotencia intrínseca de las DPPSC descritas en el apartado anterior las convierte en una población muy interesante para estudiar su potencial regenerativo hacia tejido periodontal *in vitro* utilizando dientes sanos y estériles como matriz. La matriz extracelular no sólo actúa como un vehículo para las células al sitio de la regeneración, sino que también desempeña un papel importante en la unión de las células, la retención de estas células en el espacio, la determinación de características morfológicas y reclutamiento de oxígeno y nutrientes. Los factores de gran importancia en la selección de un material de soporte adecuado incluyen propiedades tales como la porosidad, la conductividad del tejido, biocompatibilidad y la tasa de resorción [64]. En nuestro estudio, como soporte utilizamos dientes humanos

sanos, cuyas propiedades se asemejan a la realidad mucho más que cualquier otro soporte. Además, estos dientes fueron tratados con fibronectina para favorecer la adhesión de las células a los mismos.

4. Objetivos

Objetivo principal:

Estudiar la capacidad regenerativa de las DPPSC a la estructura periodontal *in vitro* cuando se cultivan en medio osteogénico encima de dientes humanos estériles.

Objetivos secundarios:

1. Caracterizar las DPPSC indiferenciadas en cultivo.
 - 1.1. Caracterización morfológica de las DPPSC mediante microscopía óptica.
 - 1.2. Caracterización morfológica de las DPPSC mediante microscopía electrónica de transmisión.
 - 1.3. Caracterización de las DPPSC mediante FACS.
 - 1.4. Caracterización de las DPPSC mediante Inmunofluorescencia.
 - 1.5. Estudio de la estabilidad genética de las DPPSC mediante Short-CGH.
 - 1.6. Análisis de la expresión de marcadores de pluripotencia de las DPPSC mediante RT-PCR.
2. Estudiar capacidad de diferenciación de las DPPSC a tejido óseo analizando la expresión de marcadores óseos por RT-PCR.
3. Estudiar la capacidad de diferenciación de las DPPSC a tejido periodontal analizando la expresión de marcadores de tejido periodontal por RT-PCR.

4. Estudiar la estructura extracelular formada por las DPPSC *in vitro* después de diferenciarlas sobre los dientes humanos estériles en medio osteogénico mediante microscopía electrónica de barrido e histología.

5. Hipótesis de trabajo

Hipótesis nula

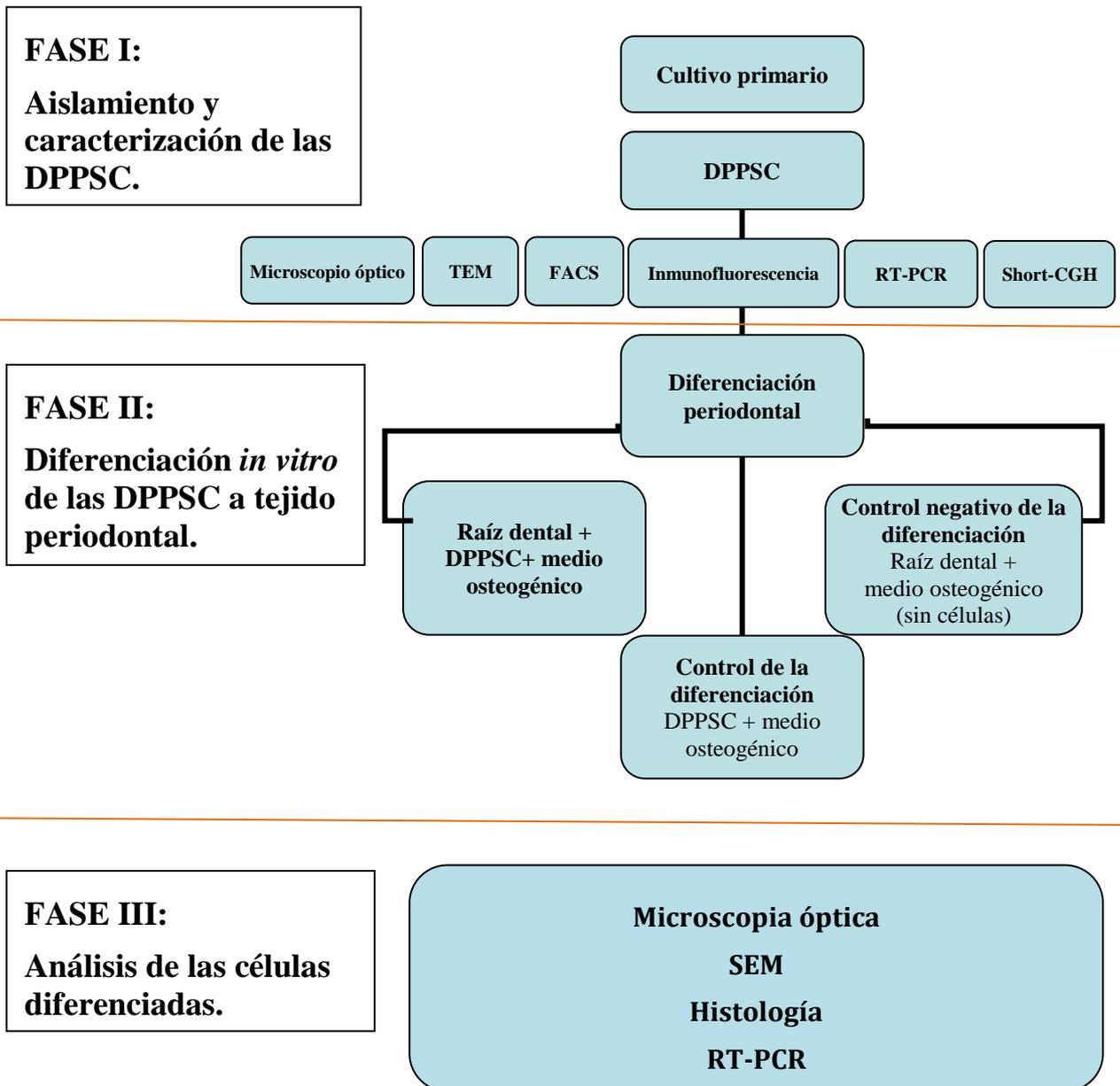
Las DPPSC tienen capacidad regenerativa formando el complejo periodontal (el tejido óseo, la matriz extracelular y el cemento) después de diferenciarlas *in vitro* sobre dientes humanos estériles en medio osteogénico.

Hipótesis alternativa

Las DPPSC no tienen capacidad regenerativa formando el complejo periodontal (el tejido óseo, la matriz extracelular y el cemento) después de diferenciarlas *in vitro* sobre dientes humanos estériles en medio osteogénico.

6. Metodología

6.1. Diseño experimental



6.2. Recogida de terceros molares y obtención del cultivo primario

6.2.1. Selección de pacientes

Se seleccionaron terceros molares con ápices abiertos que fueron extraídos con motivos ortodónticos o profilácticos de 5 pacientes de diferentes edades y sexo (14 – 19 años) que no presentaban ninguna patología en su historia clínica, en la Clínica Universitaria de Odontología (CUO) de la UIC Barcelona. No obstante, la diferenciación final se realizó con las células obtenidas de la pulpa dental de uno de los 5 pacientes.

A los pacientes se les explicaron los objetivos de nuestro estudio y se les dio un consentimiento informado que tuvieron que firmar para participar en el estudio. Se respetó y se cumplió la ley de protección de datos de cada paciente.

El protocolo de nuestro estudio fue aprobado por el comité ético e investigación (CER) de la UIC Barcelona (ver anexo 2).

6.2.2. Obtención del cultivo primario de las DPPSC a partir de terceros molares

Las muestras se recogieron durante el procedimiento de extracción de los terceros molares inmaduros, con los ápices abiertos. Después de la extracción, las muestras se colocaron en frascos conteniendo medio de transporte, compuesto por 1ml de 0.25% Tripsina-EDTA (Life technologies), 5 ml de tampón fosfato salino (PBS) y 1 ml de penicilina/estreptomicina (P/S) como antibiótico. Se transportaron en hielo lo más rápidamente posible al laboratorio, donde se empezaron a procesar las muestras bajo una campana de flujo laminar, en condiciones estériles.

Para ello, los terceros molares se colocaron en placas Petri y se extrajo el tejido pulpar con Tiranervios. Después, el tejido pulpar obtenido se desintegró en una solución de colagenasa tipo I (3 mg/ml; Sigma-Aldrich) y 1 ml de 0.25% Tripsina-EDTA (Life technologies). Se dejaron en el baño a 37°C con agitación (40 rpm) durante 45 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 1800 rpm y 4°C. Se

eliminó el sobrenadante y el sedimento o pellet se lavó con 5 ml de PBS. Después, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos, 1800 rpm, a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo de DPPSC sobre el pellet celular. El medio de cultivo de DPPSC estaba compuesto por 60% de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-low glucose (Life Technologies) y 40% MCDB-201 (Sigma-Aldrich) con SITE Liquid Media Supplement 1X (Sigma-Aldrich), 1X linoleic acid-bovine serum albumin (LA-BSA) (Sigma-Aldrich), 10^{-4} M ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich), 100 unidades de penicilina/1000 unidades de estreptomina (P/S), 2% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml hPDGF-BB (R&B Systems), 10 ng/ml EGF (R&B Systems), 500 ng/ml Leukemia inhibitory factor (LIF) (Millipore), 0.8 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich) and 55 μ M β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Los pellets obtenidos para cada donante se resuspendieron en el medio de cultivo y se añadieron sobre placas de cultivo celular, que previamente habían sido tratadas con 100 ng/ml fibronectina (FN) (Life Technologies) durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Finalmente, las placas con las células resuspendidas en el medio de cultivo se incubaron a 37°C, 5% CO₂. El medio se cambió cada 2-3 días.

La densidad del cultivo celular es muy importante y, por esta razón, cuando el cultivo superó la confluencia de 30% se realizaron los pases necesarios, para que la morfología y el fenotipo característico de las células no se perdieran. En cada pase, las células se levantaron añadiendo 0.25% Tripsina-EDTA (Life Technologies) y, tras neutralizar la acción de la tripsina y contabilizar el número de células en la cámara de Neubauer, se sembraron a una densidad de 100 células/cm². Las células se cultivaron hasta llegar a pase 4, momento en el que se caracterizaron.

6.3. Caracterización de las DPPSC

Para poder sostener que las DPPSC son una línea celular ideal para nuevas diferenciaciones, fueron caracterizadas morfológicamente y fenotípicamente, y se comprobó su estabilidad genética. Para ello, se utilizaron distintas técnicas, como microscopía óptica, citometría de flujo (FACS), inmunofluorescencia, reacción en

cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y, por último, la técnica de hibridación genómica comparativa corta (short-CGH).

6.3.1. Microscopía óptica - Morfología DPPSC

Para poder estudiar la morfología de las DPPSC indiferenciadas del cultivo primario a través del microscopio óptico se tomaron imágenes de las células a distintos pases, comprobando así la morfología de nuestro cultivo con los descritos anteriormente [96, 97]. Se tomaron imágenes a 10X, 20X, 40X y 100X con el microscopio óptico (OX.3040 Euromex microscopio binocular por contraste de fase) y con la cámara (DC.10000c CMEX - 10 digitales 10 Mpix USB - 2 CMOS) y, finalmente, se procesaron con el programa Imagefocus.

6.3.2. Microscopía electrónica de transmisión - Morfología DPPSC

Para comprobar a nivel intracelular la morfología de las DPPSC indiferenciadas en cultivo, se aisló una pequeña parte del pellet celular de 1mm³ y se fijó en solución de Karnovski, compuesta por 4% formaldehído (Sigma-Aldrich), 5% glutaraldehído (Sigma-Aldrich) y 0.2M cacodilato tampón (Sigma-Aldrich). Después de 48 horas las muestras se dejaron en araldite. Se realizaron tinciones de contraste con citrato y, por último, las secciones se observaron mediante un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM900).

6.3.3. Citometría de Flujo (FACS)- Fenotipo DPPSC indiferenciadas

El fenotipo de las DPPSC indiferenciadas del cultivo primario fue analizado con el FACS Calibur (Fluorescence Activated Cell Sorting) en el Servicio de Citometría de la Universidad Autónoma de Barcelona, para identificar los marcadores de pluripotencia, que habían sido descritos en los estudios anteriores [96, 97].

Del cultivo primario, se creó un grupo de muestras que fueron incubadas con diferentes anticuerpos específicos para humano (**tabla 3**). Como control negativo, una parte de la muestra fue incubada con anticuerpos de ratón IgG1 unidos al fluorocromo.

Anticuerpo (marcador)	Fluorocromo	Característica
Monoclonal de ratón IgG1anti CD 105 (R&D Systems)	FITC (verde)	Marcador de membrana
Monoclonal de ratón IgG1anti CD 29 (BD Pharmingen)	PE (rojo)	Marcador de membrana
Monoclonal de ratón IgG1anti CD 45 (BD Pharmingen)	PE-Cy5 (rojo)	Marcador de membrana
Monoclonal de ratón anti CD 146 (eBioscience)	FITC (verde)	Marcador de membrana
Monoclonal de ratón IgG1 anti NANOG (BD Pharmingen)	FITC (verde)	Marcador nuclear
Monoclonal de ratón IgG1 anti OCT 3/4 (BD Pharmingen)	FITC (verde)	Marcador nuclear

Tabla 3. Marcadores / anticuerpos utilizados en la caracterización de las DPPSC, con los fluorocromos correspondientes y sus localizaciones.

Tras la incubación correspondiente (45 minutos, a 4°C, en oscuridad), para eliminar el fluorocromo residual y evitar falsos positivos, las muestras fueron lavadas dos veces con 2% de FBS (fetal bovine serum) en PBS y centrifugadas durante 6 min a 1.800 rpm y 4°C. Después, se resuspendieron los pellets celulares en 300 o 600 µl de PBS con 2% de FBS, dependiendo de la cantidad de pellet observado, y se obtuvieron las lecturas de citometría de flujo con el FACSscan (FACS Calibur, BD Biosciences). Los resultados fueron analizados con WinMDI 2.8 software. Se usaron más de 500.000 células en cada muestra y se excluyeron las uniones no específicas y las autofluorescencias.

6.3.4. Análisis de inmunofluorescencia - Fenotipo DPPSC indiferenciadas

Para confirmar el fenotipo de las DPPSC indiferenciadas [97], el cultivo primario fue examinado con la técnica de inmunofluorescencia.

