
Tesis doctoral

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y PROPIEDADES
INMUNOMODULADORAS DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DE ORIGEN PULPAR PARA EL
DESARROLLO DE UN MODELO DE REGENERACIÓN
TISULAR: ESTUDIO EXPERIMENTAL IN VITRO

Carolina Inostroza Silva



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



**CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y
PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN
PULPAR PARA EL DESARROLLO DE UN MODELO
DE REGENERACIÓN TISULAR: ESTUDIO
EXPERIMENTAL *IN VITRO***

Tesis Doctoral

Doctorando: Carolina María Inostroza Silva

Director: Dr. Flavio Carrión Arriagada

Tutora: Dra. Nuria Casals Farré

Universitat Internacional de Catalunya

Año 2018

AGRADECIMIENTOS

En este largo pero entretenido caminar de formación profesional es imposible dejar vacía esta página, ya que han sido muchos los que tomaron mi mano y me ayudaron a seguir.

Desde el apoyo diario en lo cotidiano, de mi familia, esposo, mamá, hijos y mi papá desde el más allá, sin ellos no podría haber realizado esta tesis.

No puedo olvidar a mi director de tesis el Dr. Flavio Carrión a quien conozco hace muchos años y no solo hemos compartido en esta tesis, sino que también nos hemos encontrado en las vicisitudes de la vida profesional y personal.

En lo académico quiero destacar el apoyo del Decano de la Facultad de Odontología el Dr. Cristián Bravo y de la Dra Claudia Brizuela quienes ya pasaron por esta experiencia y conocen más que nadie lo que significa compatibilizar docencia, investigación, familia con el desarrollo de una tesis de doctorado.

Además, el hecho de realizar un postgrado fuera de Chile considero que fue una excelente experiencia que me permitió conocer a la UIC y a sus docentes. En realidad la experiencia previa de otros docentes de mi Universidad que siguieron este camino para la realización de un doctorado en la UIC con exitosos resultados me inspiraron a tomar la decisión de seguir sus pasos que espero sean igualmente exitosos.

Gracias totales ;

TABLA DE CONTENIDO

1.0 Abreviaturas	7-10
2.0 Justificación	11-12
3.0 Introducción	13-29
3.1 Células madre	
3.1.1 Células madre mesenquimales	
3.1.2 Características de las MSC	
3.1.3 Propiedades de las MSCs	
3.1.4 Proliferación	
3.1.5 Inmunomodulación	
3.1.6 Fuentes de obtención de MSCs	
3.1.7 MSCs de origen oral y dental	
3.1.8 Células madre mesenquimales derivadas de tejido gingival	
3.1.9 Células madre mesenquimales derivadas de pulpa dental	
3.2 Pulpa dental	
3.2.1 Histología de la pulpa dental	
3.2.2 Patología pulpar	
3.3 Aplicaciones	
4.0 Hipótesis	30
5.0 Objetivos	31
6.0 Metodología	32-45
6.1 Tipo de estudio	
6.2 Lugar de estudio	

- 6.3 Obtención de muestra de pulpar**
- 6.4 Cultivo y expansión de células madre mesenquimales de pulpa dental**
- 6.5 Inmunotipificación**
- 6.6 Tridiferenciación**
- 6.7 Proliferación celular**
- 6.8 Viabilidad celular mediante tinción con Azul Tripán**
- 6.9 Ensayo de unidades formadoras de colonia (UFC)**
- 6.10 Histología de tejidos pulpaes**
- 6.11 Histología de DPSCs**
- 6.12 Análisis cuantitativo nuclear**
- 6.13 Análisis cuantitativo colágeno**
- 6.14 Proliferación de mononucleares de sangre periférica (MSP) humana**
- 6.15 Ensayo de proliferación de linfocitos T-CD3**
- 6.16 Ensayo de inmunosupresión**
- 6.17 Medición de la actividad de Indolamina 2,3 oxigenasa (IDO) de DPSCs.**
- 6.18 Preparación del andamiaje con DPSC en el modelo de regeneración pulpar.**
- 6.19 Ensayo de viabilidad celular**
- 6.20 Modelo de regeneración en bloques de dentina**
- 6.21 Implantación de DPSCs en andamiajes de fibrina-agarosa en dentina**
- 6.22 Análisis estadístico**

7.0 Resultados

46-75

- 7.1 Obtención de muestras de tejido pulpar**
- 7.2 Cultivo y expansión de DPSCs**

7.3	Inmunotipificación	
7.4	Tridiferenciación	
7.5	Proliferación celular de DPSCs	
7.6	Viabilidad celular mediante tinción con Azul Tripán	
7.7	Ensayo de unidades formadoras de colonia (UFC)	
7.8	Histología de tejidos pulpaes	
7.9	Histología de DPSCs	
7.10	Análisis cuantitativo	
7.11	Inmunosupresión de la proliferación de linfocitos	
7.12	Medición de la actividad de Indolamina 2,3 oxigenasa (IDO) de DPSCs	
7.13	Proliferación de DPSCs en andamiaje de fibrina-agarosa	
7.14	Morfología de las DPSCs en el andamiaje de fibrina-agarosa	
7.15	DPSC-S en el andamiaje de fibrina-agarosa 0,25% p/v en dentina.	
8.0	Discusión	76-87
9.0	Conclusiones	88
10.0	Referencias	89-104
11.0	Anexos	105-114

ABREVIATURAS

AAE Sociedad Americana de Endodoncia.