En primer lugar, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 15 minutos. Las muestras se incubaron en PBS (Life Technologies) con 5% BSA (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos para bloquear lugares de unión inespecíficos y, después, durante 60 minutos se incubaron con sus correspondientes anticuerpos primarios: conejo anti-SSEA4 (Abcam) y ratón anti-CD13 (Abcam). Después de realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno en PBS, las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios: PE – acoplado a la IgG anti-conejo (PE-coupled anti-rabbit IgG) y FITC – acoplado a la IgG anti-ratón (FITC-coupled anti-mouse IgG) (Abcam). Finalmente, y tras hacer un lavado con 1% BSA (Sigma-Aldrich) en PBS, las muestras fueron examinadas con el microscopio de fluorescencia confocal (Microscopio Confocal 1024, Olympus AX70, Olympus Optical, Tokyo).

6.3.5. Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) - Genotipo DPPSC indiferenciadas

El genotipo de las DPPSC del cultivo primario fue comprobado con la técnica de RT-PCR. Para ello, se lisó una muestra del cultivo primario con 1 ml del reactivo Trizol (Life Technologies) y, posteriormente, se aisló el RNA siguiendo las instrucciones del fabricante. Alícuotas de 1 µg o 2µg de RNA fueron tratadas con DNAsa I (Invitrogen) para eliminar restos de ADN genómico. Posteriormente, las muestras de RNA se retrotranscribieron con el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) para obtener el DNA complementario (cDNA). Después, para realizar la PCR se utilizó el kit TopTaq Mastermix (Qiagen). Se amplificaron, utilizando los primers específicos (**tabla 4**), los fragmentos del cDNA correspondientes a los marcadores genéticos específicos de las DPPSC: OCT3/4, NANOG y SOX-2. Como control interno se utilizó GAPDH. Las muestras amplificadas se sometieron a un gel de agarosa con Bromuro de etidio para detectar las bandas de los distintos marcadores.

Gen	Primer	Secuencia (5'→3')
OCT3/4	Foward	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG
	Reverse	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC
NANOG	Foward	CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C
	Reverse	CGG AAC ATT CCC AGT CGG GTT CAC C
SOX 2	Foward	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA
	Reverse	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG T
GAPDH	Foward	TTG GCT GGA GCG AAT GGA TTA
	Reverse	GCT CAG GAA TCC CAG AGA CGA C

Tabla 4. Marcadores de caracterización de las DPPSC indiferenciadas. GAPDH como control interno.

6.3.6. Hibridación genética comparativa corta (Short-CGH) - Estabilidad genética DPPSC indiferenciadas

Antes de empezar nuestro experimento de diferenciación a tejido periodontal, se comprobó la estabilidad genética del cultivo celular, imprescindible para que las DPPSC puedan ser consideradas para los estudios *in vitro*. Se utilizó un único clon de células (8DD) obtenido de la pulpa dental de uno de los pacientes y se analizó a través de la técnica del short-CGH (Hibridación genómica comparativa corta), tal y como lo describió Rius M. *et al.*[101].

Para realizar la técnica, a partir del cultivo primario de DPPSC a pase 4, proveniente de la pulpa dental de un paciente de sexo masculino (46, XY) se extrajeron 16 células unitarias (n=16) y se hicieron triplicados. Para el control de hibridación se utilizó una muestra de células masculinas (47, XXY).

Esta técnica se realizó en el Departamento de Biología Molecular Genómica Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona.

6.4. Diferenciación de las DPPSC a tejido periodontal

6.4.1. Preparación de las muestras de dientes

Tras extraer el tejido pulpar, los dientes (n=11 dientes) se limpiaron y las coronas se eliminaron. Se realizaron cortes longitudinales, dividiendo las raíces en dos partes (22 trozos de dientes). Los bloques de dientes se limpiaron usando un protocolo descrito previamente por Galler *et al.* [102]. A modo de resumen, las raíces se trataron con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Life Technologies) 0,5 M durante 1 minuto, después se lavaron en PBS (Life Technologies) durante 5 minutos y se dejaron en 4% hipoclorito de sodio (NaOCl) durante 10 minutos. A continuación, las raíces se lavaron 3 veces en PBS estéril y se dejaron en 0,5 M EDTA durante 10 minutos, seguido de otros 3 lavados en PBS. Finalmente, para comprobar la esterilidad, las raíces se incubaron en medio DPPSC durante 4 días a 37°C y se controló el crecimiento bacteriano. Una vez comprobada la esterilidad, los dientes se dividieron en 2 grupos de 11 trozos de dientes cada uno: (1) grupo de DPPSC (las DPPSC se cultivaron encima de los dientes) y (2) grupo control (dientes sin células).

6.4.2. Diferenciación periodontal

Los cortes transversales de dientes se introdujeron en placas de 6 pocillos, 3 trozos de dientes en cada pocillo y se incubaron durante 24 horas con fibronectina (FN) a 37°C (Fig.16).



Figura 16. Placa de 6 pocillos con las muestras de dientes.

Después se sembraron las DPPSC a pase 4, que previamente habían sido extraídas de la pulpa dental del cultivo primario.

Se cultivaron a la misma densidad, 20.000 células por cada pocillo con 4 ml de medio de diferenciación osteogénico (Fig.17). Se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 3 semanas. El medio osteogénico consistió en: α -MEM (Gibco) con un 10% de FBS inactivado por calor (Hyclone), 10mM β -glicerol fosfato (Sigma), 50 μ M ácido ascórbico-L (Sigma), 0.01 μ M dexametasona y 1% de penicilina/estreptomicina. El medio se cambió cada 3 días durante el periodo de 21 días.



Figura 17. Placa de 6 pocillos con las muestras de dientes y el medio de diferenciación osteogénico con las células DPPSC.

El experimento constaba de 5 placas, 3 de las cuales (a razón de una por semana) fueron utilizadas para aislamiento de RNA. De las 2 restantes, una se destinó al análisis del SEM y la otra al examen histológico (Fig. 18).

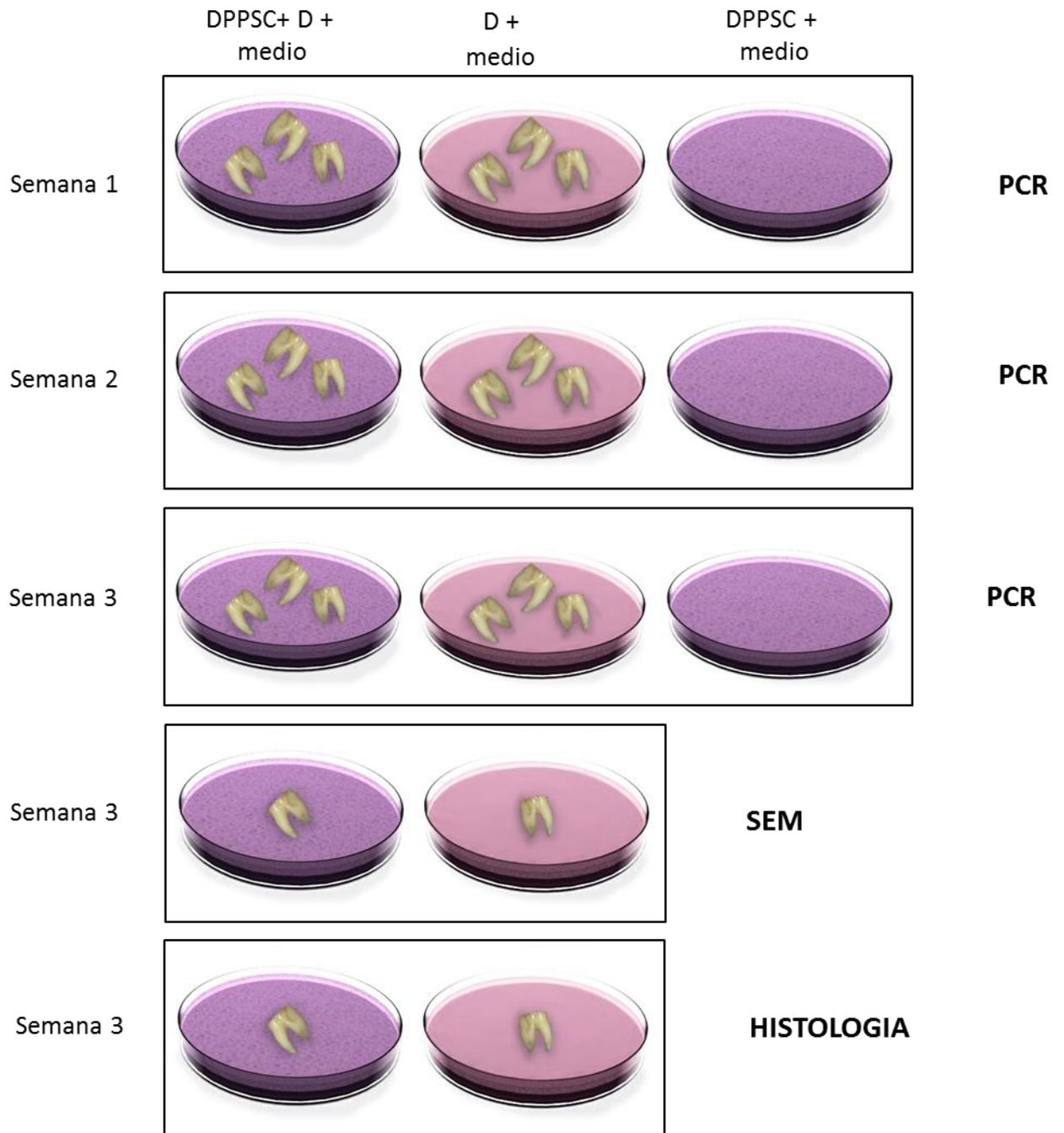


Figura 18. Diseño experimental de la diferenciación. En la primera semana (S1) en la placa el primer pocillo contiene células (DPPSC) sobre los dientes (D) cultivadas en medio osteogénico, el segundo pocillo contiene dientes con medio osteogénico sin DPPSC y en el tercer pocillo se encuentran DPPSC con medio osteogénico sin dientes. Las 3 placas (S1, S2 y S3) se utilizaron para la extracción del RNA para el estudio de los genes específicos (PCRs). Las placas de la tercera semana se destinaron para el estudio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y el examen histológico.

A los 7, 14, 21 días se añadieron 300 µl de Trizol (Life Technologies) encima de los dientes de cada pocillo y también encima de los pocillos sin dientes, para levantar y lisar las células. Se recogió el Trizol en tubos Eppendorf que se guardaron en el congelador a -80°C, hasta el aislamiento de RNA.

En paralelo, las células DPPSC se cultivaron en el medio de diferenciación osteogénico en placas previamente tratadas con fibronectina (FN) sin dientes, representando el control en 2D de la diferenciación.

El grupo control para el SEM y el análisis histológico, consistió en placas con dientes y el medio de diferenciación osteogénico sin las células DPPSC.

6.4.3. Procesado de las muestras para microscopia electrónica de barrido (SEM).

En el día 21, las muestras de la placa destinada al análisis de SEM, se fijaron y se llevaron al Servicio de Microscopia Electrónica de la Universidad Autónoma de Barcelona, donde fueron tratadas y preparadas para la observación con el microscopio electrónico de barrido (SEM). Como control positivo se extrajo un diente que estaba en oclusión, con su ligamento periodontal íntegro, y se procesó igual que las otras muestras.

Para la fijación se utilizó glutaraldehído al 2.5% (Ted Pella Inc.) en un buffer de 0.1M de Na-cacodylate (EMS, ElectronMicroscopy Sciences, Hatfield, PA) (pH 7.2), donde se incubaron las muestras durante 1 hora en hielo. Después de la fijación, se trataron con 1% de osmium tetroxide (OsO₄) durante 1 hora. Cada muestra se colocó encima de un pie de aluminio y se realizó el proceso de deshidratación a través de una serie de soluciones de acetona (30-100%). Las muestras se introdujeron al vacío en el Zeiss 940 DSM scanning electron microscope para obtener las imágenes a analizar.

6.4.4. Procesado de las muestras para el examen histológico.

En la tercera semana, las muestras de la placa de histología, se colocaron en paraformaldehído o formaldehído a 10% durante 24 horas y se transportaron al Servicio

de Anatomía Patológica del Instituto Universitario Dexeus, donde fueron descalcificadas y tratadas con diferentes métodos de tinción. Para ello, las muestras se incluyeron en parafina y, posteriormente, se realizaron cortes de 4- μ m de grosor. Se hicieron tinciones con hematoxilina-eosina (H&E), azul de alciano y la tinción tricrómica de Masson para determinar la formación de nuevas fibras de colágeno, vasos sanguíneos y cementoblastos. Se utilizó el sistema de análisis de imagen Image-Pro PlusTM, Media Cybernetic, Silver Springs, MD.

6.4.5. Procesado de las muestras para el estudio de los genes específicos.

Con las muestras obtenidas cada semana, se realizaron las pertinentes RT-PCRs. En primer lugar, el RNA fue aislado de las muestras de días 7, 14 y 21, utilizando Trizol (Life Technologies) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se cuantificó el RNA en cada muestra, utilizando un espectrofotómetro BioTek. Después alícuotas de 1 μ g de RNA se trataron con DNasa I (Invitrogen) y se retro-transcribieron con el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA fue amplificado utilizando el kit TopTaq Mastermix (Qiagen) y primers específicos (**tabla 5**). Se utilizó GADPH como control. El resultado de la amplificación se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio.

Los primers específicos de tipo óseo utilizados fueron: RUNX2 (Factor de transcripción 2 relacionado con Runt), OC (Osteocalcina), ALP (Fosfatasa Alcalina) y de tipo periodontal: COL I (Colágeno tipo 1), COL III (Colágeno tipo 3), POSTN (PERIOSTIN), S100A4 (Proteína de unión a calcio A4), PLAP (Ligamento periodontal asociado a la proteína-1), BGN (Biglycan).

Gen	Primer	Secuencia	Longitud	T°	Tiempo RT
				experimento	
HK	FW	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	87	60°C	60'
	RV	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG			
RUNX2	FW	TTA CTG TCA TGG CGG GTA AC	220	55°C	60'
	RV	GGT TCC CGA GGT CCA TCT A			
OC	FW	GTG CAG CCT TTG TGT CCA A	129	63°C	30'
	RV	GCT CAC ACA CCT CCC TCC T			
ALP	FW	GGA CAT GCA GTA CGA GCT GA	133	55°C	30'
	RV	GTC AAT TCT GCC TCC TCC CA			
COL I	FW	ACT GGT GAG ACC TGC GTG TA	263	60°C	60'
	RV	CAG TCT GCT GGT CCA TGT A			
COL III	FW	AAC ACG CAA GGC TGT GAG ACT	88	60°C	60'
	RV	GCC AAC GTC CAC ACC AAA TT			
PERIOSTIN	FW	CAC ACT CTT TGC TCC CAC C	650	58,5°C	30'
	RV	GAA TCG CAC CGT TTC TCC			
S100A4	FW	AGC TTC TTG GGG AAA AGG AC	292	58,5°C	30'
	RV	AAC TTG CTC AGC ATC AAG CA			
PLAP	FW	CTG GGC CTA GGA AAC AAC AA	205	60°C	30'
	RV	TTG GCA CTG TTG GAC AGA AG			
BGN	FW	GAC CTG CAG AAC AAC GAC ATC TC	59	61°C	30'
	RV	TGC TGG AGA CCC TTG AAG TCA T			

Tabla 5. Marcadores de los genes específicos de tipo óseo y de tipo periodontal. GAPDH se usó como control interno.

7. Resultados

7.2. Caracterización de las DPPSC.

7.2.1. Morfología mediante microscopio óptico.

Para comprobar las características morfológicas, las DPPSC indiferenciadas se observaron a través del microscopio óptico en la fase inicial del cultivo 2D (Fig. 19). Las células presentaban un tamaño pequeño, morfología triangular con un núcleo prominente y escaso citoplasma.

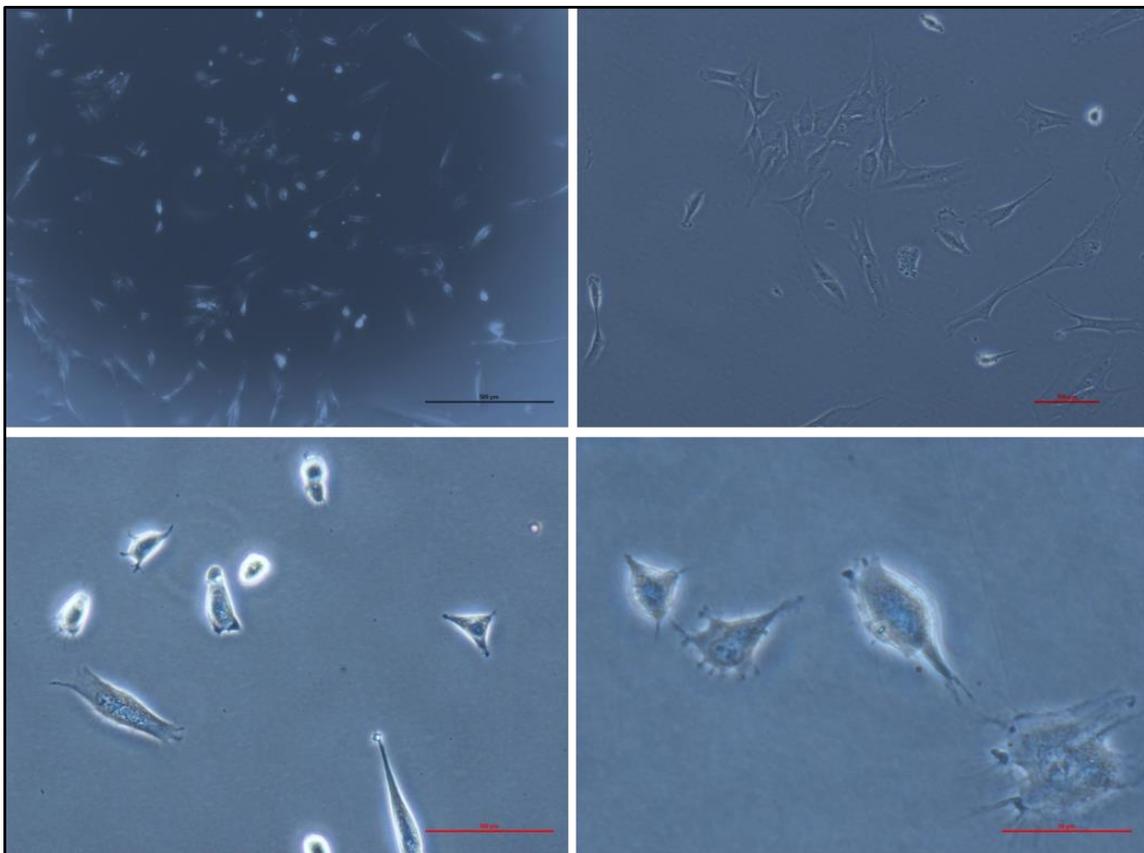


Figura 19. Morfología celular de las DPPSC (pase 4) en medio de cultivo DPPSC a diferentes magnificaciones 10X, 20X, 40X 100X en el microscopio óptico. Se observan la forma redondeada-triangular de las células y el núcleo alargado prominente.

7.2.2. Morfología mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La morfología en detalle de las DPPSC indiferenciadas fue estudiada mediante microscopia electrónica de transmisión (Fig. 20) Se observó que las células presentan núcleos muy grandes comparando con el volumen del citoplasma, característica específica de las células embrionarias.

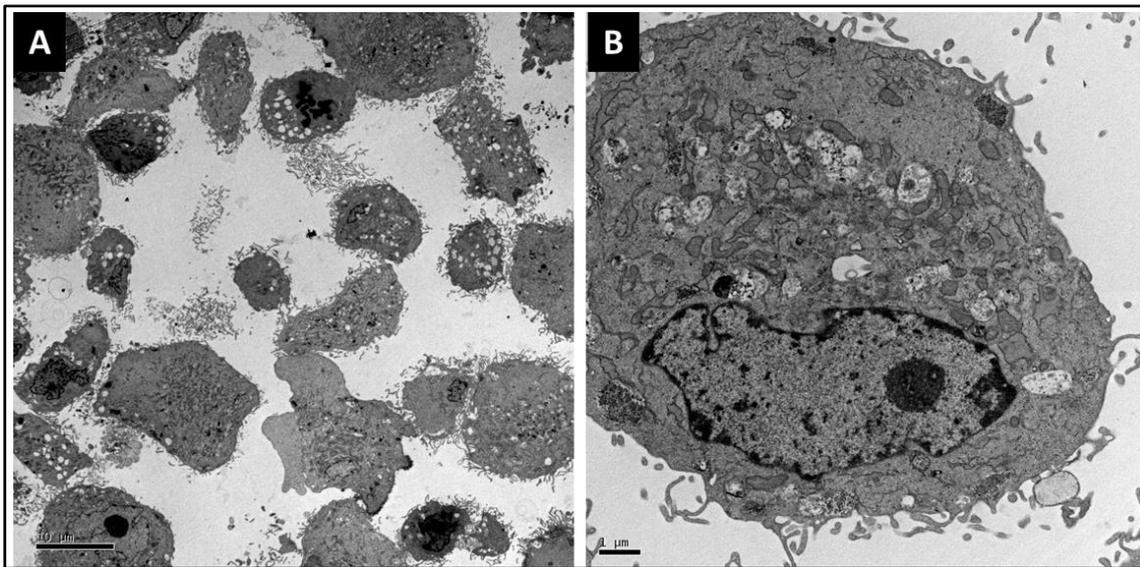


Figura 20. **A:** Cultivo de DPPSC, campo amplio. Se observan células pequeñas, redondeadas, con un núcleo grande y poco citoplasma. **B:** Célula individual posee un núcleo grande alargado comparando con el citoplasma, característica que indica que presentan una capacidad replicativa alta, típica de las células embrionarias.

7.2.3. Citometría de flujo.

Para comprobar el fenotipo de las DPPSC indiferenciadas del cultivo primario se analizaron las células mediante citometría de flujo. Los resultados evidenciaron expresiones positivas para los marcadores de membrana: CD105 (92,15%), CD29 (99,63%), CD146 (15,54%), CD45 (0,02%) (Fig. 21A) y para los marcadores de pluripotencialidad: OCT3/4 (70,72%) y NANOG (30,18%) (Fig. 21B). Esta característica es típica para las DPPSC.

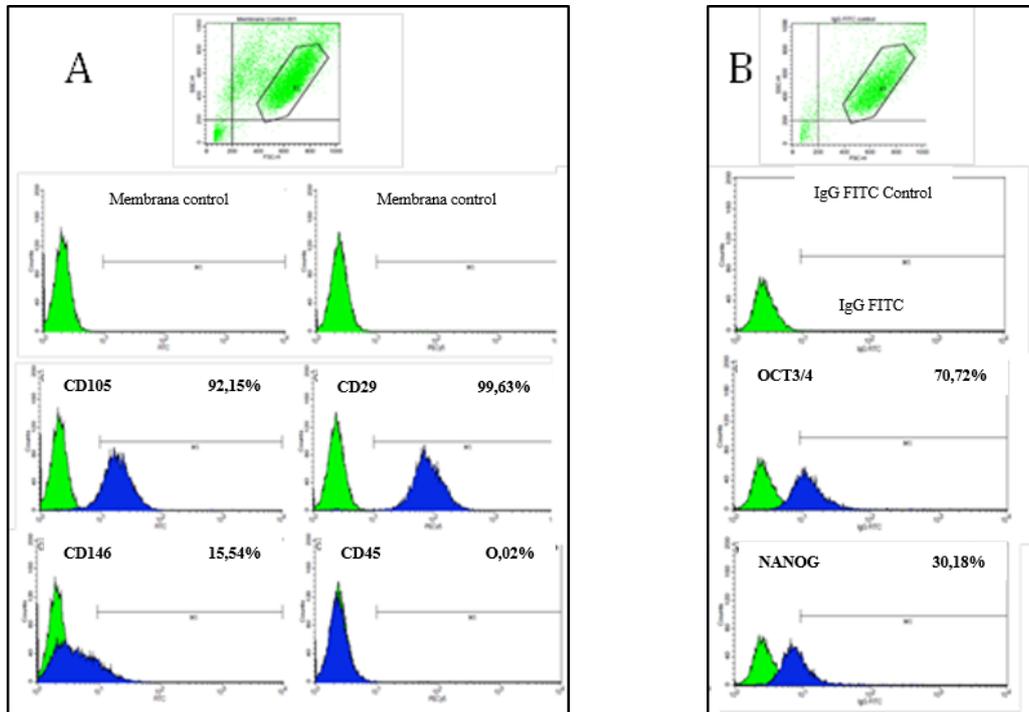


Figura 21. Análisis de FACS de las DPPSC. A: Análisis de FACS de los marcadores de membrana: CD105 (92,15%), CD29 (99,63%), CD146 (15,54%) y CD45 (0,02%). **B:** Análisis de FACS de los marcadores de pluripotencialidad: OCT3/4 (70,72%) and NANOG (30,18%).

7.2.4. Inmunofluorescencia.

Mediante el análisis de inmunofluorescencia se confirmó el fenotipo de las DPPSC indiferenciadas y los resultados mostraron la expresión del marcador de células adultas CD 13 y el marcador de pluripotencia SSEA4 (Fig. 22). Se utilizó el Hoechst (HT) como control nuclear (color azul).

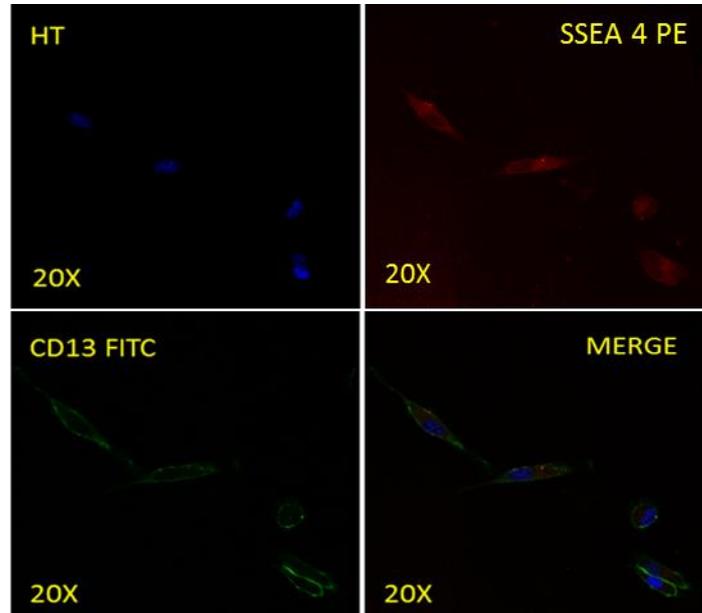


Figura 22. Análisis de inmunofluorescencia de los marcadores CD 13-FITC y SSEA4-PE. Hoechst (HT) como control nuclear. Se observa la expresión de los dos marcadores el CD13-FITC y el SSEA4-PE en las membranas celulares.

7.2.5. RT-PCR.

La RT-PCR comprobó el genotipo de las DPPSC indiferenciadas y reveló expresión genética positiva para los marcadores de pluripotencia OCT 3/4, NANOG y SOX-2 (Fig. 23).

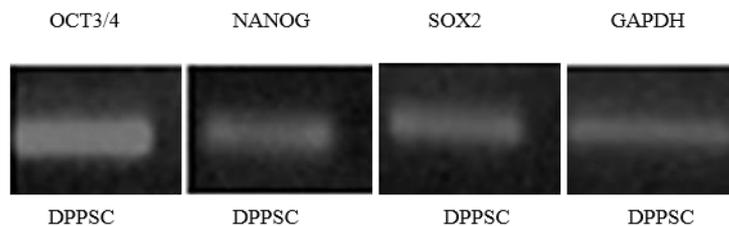


Figura 23. RT-PCR de los marcadores pluripotentes: OCT3/4, NANOG y SOX2 que expresan las DPPSC. GAPDH se utiliza como control “housekeeping”.

7.2.6. Hibridación genética comparativa corta (Short-CGH).

La técnica de Short-CGH se realizó para comprobar la estabilidad genética del cultivo antes de realizar la diferenciación periodontal. Como control se utilizó un varón XY que se hibridó, junto con la muestra 8DD, a 16 metafases de una muestra XXY. El perfil genómico analizado en la muestra 8DD es equilibrado. No se observó ninguna anomalía cromosómica (n=16, 46, XY) ya que no hay desviaciones entre los cromosomas de la muestra y el control, únicamente se observa la pérdida del cromosoma X, indicando que se trata de una muestra de sexo masculino (XY) (Fig. 24).

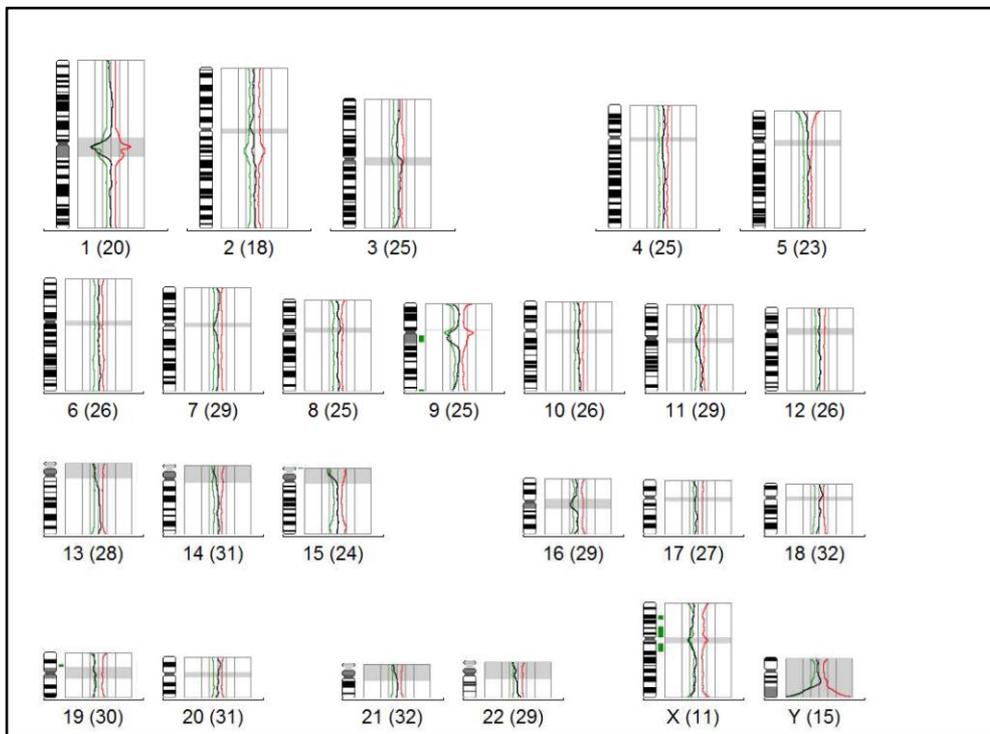


Figura 24. Short-CGH del clon 8DD de las DPPSC indiferenciadas a P4.

7.3. Diferenciación de las DPPSC a tejido periodontal

7.3.1. Morfología celular a lo largo de la diferenciación.

Se observaron las DPPSC cultivadas en el medio de cultivo (medio DPPSC) hasta fase 4 mediante el microscopio óptico (Fig. 25A). Al principio de la diferenciación, se observan células pequeñas a una confluencia baja. Durante la diferenciación periodontal 3D estas células se cultivaron en medio osteogénico durante 21 días encima de raíces

dentales (Fig. 25 B-D). Durante este tiempo las células se fueron alargando, y la confluencia se incrementó hasta cubrir toda la superficie. Al final de la inducción osteogénica se observan células con una morfología típica ósea unidas a las superficies de las raíces dentales (Fig. 25 E).

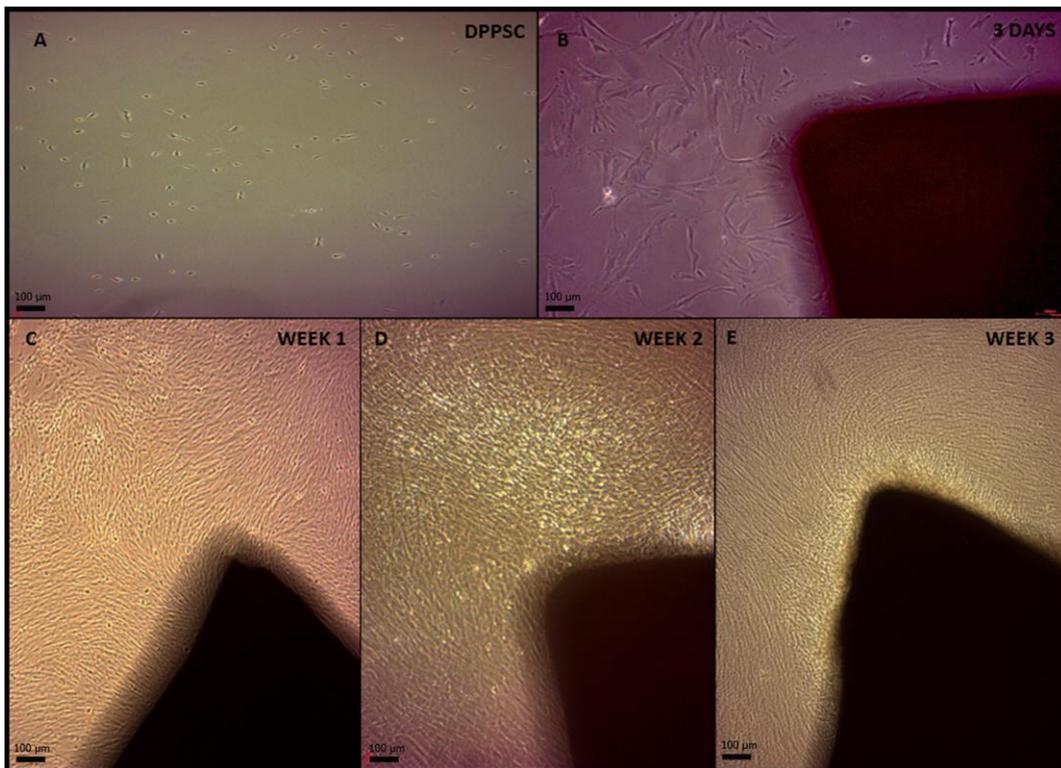


Figura 25. Diferenciación de las DPPSC P4 a ligamento periodontal. A: Morfología de las DPPSC durante cultivo en medio DPPSC. B, C, D, E: Morfología celular de las DPPSC a diferentes momentos (3 días, 1, 2, y 3 semanas) de la diferenciación periodontal usando el medio osteogénico.

7.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Después de cultivar las DPPSC *in vitro* durante 21 días, las matrices se analizaron al microscopio electrónico de barrido (SEM). Las imágenes de las raíces a diferentes aumentos (5000X, 15000X y 30000X) mostraron una gran densidad de masa celular encima de las superficies dentales para todas las muestras de DPPSC (Fig. 26 A1, A2, A3), indicando la capacidad de las células para adherirse y crecer sobre esa superficie. Después de 3 semanas de diferenciación, el análisis de SEM permitió observar la integración de fibras de colágeno de las matrices dentales. Se observaron algunos vasos sanguíneos y algunos cementoblastos en las muestras del grupo de DPPSC, comparando

con el grupo control positivo (Fig. 26 B1, B2, B3), donde los componentes del ligamento periodontal de un diente erupcionado se asemejaban a las muestras del experimento de las DPPSC. Por el contrario, en el control negativo (Fig. 26 C1, C2, C3) no se observó la presencia de células u otro tejido.

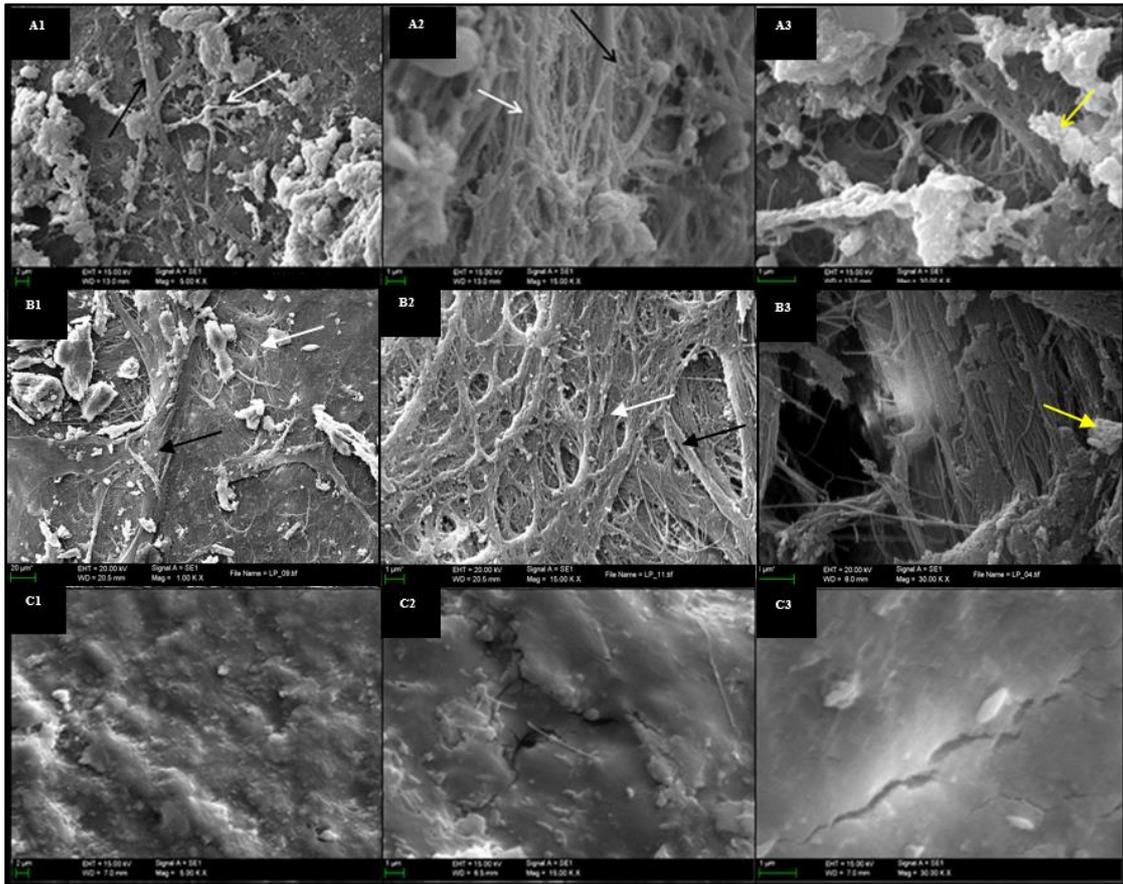


Figura 26. Imágenes de SEM de la diferenciación 3D a tejido periodontal de las DPPSC en P4 utilizando las raíces dentales humanas como matriz, después de 21 días. El grupo DPPSC (A1, A2, A3), el grupo control positivo (B1, B2, B3) y el grupo control negativo (C1, C2, C3) a diferentes aumentos (5000X, 15000X y 30000X) sobre las raíces dentales humanas. Después de 3 semanas de diferenciación se observaron en las muestras de DPPSC (A1, A2, A3) fibras de colágeno (flechas blancas), algunos vasos sanguíneos (flechas negras), tejido fibroso y algunas células con morfología cementoblástica (flechas amarillas); tejidos similares a los encontrados también en el grupo control positivo (B1, B2, B3), que representa el ligamento periodontal de un diente erupcionado. En el grupo control negativo (C1, C2, C3) no se observó la presencia de células o tejidos.

Las imágenes de SEM de las muestras de la diferenciación 3D (Fig. 27) después de 21 días, a un aumento de 5000X, revela una buena adhesión de las células a la superficie de los dientes, la formación de una red entrelazada de fibras de colágeno y la presencia de algunas células similares a cementoblastos.

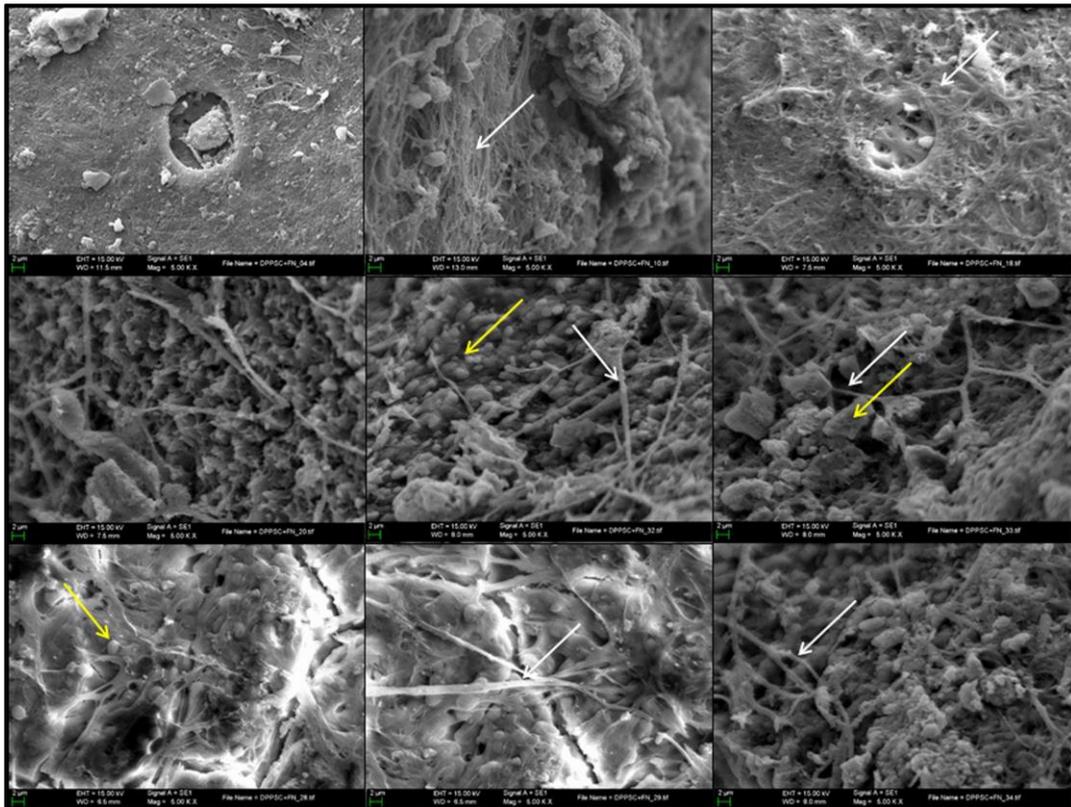


Figura 27. Imágenes de SEM de la diferenciación 3D de las DPPSC a un aumento de 5000X. Después de 21 días de diferenciación se observa una red entrelazada de fibras de colágeno (flechas blancas) y algunas células similares a cementoblastos (flechas amarillas).

7.3.3. Análisis histológico.

Con el fin de visualizar la formación temprana de grupos de células se realizaron las tinciones: tricrómica (Fig. 28 A1, A2, A3); Azul alcian (Fig. 28 B1, B2, B3) y Hematoxilina-eosina (H&E) (Fig. 28 C1, C2, C3). En los cortes histológicos del grupo de las DPPSC (Fig. 28 A2-3; B2-3; C2-3) se observó la formación de fibras de colágeno insertadas perpendicular al cemento, pareciéndose a las fibras de Sharpey en comparación al grupo control negativo (Fig. 28 A1, B1, C1), donde no se observan estas

fibras. A mayor aumento (Fig. 28 A3, B3, C3) se reveló la homogeneidad de las fibras nuevas de colágeno unidas a las superficies a los 21 días de la diferenciación.

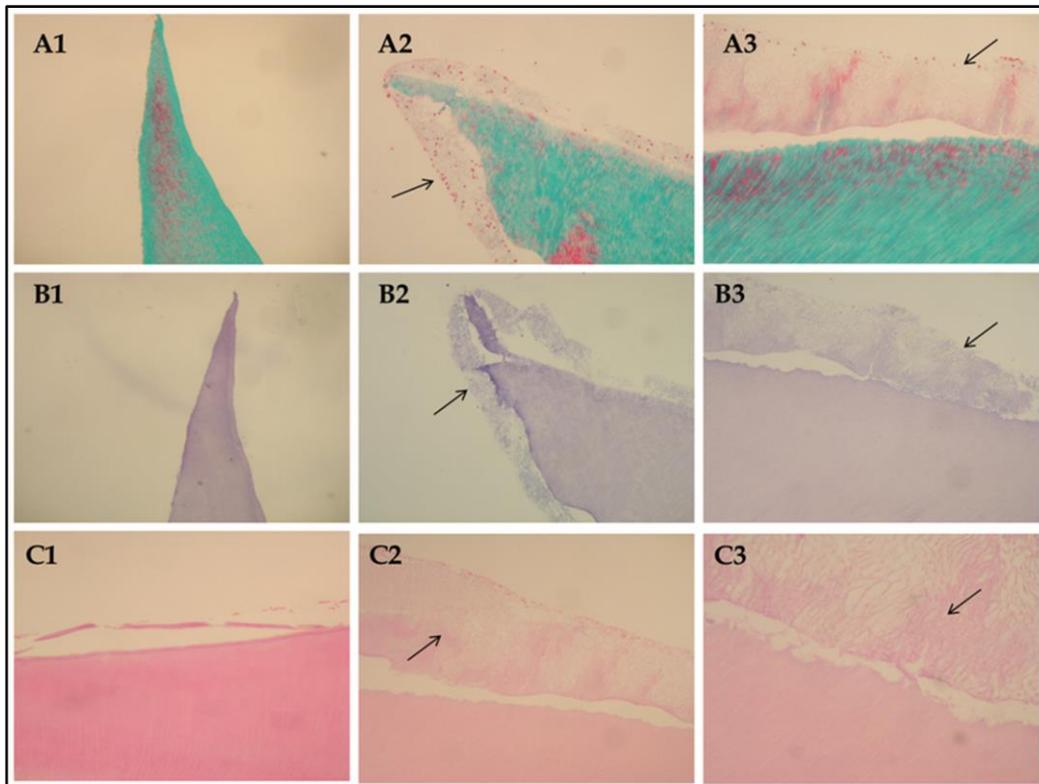


Figura 28. Análisis histológico. Los cortes del grupo de las DPPSC (A2-3; B2-3; C2-3) comparando con los del grupo control (A1, B1, C1) con 3 diferentes tinciones: tinción tricrómica Masson (A1, A2, A3); azul alcian (B1, B2, B3) y Hematoxilina eosina (H&E) (C1, C2, C3). En el grupo de las DPPSC (A2-3; B2-3; C2-3) se observaron la formación de fibras de colágeno (flechas negras) insertadas perpendicular al cemento como tejido, y pareciéndose a las fibras de Sharpey comparando al grupo control (A1, B1, C1). En el grupo control (A1, B1, C1) las imágenes se tomaron a un aumento de 10X, mientras que en el grupo de las DPPSC las imágenes se tomaron a aumentos 40X (A2, B2, C2) y 100X (A3, B3, C3).

7.3.4. Análisis de los resultados mediante RT-PCR.

Se utilizó la RT-PCR para detectar la expresión del ARNm de las DPPSC de marcadores óseos y periodontales de los días 7, 14 y 21 de la diferenciación periodontal, y se confirmó el estado de diferenciación de las células. Se analizó la expresión de diferentes marcadores (ALP, OC, PLAP-1, COL I, COL III, BGN, POSTN, S100A4). En la Figura 29 se muestran los niveles de expresión génica de estos marcadores entre los 5 grupos (DPPSC, DPPSC diferenciadas en 2D, DPPSC diferenciadas en 3D en la

primera semana, segunda semana y tercera semana de diferenciación). Los resultados mostraron altos niveles de expresión para los marcadores óseos y periodontales desde la primera semana a la tercera semana de diferenciación. La expresión de estos marcadores fue mayor que en la diferenciación 2D. Sólo el gen Biglycan no se expresó a un alto nivel, ni siquiera en la tercera semana, en comparación con los otros marcadores.

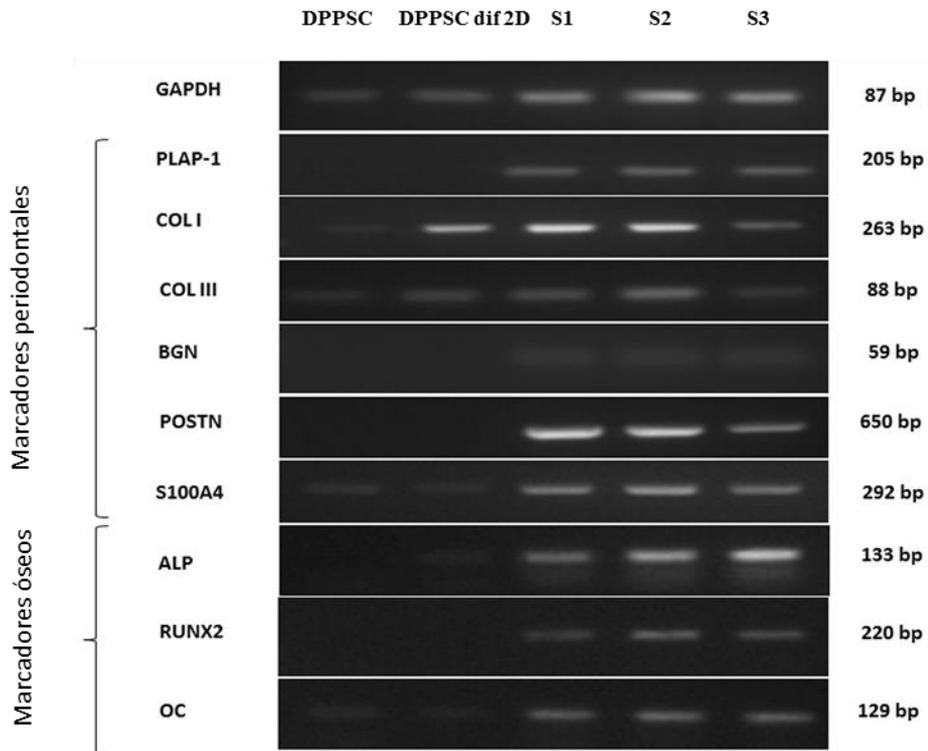


Figura 29. La expresión de genes de los marcadores periodontales y óseos. GAPDH: Gen de referencia o “Housekeeping”; PLAP-1: ligamento periodontal asociado a la proteína-1; COL I: Colágeno 1; COL III: Colágeno 3; BGN: Biglycan; POSTN: Periostin; S100A4: Proteína de unión a calcio A4); ALP: fosfatasa alcalina; RUNX2: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt; OC: osteocalcina. W1 representan las muestras de la primera semana; W2 las muestras de la segunda semana y W3 las muestras de la tercera semana.

8. Discusión

La regeneración de los tejidos dañados por la periodontitis ha sido un objetivo importante en la terapia periodontal. Estrategias de tratamiento actuales para la periodontitis no logran reconstituir por completo y de forma fiable todo el tejido destruido por las enfermedades periodontales. Por lo tanto, la aplicación de la ingeniería de tejidos se considera un enfoque alternativo a las terapias actuales que puede ayudar a aliviar las deficiencias del tratamiento convencional mediante la regeneración de las estructuras dentales funcionales. La ingeniería de tejidos requiere tres componentes esenciales, incluyendo las células progenitoras adecuadas, la matriz de soporte y las moléculas de señalización [64].

Las células utilizadas en este estudio se aislaron de la pulpa dental de los terceros molares. Estas células son fáciles de obtener, ya que no se necesita extraer la pieza dentaria, puramente realizando pulpectomía y *a posteriori* realizar un tratamiento de endodoncia de dicha pieza. La pulpa dental extraída de estos molares cuenta con un gran potencial, por lo que sería interesante almacenarla para futuros usos en terapia celular autóloga. El desarrollo tardío del tercer molar, permite la extracción de una gran cantidad de células progenitoras. El aislamiento y cultivo de las DPPSC a partir de la pulpa de los terceros molares requiere de unas condiciones de cultivo específicas y bastante estrictas [96-98], por lo que es importante caracterizar esta subpoblación antes de realizar los experimentos. Como puede observarse en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión, las DPPSC poseen grandes núcleos alargados, lo que indica su alta capacidad replicativa, característica típica de las células embrionarias. Sin embargo, la expresión del marcador CD13 observado en la inmunofluorescencia nos indica el origen adulto de estas células, por lo tanto, se trata de células adultas con características pluripotentes. La elección de estas células para la realización de esta tesis doctoral se debe a su alta capacidad de diferenciación [96-98] y su alta proliferación, lo que va ligado a la expresión de marcadores de pluripotencia, como Oct-4, Sox-2, SSEA4 o Nanog, en su etapa indiferenciada. Estas características podrían favorecer la regeneración del ligamento periodontal en las raíces de los dientes. Además, la estabilidad genética observada en estas células es requisito indispensable para su futura aplicación clínica.

En este estudio se ha investigado la capacidad de los dientes humanos para actuar como una matriz óptima *in vitro* para la regeneración del tejido periodontal humano. Diferentes modelos de raíces de dientes se han descrito anteriormente en estudios de Dangaria *et al.* [103], Elseed *et al.* [104] y Syed-Picard *et al.* [105], observándose que células madre del ligamento periodontal (PDLSCs) eran capaces de adherirse a las superficies de la raíz de los dientes. Del mismo modo, los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que los cortes de dientes humanos tratados, junto con células madre de la pulpa dental (DPPSC), parecen constituir una buena combinación para la regeneración completa del tejido periodontal, ya que no solamente se observa la adhesión de estas células a la superficie de la raíz de los dientes, sino que, además, se consiguen generar *in vitro* gran parte de los componentes de este tejido, como fibras, células y vasos sanguíneos.

Para poder utilizar las raíces de los dientes como soporte en este estudio, se hizo necesario aplicar un protocolo de limpieza a las mismas, previamente a la realización del cultivo celular. El procedimiento de limpieza que se ha utilizado ya había sido descrito previamente por Galler *et al.* [102] y Syed-Picard *et al.* [105]. Los segmentos de raíz se acondicionaron en una serie de lavados con NaOCl y EDTA, que demostraron anteriormente que mejoraban la diferenciación y la adhesión celular a la pared de la dentina. Igualmente, en nuestro experimento, la adherencia de las DPPSC a las raíces dentales aumentó, creándose una monocapa de células alrededor de la superficie del diente, como puede observarse en las imágenes de microscopía. No obstante, en nuestros experimentos, el tratamiento de la superficie de los dientes humanos estériles con fibronectina mejoraba la adhesión de las DPPSC sobre los dientes, como ya se ha observado en otros estudios [106, 107]. Finalmente, este método de limpieza consigue la esterilidad de los dientes, ya que, previamente al sembrado de las células sobre los mismos, las raíces se habían mantenido incubadas en medio de cultivo durante 4 días a 37 ° C, comprobándose la ausencia de crecimiento microbiano.

Hasta la fecha, no se ha encontrado un marcador específico para identificar los fibroblastos del ligamento periodontal y diferenciarlos de otras células circundantes. Los estudios demostraron que los tejidos periodontales de ligamentos de diferentes pacientes pueden tener diferentes proteínas o genes, como el factor de transcripción 2

relacionado con runt (Runx2) [108], Periostin (POSTN) [109], la proteína de unión a calcio A4 (S100A4) [110], N-cadherina [111], proteína de unión de cemento (CAP) [112], esclerostina [113], fibromodulina [114], la molécula de adhesión neuronal-1 (NCAM-1) [115], proteína de cemento-23 (CP-23) [116], ligamento periodontal asociado a la proteína 1 (PLAP-1/ asporina) [117], específicos ligamento periodontal (PDL) [118], inhibidor de la vía del factor tisular-2 [119], complejo principal de histocompatibilidad-Db [120], y laminina-2/4 y -8/9 [121]. Debido a la no especificidad de un solo marcador, en nuestro estudio hemos utilizado más de un marcador periodontal, incluyendo PLAP-1, BGN, POSTN, S100A4, COL I, COL III; y algunos marcadores óseos, incluyendo la fosfatasa alcalina (ALP) y la osteocalcina (OC).

En el estudio de Yamada *et al.* 2001 [122] investigaron el perfil de expresión de genes activos en el ligamento periodontal humano. El perfil de expresión resultante mostró que el colágeno tipo I y tipo III fueron los genes más abundantes [122], lo que les hace ser considerados en nuestro estudio. El colágeno I es la principal proteína de membrana extracelular (ECM) del ligamento periodontal y proporciona un microambiente ideal para que las PDLs (células madre del ligamento periodontal) se adhieran, proliferen y formen un tejido periodontal [123]. Los ensayos de RT-PCR muestran un aumento de la expresión de este tipo de colágeno durante las dos primeras semanas de la diferenciación y descendiendo en la tercera semana. Este descenso podría estar asociado a un aumento en la mineralización del tejido diferenciado durante la tercera semana, como indica el incremento en la expresión de marcadores óseos como la osteocalcina (OC) o la fosfatasa alcalina (ALP).

Por otro lado, el estudio de Yamada *et al.* [117, 122] también confirmó la expresión de proteína PLAP-1 en células del ligamento periodontal *in vitro*, que se aumentó durante el curso de la citodiferenciación de las células del ligamento periodontal en células formadoras de tejido mineralizado, tales como osteoblastos y cementoblastos. Estas observaciones sugirieron que PLAP-1 está implicada en la formación de la matriz mineralizada en los tejidos periodontales [122], por esto le confiere la posición de ser un buen marcador periodontal. Los resultados de este estudio muestran un aumento en la expresión de PLAP-1 a lo largo de la diferenciación en 3D, mientras que no se observa expresión de la misma durante la diferenciación en 2D. Este hecho podría estar

indicando el papel del diente en la inducción de la diferenciación de las DPPSC hacia tejido periodontal y la mineralización de las mismas, como ya se ha observado que ocurre con otras matrices y otros tipos celulares [124, 125].

Finalmente, POSTN (Periostin) es una proteína de membrana extracelular (ECM) muy importante para la homeostasis periodontal y mantenimiento del espacio periodontal. Su expresión cambia dinámicamente en respuesta a la tensión y compresión del ligamento periodontal, y la pérdida de este marcador resultó en traumatismos dento-alveolares y en las formas iniciales de enfermedad periodontal. POSTN juega un papel importante en la respuesta característica de las células periodontales a los estímulos mecánicos y de superficie [103]. En este sentido, los resultados de esta tesis corroboran esa respuesta a estímulos mecánicos y de superficie, ya que, al igual que ocurría con PLAP-1, POSTN sólo se expresa en la diferenciación en 3D, mientras que no se observa expresión de la misma en la diferenciación en 2D.

Como ya se ha indicado, todas las moléculas que hemos elegido en el presente estudio están ampliamente distribuidas en toda la membrana extracelular periodontal. Las macromoléculas tales como colágenos y proteoglicanos son componentes estructurales vitales de la membrana extracelular periodontal, y están involucrados en el desarrollo y la regeneración del periodonto. Por lo tanto, la presencia de colágenos I y III, POSTN y PLAP-1 en las DPPSC diferenciadas sobre dientes en este estudio indica el éxito en la regeneración del tejido periodontal a partir de las DPPSC.

En nuestro estudio hemos utilizado un medio de diferenciación osteogénico para la regeneración periodontal, ya que el perfil genético del ligamento periodontal es muy parecido al del hueso. Además, de momento no se ha descrito un medio de diferenciación periodontal específico. Otros estudios ya han utilizado este medio osteogénico para la diferenciación periodontal como Flores *et al.*, 2008 [126], y observaron la producción de tejido mineralizado, como el cemento, y la producción de tejidos blandos, como el ligamento periodontal, como pudo demostrarse en el estudio de Dangaria *et al.*, 2009 [123]. Varios estudios preliminares en animales han encontrado que las PDLSC (células madre del ligamento periodontal) pueden formar fibras de colágeno *in vitro* y generar cemento o estructuras del ligamento periodontal. Los

resultados de estos estudios evidenciaron la inserción de nuevas fibras de tejido conectivo en la raíz, caracterizado por haces paralelos. La formación de cemento es esencial para el proceso de curación correcta del periodonto, tanto durante el desarrollo como durante la regeneración de los tejidos periodontales [99, 127-130]. Después de 3 semanas de cultivo de las DPPSC en el medio de osteodiferenciación, las imágenes del SEM mostraron un claro incremento en la cantidad de células, similares a los cementoblastos observados en el control positivo de ligamento periodontal. Además, se observó la formación de una matriz extracelular abundante de fibras de colágeno, lo que sugiere que la diferenciación de las DPPSC a ligamento periodontal fue funcional. Por otra parte, estudios en seres humanos demostraron la proliferación y diferenciación potencial de las PDLSC humanas, y que su actividad podía ser modulada por el microambiente. La diferenciación de las PDLSC es extremadamente sensible a las diferentes condiciones, lo que resulta en diferentes tipos de curación periodontal [131, 132]. Este estudio *in vitro* permite el control del microambiente, lo cual mejoraría la evaluación de la capacidad de regeneración de las DPPSC para formar el tejido periodontal.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis doctoral sugieren que las DPPSC podrían ser una buena fuente de células madre en la regeneración de defectos óseos, y en la restauración del tejido periodontal alrededor de los dientes naturales. Sin embargo, estudios en animales y ensayos clínicos complementarios son necesarios antes de que estas células se puedan aplicar como tratamiento de medicina regenerativa para las enfermedades periodontales.

9. Conclusiones

1. Morfológicamente las DPPSC son células pequeñas, redondas, con un núcleo alargado y escaso citoplasma, observación revelada tanto por el microscopio óptico como por el microscopio electrónico de transmisión.
2. Las DPPSC expresan marcadores de pluripotencia característicos de las células embrionarias, como OCT3/4, NANOG, SOX2 y SSEA 4, tanto a nivel de RNA como de proteína. Sin embargo, se trata de células adultas, como indica la coexpresión con el marcador CD13. Por tanto, son células adultas con características pluripotentes.
3. Los estudios de sCGH indican que las DPPSC mantenidas en cultivo son estables genéticamente y no presentan ninguna anomalía cromosómica a lo largo de los pases.
4. El tratamiento de la superficie de los dientes humanos estériles con fibronectina mejora la adhesión de las DPPSC sobre los dientes.
5. Las DPPSC cultivadas en medio osteogénico sobre dientes humanos estériles son capaces de diferenciarse a tejido óseo, y expresan marcadores óseos, como ALP, RUNX2, OC.
6. Las DPPSC cultivadas en medio osteogénico sobre dientes humanos estériles son capaces de diferenciarse a tejido periodontal, y expresan marcadores periodontales, como COL I, COL III, PLAP, S100A4, POSTN, BGN.
7. Las imágenes de SEM muestran que las estructuras formadas después de la diferenciación de las DPPSC sobre los dientes humanos estériles son muy similares a las observadas en el control positivo de ligamento periodontal. Estas fibras de colágeno se identificaron también histológicamente.

10. Perspectivas de futuro

- Estudiar más en profundidad la expresión de proteínas del tejido obtenido para poder identificar marcadores específicos de este mismo tejido, y así confirmar en todos los niveles la obtención de periodonto a partir de las DPPSC.
- Estudiar la estabilidad genética de este tejido obtenido, requisito imprescindible para poder aplicar estas células a nivel clínico.
- Mejorar el protocolo de diferenciación a tejido periodontal, creando un medio específico de diferenciación periodontal.
- Realizar el mismo estudio con otro tipo celular y compararlo con nuestro estudio, para confirmar estos resultados.
- Buscar otros tratamientos de superficie de los dientes, con objeto de mejorar la adhesión celular sobre el diente humano.
- Estudiar la capacidad de adhesión de las DPPSC en diferentes superficies para escoger la matriz más adecuada para los modelos *in vivo*.
- Desarrollar el protocolo para realizar el estudio en un modelo *in vivo*.

11. Bibliografía

1. Jan Lindhe, N.L., Thorkild Karring, *Periodontologia clinica e implantologia odontologica* Vol. 1. 2009, Buenos Aires: Medica Panamerica.
2. Han, J., et al., *Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration*. Aust Dent J, 2013.
3. Lin, N.H., S. Gronthos, and P.M. Bartold, *Stem cells and future periodontal regeneration*. Periodontol 2000, 2009. **51**: p. 239-51.
4. Lin, N.H., S. Gronthos, and P.M. Bartold, *Stem cells and periodontal regeneration*. Aust Dent J, 2008. **53**(2): p. 108-21.
5. Carranza, N., Takei,, *Periodontología clínica*. 2003. Novena edición: p. 15-63.
6. M., C.G.C., *Monografias - Cemento - Cementogenesis*.
<http://www.monografias.com/trabajos55/el-cemento/Image8667.jpg>, 2007.
7. Periodontitis, D.e.l.g.y.l., 2014: <http://dentistaenmalaga.net/diferencias-entre-la-gingivitis-y-la-periodontitis/>.
8. Beertsen, W., C.A. McCulloch, and J. Sodek, *The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue*. Periodontol 2000, 1997. **13**: p. 20-40.
9. Marchesan, J.T., et al., *Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: a review*. Arch Oral Biol, 2011. **56**(10): p. 933-43.
10. G, C.F.A.N.M., *Periodontologia clinica*. 8 ed1998.
11. Walter, G.R.J.G.H.M.C.D., *Periodoncia*1993.
12. McCulloch, C.A. and S. Bordin, *Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology*. J Periodontal Res, 1991. **26**(3 Pt 1): p. 144-54.
13. Hassell, T.M., *Tissues and cells of the periodontium*. Periodontol 2000, 1993. **3**: p. 9-38.
14. Miron, R.J., et al., *Premature osteoblast clustering by enamel matrix proteins induces osteoblast differentiation through up-regulation of connexin 43 and N-cadherin*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23375.
15. Cho, M.I. and P.R. Garant, *Radioautographic study of [3H]mannose utilization during cementoblast differentiation, formation of acellular cementum, and development of periodontal ligament principal fibers*. Anat Rec, 1989. **223**(2): p. 209-22.
16. Caton, J., et al., *Future dentistry: cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(5): p. 1054-65.

17. Seo, B.M., et al., *Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament*. Lancet, 2004. **364**(9429): p. 149-55.
18. Foster, B.L., *Methods for studying tooth root cementum by light microscopy*. Int J Oral Sci, 2012. **4**(3): p. 119-28.
19. Sanz, M. and M. Quirynen, *Advances in the aetiology of periodontitis. Group A consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology*. J Clin Periodontol, 2005. **32 Suppl 6**: p. 54-6.
20. Bassir, S.H., et al., *Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy*. J Cell Physiol, 2015.
21. Gingivitis, L.P.y.l., 2013:
<http://odontologiaespecializada1.blogspot.com.es/2013/12/la-periodontitis-y-la-gingivitis-muchas.html>.
22. Pihlstrom, B.L., B.S. Michalowicz, and N.W. Johnson, *Periodontal diseases*. Lancet, 2005. **366**(9499): p. 1809-20.
23. Nagatomo, K., et al., *Stem cell properties of human periodontal ligament cells*. J Periodontal Res, 2006. **41**(4): p. 303-10.
24. Periodontitis, E.Q.S.D.L.G.Y.L., 2010:
<http://www.diente.com.mx/periodoncia-encias/%c2%bfen-que-se-diferencian-la-gingivitis-y-la-periodontitis/>.
25. Eke, P.I., et al., *Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010*. J Dent Res, 2012. **91**(10): p. 914-20.
26. Bravo-Perez, M.C.-P., E.; Cortes-Martinicorena, FJ.; Llodra-Calvo, JC., *Encuesta de Salud Oral en España 2005*, in RCOE2006. p. 409-456.
27. Konig, J., B. Holtfreter, and T. Kocher, *Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services--position paper 1*. Eur J Dent Educ, 2010. **14 Suppl 1**: p. 4-24.
28. Kinane, D. and P. Bouchard, *Periodontal diseases and health: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(8 Suppl): p. 333-7.
29. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts*. J Periodontol, 1992. **63**(4 Suppl): p. 322-31.
30. Baelum, V., O. Fejerskov, and F. Manji, *Periodontal diseases in adult Kenyans*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(7): p. 445-52.
31. Marsh, P.D., *Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style*. J Clin Periodontol, 2005. **32 Suppl 6**: p. 7-15.
32. Genco, R.J. and W.S. Borgnakke, *Risk factors for periodontal disease*. Periodontol 2000, 2013. **62**(1): p. 59-94.

33. Albandar, J.M., *Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases*. Periodontol 2000, 2002. **29**: p. 177-206.
34. Nunn, M.E., *Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors*. Periodontol 2000, 2003. **32**: p. 11-23.
35. Bartold, P.M., et al., *Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology*. Periodontol 2000, 2000. **24**: p. 253-69.
36. Dentino, A., et al., *Principles of periodontology*. Periodontol 2000, 2013. **61**(1): p. 16-53.
37. Salvi, G.E., et al., *Risk factors associated with the longevity of multi-rooted teeth. Long-term outcomes after active and supportive periodontal therapy*. J Clin Periodontol, 2014. **41**(7): p. 701-7.
38. Periodontology, T.A.A.o., *Glossary of Periodontal terms*. The American Academy of Periodontology, 2001. **4th edition**.
39. Reynolds, M.A., et al., *Periodontal regeneration - intrabony defects: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop*. J Periodontol, 2015. **86**(2 Suppl): p. S105-7.
40. Saini, R., S. Saini, and S. Sharma, *Therapeutics of stem cells in periodontal regeneration*. J Nat Sci Biol Med, 2011. **2**(1): p. 38-42.
41. Bartold, P.M., S. Shi, and S. Gronthos, *Stem cells and periodontal regeneration*. Periodontol 2000, 2006. **40**: p. 164-72.
42. Garraway, R., et al., *An assessment of the osteoinductive potential of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model*. J Periodontol, 1998. **69**(12): p. 1325-36.
43. Nyman, S., et al., *Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue*. J Clin Periodontol, 1980. **7**(5): p. 394-401.
44. Nyman, S., et al., *New attachment following surgical treatment of human periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1982. **9**(4): p. 290-6.
45. Karring, T., S. Nyman, and J. Lindhe, *Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue*. J Clin Periodontol, 1980. **7**(2): p. 96-105.
46. Haney, J.M., et al., *Periodontal repair in dogs: expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes support wound stabilization and enhance bone regeneration*. J Periodontol, 1993. **64**(9): p. 883-90.
47. Magnusson, I., C. Batich, and B.R. Collins, *New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes*. J Periodontol, 1988. **59**(1): p. 1-6.

48. Kwan, S.K., et al., *The use of autogenous periosteal grafts as barriers for the treatment of intrabony defects in humans.* J Periodontol, 1998. **69**(11): p. 1203-9.
49. Bratthall, G., et al., *Guided tissue regeneration in the treatment of human infrabony defects. Clinical, radiographical and microbiological results: a pilot study.* J Clin Periodontol, 1998. **25**(11 Pt 1): p. 908-14.
50. Karring, T. and P. Cortellini, *Regenerative therapy: furcation defects.* Periodontol 2000, 1999. **19**: p. 115-37.
51. Needleman, I.G., et al., *Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects.* Cochrane Database Syst Rev, 2006(2): p. CD001724.
52. Lynch, S.E., et al., *The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing.* J Periodontol, 1991. **62**(7): p. 458-67.
53. Rutherford, R.B., et al., *Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys.* J Clin Periodontol, 1993. **20**(7): p. 537-44.
54. Hammarstrom, L., *Enamel matrix, cementum development and regeneration.* J Clin Periodontol, 1997. **24**(9 Pt 2): p. 658-68.
55. Hammarstrom, L., L. Heijl, and S. Gestrelus, *Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins.* J Clin Periodontol, 1997. **24**(9 Pt 2): p. 669-77.
56. Esposito, M., et al., *Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects.* Cochrane Database Syst Rev, 2009(4): p. CD003875.
57. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.* Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
58. Bongso, A., *Blastocyst culture for deriving human embryonic stem cells.* Methods Mol Biol, 2006. **331**: p. 13-22.
59. Yao, S., et al., *Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 6907-12.
60. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.* Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
61. Hambiliki, F., et al., *Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells.* J Assist Reprod Genet, 2012. **29**(10): p. 1021-8.
62. Wang, Z., et al., *Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells.* Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 440-54.

63. Liang, J., et al., *Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(6): p. 731-9.
64. Hynes, K., et al., *Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration*. Periodontol 2000, 2012. **59**(1): p. 203-27.
65. Caballero, M.S., *CÉLULAS MADRE: La eterna disputa*, 2014: <https://cienciaenependorf.wordpress.com/category/investigacion/>.
66. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
67. Intini, G., *Future approaches in periodontal regeneration: gene therapy, stem cells, and RNA interference*. Dent Clin North Am, 2010. **54**(1): p. 141-55.
68. Gurdon, J.B. and D.A. Melton, *Nuclear reprogramming in cells*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1811-5.
69. Lee, H., et al., *Induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: an argument for continued research on human embryonic stem cells*. Regen Med, 2009. **4**(5): p. 759-69.
70. Park, I.H., et al., *Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 141-6.
71. Revilla, A., et al., *Current advances in the generation of human iPS cells: implications in cell-based regenerative medicine*. J Tissue Eng Regen Med, 2015.
72. TumeFarfán, L.F., *La reprogramación en la obtención de células madre pluripotentes inducidas* *Reprogramming in obtaining induced pluripotent stem cells*. Revista ECIPerú, 2013. **10**: p. 9-13.
73. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
74. Korbling, M. and Z. Estrov, *Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?* N Engl J Med, 2003. **349**(6): p. 570-82.
75. Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2739-49.
76. Minguell, J.J., A. Erices, and P. Conget, *Mesenchymal stem cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(6): p. 507-20.
77. Bianco, P., et al., *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 180-92.

78. Hasegawa, N., et al., *Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects*. J Periodontol, 2006. **77**(6): p. 1003-7.
79. Kawaguchi, H., et al., *Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells*. J Periodontol, 2004. **75**(9): p. 1281-7.
80. Huang, G.T., S. Gronthos, and S. Shi, *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine*. J Dent Res, 2009. **88**(9): p. 792-806.
81. CiMESO, *Células madre a partir de la pulpa dental*, 2012: <https://doctordipascua.wordpress.com/2012/10/15/celulas-madre-a-partir-de-la-pulpa-dental/>.
82. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
83. Liu, H., S. Gronthos, and S. Shi, *Dental pulp stem cells*. Methods Enzymol, 2006. **419**: p. 99-113.
84. Mayo, V., et al., *Neural crest-derived dental stem cells--where we are and where we are going*. J Dent, 2014. **42**(9): p. 1043-51.
85. Alongi, D.J., et al., *Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential*. Regen Med, 2010. **5**(4): p. 617-31.
86. Gay IC, C.S., MacDougall M., *Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells*. Orthodontic & Craniofacial Research 2007. **10**: p. 149-60.
87. Xu J, W.W., Kapila Y, Lotz J, Kapila S, *Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells*. Stem Cells and Development, 2008. **18**: p. 487-96.
88. Kim, S.H., et al., *Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study*. J Periodontol, 2009. **80**(11): p. 1815-23.
89. Nam, H. and G. Lee, *Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **386**(1): p. 135-9.
90. Zhao, Z., et al., *The regulatory role of a disintegrin and metalloproteinase 28 on the biologic property of human periodontal ligament stem cells*. J Periodontol, 2010. **81**(6): p. 934-44.
91. Miura, M., et al., *SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5807-12.
92. Sonoyama, W., et al., *Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study*. J Endod, 2008. **34**(2): p. 166-71.

93. Morsczeck, C., et al., *Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth*. Matrix Biol, 2005. **24**(2): p. 155-65.
94. Vollner F, D.O., Reichert TE, Morsczeck C., *Differentiation and characterization of dental follicle precursor cells (PCs)*. European cells & Materials, 2007. **14**(S111).
95. Yao, S., et al., *Differentiation of stem cells in the dental follicle*. J Dent Res, 2008. **87**(8): p. 767-71.
96. Atari, M., et al., *Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 14): p. 3343-56.
97. Atari, M., et al., *Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp*. Histol Histopathol, 2011. **26**(8): p. 1057-70.
98. Atari, M., et al., *The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D*. Bone, 2012. **50**(4): p. 930-41.
99. van Dijk, L.J., et al., *Cell-seeding of periodontal ligament fibroblasts. A novel technique to create new attachment. A pilot study*. J Clin Periodontol, 1991. **18**(3): p. 196-9.
100. Nakashima, M. and A. Akamine, *The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics*. J Endod, 2005. **31**(10): p. 711-8.
101. Rius, M., et al., *Detection of unbalanced chromosome segregations in preimplantation genetic diagnosis of translocations by short comparative genomic hybridization*. Fertil Steril, 2011. **96**(1): p. 134-42.
102. Galler, K.M., et al., *Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics*. J Endod, 2011. **37**(11): p. 1536-41.
103. Dangaria, S.J., et al., *Successful periodontal ligament regeneration by periodontal progenitor preseeding on natural tooth root surfaces*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(10): p. 1659-68.
104. Elseed, M.A., et al., *Assessment of bioactive and bio-adhesive therapies to enhance stem cell attachment to root surface dentine*. Int Endod J, 2009. **42**(7): p. 576-83.
105. Syed-Picard, F.N., et al., *Scaffoldless tissue-engineered dental pulp cell constructs for endodontic therapy*. J Dent Res, 2014. **93**(3): p. 250-5.
106. Lee, J.S., et al., *Synergistic effects of a calcium phosphate/fibronectin coating on the adhesion of periodontal ligament stem cells onto decellularized dental root surfaces*. Cell Transplant, 2014.
107. Pitaru, S., et al., *Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces*. J Periodontal Res, 1995. **30**(5): p. 360-8.

108. Saito, Y., et al., *A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2.* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 21): p. 4191-200.
109. Rios HF, M.D., Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, *Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice.* J Periodontol, 2008. **79**(8): p. 1480-90.
110. Duarte, W.R., et al., *Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **255**(2): p. 416-20.
111. Lin, W.L., H.H. Chien, and M.I. Cho, *N-cadherin expression during periodontal ligament cell differentiation in vitro.* J Periodontol, 1999. **70**(9): p. 1039-45.
112. Bar-Kana, I., et al., *Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium.* Eur J Oral Sci, 1998. **106 Suppl 1**: p. 357-64.
113. Jager, A., et al., *Localization of SOST/sclerostin in cementocytes in vivo and in mineralizing periodontal ligament cells in vitro.* J Periodontal Res, 2010. **45**(2): p. 246-54.
114. Lallier, T.E., A. Spencer, and M.M. Fowler, *Transcript profiling of periodontal fibroblasts and osteoblasts.* J Periodontol, 2005. **76**(7): p. 1044-55.
115. Iwata, T., et al., *Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use.* J Clin Periodontol, 2010. **37**(12): p. 1088-99.
116. Alvarez-Perez, M.A., et al., *Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23).* Bone, 2006. **38**(3): p. 409-19.
117. Yamada, S., et al., *PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization.* J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23070-80.
118. Park, J.C., et al., *Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **282**(5): p. 1145-53.
119. Fujita, T., et al., *Identification of marker genes distinguishing human periodontal ligament cells from human mesenchymal stem cells and human gingival fibroblasts.* J Periodontal Res, 2007. **42**(3): p. 283-6.
120. Ohyama, H., et al., *Counter-antigen presentation: fibroblasts produce cytokines by signalling through HLA class II molecules without inducing T-cell proliferation.* Cytokine, 2002. **17**(4): p. 175-81.
121. Ohshima, M., et al., *Laminin expression by human periodontal ligament fibroblasts.* Connect Tissue Res, 2006. **47**(3): p. 149-56.

122. Yamada, S., et al., *Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene*. *Gene*, 2001. **275**(2): p. 279-86.
123. Dangaria, S.J., et al., *Extracellular matrix-mediated differentiation of periodontal progenitor cells*. *Differentiation*, 2009. **78**(2-3): p. 79-90.
124. Ravindran, S., et al., *Odontogenic induction of dental stem cells by extracellular matrix-inspired three-dimensional scaffold*. *Tissue Eng Part A*, 2014. **20**(1-2): p. 92-102.
125. Thibault, R.A., et al., *Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements*. *Tissue Eng Part A*, 2010. **16**(2): p. 431-40.
126. Flores, M.G., et al., *Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique*. *J Periodontal Res*, 2008. **43**(3): p. 364-71.
127. Dogan, A., et al., *Assessment of periodontal healing by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in artificial furcation defects in a dog: a pilot study*. *Tissue Eng*, 2002. **8**(2): p. 273-82.
128. Dogan, A., et al., *Healing of artificial fenestration defects by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in a dog: a preliminary study*. *Tissue Eng*, 2003. **9**(6): p. 1189-96.
129. Akizuki, T., et al., *Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs*. *J Periodontal Res*, 2005. **40**(3): p. 245-51.
130. Wang, W.J., et al., *Identification of multipotent stem cells from adult dog periodontal ligament*. *Eur J Oral Sci*, 2012. **120**(4): p. 303-10.
131. Zheng, W., et al., *Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment*. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(9): p. 2363-71.
132. Chen, S.C., et al., *Location of putative stem cells in human periodontal ligament*. *J Periodontal Res*, 2006. **41**(6): p. 547-53.

12. Anexos

12.1. Anexo 1: Resumen

Introducción

El periodonto está formado por varios tejidos: la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar. El periodonto tiene dos funciones fundamentales: protección e inserción. La función de protección la realizan la encía y el epitelio de unión, mientras que la función de inserción se desempeña a través del ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar.

El ligamento periodontal es un tejido celular altamente vascularizado que rodea la raíz del diente. Se compone por haces de fibras de tejido conectivo fibroso que unen el cemento radicular y la pared del alveolo. Presenta una mayor anchura en el extremo cervical, apical y en dientes funcionales, siendo más estrecho en la parte central y en dientes no funcionales.

Las enfermedades periodontales son un conjunto de entidades patológicas de causa infecciosa y naturaleza inflamatoria que afectan a los tejidos que rodean los dientes. Su etiología es multifactorial. La enfermedad periodontal es un importante problema de salud pública y el desarrollo de terapias efectivas para tratar esta enfermedad debería ser un objetivo principal de la comunidad científica. Dependiendo del grado de afectación y de la susceptibilidad del individuo se distinguen dos tipos de enfermedad periodontal: la gingivitis y la periodontitis. La gingivitis se define como la inflamación de los tejidos gingivales sin que exista pérdida ósea y se trata de la enfermedad periodontal más habitual. Sin embargo, si no se trata a tiempo, la gingivitis puede derivar a periodontitis, una enfermedad menos habitual pero con peores consecuencias, ya que afecta al 90% de la población por encima de los 35 años y es la primera causa de pérdida de dientes en todo el mundo. La periodontitis se caracteriza por la destrucción del tejido periodontal, incluyendo el ligamento periodontal, el cemento, el hueso alveolar y la encía. La importancia de la periodontitis no está en su prevalencia sino en la morbilidad asociada que conlleva la pérdida de dientes, consecuencia final de la enfermedad periodontal destructiva. En general, se estima que la periodontitis provoca el 30-35% de todas las extracciones dentales.

El objetivo principal del tratamiento periodontal es de prevenir la pérdida de inserción y de regenerar los tejidos del soporte periodontal. En los últimos años se han utilizado diferentes técnicas de tratamiento periodontal, métodos destinados a reproducir o reconstituir una parte perdida o dañada de los tejidos de soporte dentario con el objetivo de restaurar la arquitectura y función de estos tejidos. Las técnicas no-quirúrgicas como la terapia mecánica convencional y los procedimientos quirúrgicos y materiales regenerativos, como por ejemplo la regeneración tisular guiada, el uso de injertos óseos, la aplicación de factores de crecimiento y la modulación de factores del huésped, así como la combinación de varias de estas técnicas. En la mayoría de los casos se consigue una curación a través de un epitelio largo de unión, pero no se consigue una reparación del cemento o el hueso.

Por esta razón se plantea la terapia celular como una posibilidad futura para regenerar el periodonto, la cual requiere la implicación de: células madre, moléculas de señalización y la matriz extracelular tridimensional.

Por definición, una célula madre es una célula indiferenciada que es capaz de autorenovarse y de diferenciarse hacia múltiples tipos celulares. Estas dos propiedades, en conjunto, permiten a las células madre proliferar y regenerar los tejidos perdidos o dañados. Las células madre se han podido aislar de una amplia variedad de tejidos y se pueden clasificar en 3 categorías: células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas y células madre adultas.

Las células madre embrionarias (ESC) son células pluripotentes, que se aíslan de la masa celular interna del blastocito. Las ESC tienen la capacidad de proliferar extensamente manteniéndose en un estadio indiferenciado pero, bajo unas condiciones adecuadas, son capaces de diferenciarse en células con características de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Aunque presentan un gran potencial de proliferación y se pueden mantener indefinidamente en cultivo en un estado indiferenciado, su uso en terapias regenerativas está limitado por cuestiones legales y éticas, ya que para su obtención es necesaria la utilización de embriones. Debido a esto, se intentaron conseguir poblaciones de células madre pluripotentes a partir de células somáticas mediante modificación genética, llamadas células madre pluripotentes

inducidas (iPSC). Estas células tienen la ventaja de ser autólogas, al provenir del propio individuo, lo que evitaría los problemas de rechazo. Sin embargo, las manipulaciones genéticas pueden alterar el crecimiento y desarrollo de las células reprogramadas, lo que dificulta la previsibilidad de su comportamiento y, como tal, limita su aplicación terapéutica en la regeneración de tejidos. Como alternativa se aislaron las células madre adultas de prácticamente todo el cuerpo humano: médula ósea, sangre periférica, músculo esquelético, hígado, páncreas, epitelio de la piel y del intestino, pulpa dental, córnea, retina del ojo, sistema nervioso central y corazón. Sin embargo, la obtención de estas células madre resulta laboriosa, en algunos casos y, en otros, las células obtenidas tienen una capacidad de diferenciación limitada.

Nuestro grupo de investigación del *Regenerative Medicine Research Institute* de la UIC Barcelona ha conseguido aislar una nueva población de células madre adultas a partir de la pulpa dental de los terceros molares. El tercer molar es el último diente en desarrollarse y contiene una cantidad óptima de tejido pulpar para la extracción de células madre. Estas características de los terceros molares, junto con la utilización de un protocolo de cultivo específico, permitieron el aislamiento de una nueva población de células madre de la pulpa dental, las DPPSC (dental pulp pluripotent-like stem cells). Estas células, a diferencia de otras células madre adultas, tienen una capacidad regenerativa similar a la de las células madre embrionarias, al expresar marcadores de pluripotencia (Oct4, Nanog, Sox2 y Lin28) y tener la capacidad de diferenciarse a tejidos de las tres capas embrionarias, lo cual las convierte en una fuente muy prometedora de células madre para los estudios de medicina regenerativa.

El **objetivo** de esta tesis doctoral ha sido investigar el potencial regenerativo de las DPPSC para formar tejido periodontal nuevo *in vitro* usando dientes sanos y estériles como soporte. Nuestro estudio pretende reproducir la topografía de la superficie de la raíz natural del diente para favorecer la elongación celular perpendicular, condición óptima para la regeneración de las fibras periodontales.

Resultados

Se aislaron las células DPPSC del tercer molar y se cultivaron hasta pase 4. Se caracterizaron estas células a través de microscopía óptica y de microscopía electrónica

de transmisión (TEM) donde se observaron que las células presentaban un tamaño pequeño, morfología triangular con un núcleo prominente y escaso citoplasma, característica específica de las células embrionarias.

Para comprobar el fenotipo de las DPPSC indiferenciadas del cultivo primario se analizaron las células mediante citometría de flujo. Los resultados evidenciaron expresiones positivas para los marcadores de membrana: CD105 (92,15%), CD29 (99,63%), CD146 (15,54%), CD45 (0,02%) y para los marcadores de pluripotencialidad: OCT3/4 (70,72%) y NANOG (30,18%). Los resultados de la RT-PCR también revelaron la expresión genética positiva para los marcadores de pluripotencia OCT 3/4, NANOG y SOX-2.

Mediante el análisis de inmunofluorescencia se confirmó el fenotipo de las DPPSC indiferenciadas y los resultados mostraron la expresión del marcador de células adultas CD 13 y el marcador de pluripotencia SSEA4.

Para comprobar la estabilidad genética del cultivo antes de realizar la diferenciación periodontal se realizó la hibridación genética comparativa corta. El perfil genómico analizado en la muestra 8DD fue equilibrado y no se observó ninguna anomalía cromosómica.

Después de la caracterización de nuestras células DPPSC se realizó la diferenciación de las DPPSC a tejido periodontal. El experimento consistía en sembrar las células DPPSC encima de los dientes sanos y estériles, tratados previamente con FN, y mantenerlas en cultivo durante 21 días en medio osteogénico. En total se sembraron 5 placas, 3 de las cuales (a razón de una por semana) fueron utilizadas para aislamiento de RNA. De las 2 restantes, una se destinó al análisis del SEM y la otra al examen histológico.

Con las muestras obtenidas cada semana, se realizaron las pertinentes RT-PCRs. Se analizó la expresión de diferentes marcadores (ALP, OC, PLAP-1, COL I, COL III, BGN, POSTN, S100A4) entre los 5 grupos (DPPSC, DPPSC diferenciadas en 2D, DPPSC diferenciadas en 3D en la primera semana, segunda semana y tercera semana de diferenciación). Los resultados mostraron altos niveles de expresión para los marcadores óseos y periodontales desde la primera semana a la tercera semana de

diferenciación. La expresión de estos marcadores fue mayor que en la diferenciación 2D.

Después de cultivar las DPPSC *in vitro* durante 21 días, las matrices se analizaron al microscopio electrónico de barrido (SEM). Las imágenes de las raíces a diferentes aumentos (5000X, 15000X y 30000X) mostraron una gran densidad de masa celular encima de las superficies dentales para todas las muestras de DPPSC, indicando la capacidad de las células para adherirse y crecer sobre esa superficie. Después de 3 semanas de diferenciación, el análisis de SEM permitió observar la formación de fibras de colágeno de las matrices dentales. Se observaron algunos vasos sanguíneos y algunos cementoblastos en las muestras del grupo de DPPSC, al igual que en el grupo control positivo, que consistía en el ligamento periodontal de un diente erupcionado. Por el contrario, en el control negativo, que consistía en un diente estéril en el que previamente se había eliminado el ligamento periodontal, no se observó la presencia de células u otro tejido.

Con el fin de visualizar la formación de nuevos tejidos se realizaron las tinciones: tricrómica; Azul alcian y Hematoxilina-eosina (H&E). En los cortes histológicos del grupo de las DPPSC se observó la formación de fibras de colágeno insertadas perpendicular al cemento, pareciéndose a las fibras de Sharpey en comparación al grupo control negativo, donde no se observan estas fibras. A mayor aumento se reveló la homogeneidad de las fibras nuevas de colágeno unidas a las superficies a los 21 días de la diferenciación.

Discusión

Las células utilizadas en este estudio se aislaron de la pulpa dental de los terceros molares. El desarrollo tardío del tercer molar, permite la extracción de una gran cantidad de células progenitoras. El aislamiento y cultivo de las DPPSC a partir de la pulpa de los terceros molares requiere de unas condiciones de cultivos específicos y bastante estrictos, por lo que es importante caracterizar esta subpoblación antes de realizar los experimentos.

Las DPPSC poseen grandes núcleos alargados, lo que indica su alta capacidad replicativa, característica típica de las células embrionarias. Sin embargo, la expresión

del marcador CD13 observado en la inmunofluorescencia nos indica el origen adulto de estas células, por lo tanto, se trata de células adultas con características pluripotentes. La elección de estas células para la realización de esta tesis doctoral se debe a su alta capacidad de diferenciación y su alta proliferación, lo que va ligado a la expresión de marcadores de pluripotencia, como Oct-4, Sox-2, SSEA4 o Nanog, en su etapa indiferenciada. Estas características podrían favorecer la regeneración del ligamento periodontal en las raíces de los dientes. Además, la estabilidad genética observada en estas células es requisito indispensable para su futura aplicación clínica.

En este estudio se ha investigado la capacidad de los dientes humanos para actuar como una matriz óptima *in vitro* para la regeneración del tejido periodontal humano. Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que los cortes de dientes humanos tratados, junto con células madre de la pulpa dental (DPPSC), parecen constituir una buena combinación para la regeneración completa del tejido periodontal, ya que no solamente se observa la adhesión de estas células a la superficie de la raíz de los dientes, sino que, además, se consiguen generar *in vitro* gran parte de los componentes de este tejido, como fibras, células y vasos sanguíneos. No obstante el tratamiento de los dientes con la FN mejoró la adhesión de las células a los dientes.

Los estudios demostraron que los tejidos periodontales de ligamentos de diferentes pacientes pueden tener diferentes proteínas o genes. Debido que hasta la fecha, no se ha encontrado un marcador específico para identificar los fibroblastos del ligamento periodontal y diferenciarlos de otras células circundantes en nuestro estudio hemos utilizado más de un marcador periodontal, incluyendo PLAP-1, BGN, POSTN, S100A4, COL I, COL III; y algunos marcadores óseos, incluyendo la fosfatasa alcalina (ALP) y la osteocalcina (OC).

El perfil de expresión del ligamento periodontal mostró que el colágeno tipo I y tipo III fueron los genes más abundantes, lo que les hace ser considerados en nuestro estudio. El colágeno I es la principal proteína de membrana extracelular (ECM) del ligamento periodontal y proporciona un microambiente ideal para que las PDLPs (células madre del ligamento periodontal) se adhieran, proliferen y formen un tejido periodontal. Los ensayos de RT-PCR muestran un aumento de la expresión de este tipo de colágeno

durante las dos primeras semanas de la diferenciación y descendiendo en la tercera semana. Este descenso podría estar asociado a un aumento en la mineralización del tejido diferenciado durante la tercera semana, como indica el incremento en la expresión de marcadores óseos como la osteocalcina (OC) o la fosfatasa alcalina (ALP).

La expresión de proteína PLAP-1 en células del ligamento periodontal *in vitro* está demostrada en algunos artículos y se observó el aumento durante el curso de la citodiferenciación de las células del ligamento periodontal en células formadoras de tejido mineralizado, tales como osteoblastos y cementoblastos. Estas observaciones sugirieron que PLAP-1 está implicada en la formación de la matriz mineralizada en los tejidos periodontales. Los resultados de este estudio muestran un aumento en la expresión de PLAP-1 a lo largo de la diferenciación en 3D, mientras que no se observa expresión de la misma durante la diferenciación en 2D. Este hecho podría estar indicando el papel del diente en la inducción de la diferenciación de las DPPSC hacia tejido periodontal y la mineralización de las mismas, como ya se ha observado que ocurre con otras matrices y otros tipos celulares.

Finalmente, POSTN (Periostin) es una proteína de membrana extracelular (ECM) muy importante para la homeostasis periodontal y mantenimiento del espacio periodontal. Su expresión cambia dinámicamente en respuesta a la tensión y compresión del ligamento periodontal. POSTN juega un papel importante en la respuesta característica de las células periodontales a los estímulos mecánicos y de superficie. En este sentido, los resultados de esta tesis corroboran esa respuesta, ya que, al igual que ocurría con PLAP-1, POSTN sólo se expresa en la diferenciación en 3D, mientras que no se observa expresión de la misma en la diferenciación en 2D.

En nuestro estudio hemos utilizado un medio de diferenciación osteogénico para la regeneración periodontal, ya que el perfil genético del ligamento periodontal es muy parecido al del hueso. Además, de momento no se ha descrito un medio de diferenciación periodontal específico. Después de 3 semanas de cultivo de las DPPSC en el medio de osteodiferenciación, las imágenes del SEM mostraron un claro incremento en la cantidad de células, similares a los cementoblastos observados en el control positivo de ligamento periodontal. Además, se observó la formación de una

matriz extracelular abundante de fibras de colágeno, lo que sugiere que la diferenciación de las DPPSC a ligamento periodontal fue funcional.

Por lo tanto, con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se propone la terapia con DPPSC como un procedimiento alternativo en la medicina regenerativa del ligamento periodontal. Sin embargo, estudios en animales y ensayos clínicos complementarios son necesarios antes de que estas células se puedan aplicar como tratamiento de medicina regenerativa para las enfermedades periodontales.

12.2. Anexo 2: Carta de aprobació del projecte de tesi



Sra. Iulia Emilia Hategan

Benvolguda Sra.

Per la present, li comunico que la Comissió Acadèmica del Doctorat en odontologia, en la seva sessió del **11 de octubre del 2012**, i un cop estudiada la seva sol·licitud ha acordat:

S'acorda admetre a la Sra. Iulia Emilia Hategan al Període de Recerca del Doctorat en Odontologia.

S'acorda aprovar el Projecte de Tesi titulat "Regeneración de tejido periodontal in vitro con células madre pluripotenciales de la pulpa dental (DPPSC) del tercer molar mediante moléculas de adhesión " i nomenar el Dr. Maher Atari Abousi com a Director de la Tesi.

Adicionalment, s'informa que la normativa de la UIC estableix que cal obtenir una avaluació favorable del Comitè d'Ètica en la Recerca, abans de la posada en marxa de la investigació. Haurà d'aportar aquest informe quan l'obtingui.

Aprofito l'avinentsa per saludar-la cordialment,

Dra Montserrat Mercadé i Bellido
Coordinadora Comissió Acadèmica de Doctorat en Odontologia
Facultat d'Odontologia

Universitat Internacional
de Catalunya
Facultat d'Odontologia

Sant Cugat del Vallès, 11 de octubre del 2012

12.3. Anexo 3: Carta de aprobació del estudi para el CER



CARTA APROVACIÓ PROJECTE PEL CER

Codi de l'estudi: BIO-ELB-2012-01
Versió del protocol: 1.1
Data de la versió: 23/11/12
Títol: "Regeneración de tejido periodontal in vitro con células madre pluripotenciales de la pulpa dental (DPPSC) del tercer molar mediante moléculas de adhesión"

Sant Cugat del Vallès, 23 de novembre de 2012

Investigadora: Julia Emilia Hategan

Títol de l'estudi: "Regeneración de tejido periodontal in vitro con células madre pluripotenciales de la pulpa dental (DPPSC) del tercer molar mediante moléculas de adhesión"

Benvolgut(da),

Valorat el projecte presentat, el CER de la Universitat Internacional de Catalunya, considera que, des del punt de vista ètic, reuneix els criteris exigits per aquesta institució i, per tant, ha

RESOLT FAVORABLEMENT

emetre aquest CERTIFICAT D'APROVACIÓ per part del Comitè d'Ètica de la Recerca, per que pugui ser presentat a les instàncies que així ho requereixin.

Em permeto recordar-li que si en el procés d'execució es produís algun canvi significatiu en els seus plantejaments, hauria de ser sotmès novament a la revisió i aprovació del CER.

Atentament,



Dr. Josep Argemí
President CER-UIC

12.4. Anexo 4: Carta de aprobació para nombrar a co-director del estudio

 Universitat
Internacional
de Catalunya | Escola
de Doctorat

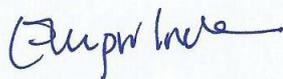
Sra. Iulia Emilia Hategan
Avinguda Diagonal 160, 4-4
08018 Barcelona

Benvolguda Sra. Hategan

Amb la present, li comunico que la Comissió Acadèmica del Doctorat en Ciències de la Salut, en la seva sessió del passat 11 de març, i una vegada estudiada la seva sol·licitud va acordar nomenar la Dra. Sheyla Montori Pina codirectora del projecte de tesi "Regeneración de tejido periodontal in vitro con células madre pluripotenciales de la pulpa dental (DPPSC) del tercer molar mediante moléculas de adhesión".

Per qualsevol qüestió que vulguin comentar no dubtin en posar-se en contacte amb nosaltres.

Atentament,



Empar Lorda
Secretaria Comissió Acadèmica Doctorat en Ciències de la Salut
Escola de Doctorat
Universitat Internacional de Catalunya

Barcelona, 26 de març de 2014