BMSC células madres mesenquimales de la médula ósea.

CD Grupo de Diferenciación.

CD3 Proteína de la familia de inmunoglobulinas que forma parte de receptor de célula T.

CD11b Integrina expresada principalmente en monocitos, granulocitos y macrófagos.

CD14 Co-receptor de (Receptores de tipo Toll) TLR presente principalmente en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.

CD29 Integrina. Se expresa en superficie de MSCs y fibroblastos.

CD34 Glicoproteína involucrada en adhesión célula-célula. Se expresa tempranamente en células de origen hematopoyético.

CD44 Receptor de ácido Hialurónico. Participa en adhesión y contacto celular.

CD45 Glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa. Expresado en superficie de células hematopoyéticas.

CD90 Thymocyte differentiation antigen 1 (THY.1) marcador de superficie de células madre y participa en contacto célula-célula y célula-matriz.

CD105 Glicoproteína de superficie característica de proliferación de células endoteliales.

CER Comité de Ética en Investigación.

CF Zona libre de células o acelular.

CFU unidades formadoras de colonias.

CIBRO Centro de Investigación en Biología y Regeneración Oral.

ColI (Cadena alfa del colágeno de tipo I)

CP Zona central de la pulpa.

CR Zona rica en células o celular.

CTV Cell/Trace Violet.

DFSC células madres mesenquimales del folículo dental.

DMSO Dimetilsulfóxido.

DPSC células madre mesenquimales de la pulpa dentaria.

DPSC-S células madre mesenquimales derivadas de pulpa sana.

DPSC-I células madre mesenquimales de la pulpa enferma o inflamada.

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

FBS Suero fetal bovino.

FITC Flourocianina Isocianato.

G-CSF Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos.

GMSC células madres gingivales derivadas del mesénquima.

GM-CSF Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Monocitos.

H-E Hematoxilina y eosina.

HLA-DR Clase II Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.

HLA-G Antígeno G leucocitario.

HSCs Células Madre Hematopoyéticas.

IDO Indolamina 2,3 dioxigenasa.

IFN Interferón.

IL Interleuquina.

ION Ionomicina.

ISCT Sociedad Internacional de Terapia Celular.

LT-CD3 Linfocitos T marcados con CD3.

α -MEM Medio Mínimo Esencial.

M-T Masson Trichrome.

MHC Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MLR Reacción Mixta Linfocitaria.

MSCs Células Madre Mesenquimales

MSP Mononucleares de sangre periférica.

NK Células Natural Killer.

NO Óxido Nítrico.

OESC: células madres del epitelio oral.

PBS Buffer Salino de Fosfato.

PDLSC células madres mesenquimales del ligamento periodontal.

PE Ficoeritrina.

PECy5 Ficoeritrina Tamdem Cyan 5.

Pen/Strep Penicilina/Streptomicina.

PGE2 Prostaglandina E2.

PHA Phytohaemagglutinin A.

P Preentina.

PSC células madres mesenquimales derivadas del periostio.

p/v peso/volumen.

RPM revoluciones por minuto.

RPMI Roswell Park Memorial Institute medium.

SD Desviación estándar.

SDF-1 Factor derivado de célula de estroma.

SCAP células madres mesenquimales de la papila apical.

SGSC células madres mesenquimales derivadas de las glándulas salivales.

SHED células madres mesenquimales de dientes primarios exfoliados.

TCA ácido tricloro acético.

TGF- β 1 Transforming growth factor.

TGPC células madres mesenquimales derivadas del germen del diente permanente.

Th1/Th2 T helper1/T helper2.

TIMP1 (Inhibidor de metaloproteinasas)

TLR Receptores de tipo Toll.

TNF- α Factor de Necrosis Tumoral.

Tregs Células T Reguladoras.

Triple/Select Tripsina.

TSG-6 Factor de necrosis tumoral inducible 6.

UIC Universidad Internacional de Catalunya.

WST-1 Reactivo de proliferación celular de sales de tetrazolium / formazan.

2.0 JUSTIFICACIÓN

Hoy en día la regeneración tisular mediante el uso de células madre mesenquimales (MSC) es un tema que está en estudio a nivel mundial. La cavidad bucal es un nicho interesante de obtención de MSCs. Las primeras en obtenerse fueron de tejido pulpar sano (DPSC). Sin embargo, hay poca investigación acerca de las características funcionales y las propiedades inmunomoduladoras de las DPSC derivadas de pulpa sana e inflamada. Frente al problema de investigación encontrado, surge la pregunta ¿cómo afecta la inflamación local las propiedades funcionales y la capacidad inmunomoduladora de células madre mesenquimales obtenidas de pulpa dentaria humana? El objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar las características funcionales de las DPSC derivadas de pulpa sana e inflamada y determinar las propiedades inmunomoduladoras de las DPSC, para el desarrollo de un modelo de regeneración tisular.

En esta investigación se utilizaron células madre mesenquimales derivadas de pulpa sana y de pulpas con diagnóstico de pulpitis irreversible; además utilizamos células derivadas de tejido gingival humano (GMSCs). Las DPSCs y las GMSCs fueron caracterizadas según los criterios establecidos por la “International Society for Cell Therapy” (ISCT). Para evaluar la capacidad inmunomoduladora, se midió el efecto de las MSC en la proliferación de los linfocitos (LT-CD3). Para entender el mecanismo involucrado en la inmunomodulación, medimos la enzima indoleamina-2,3 dioxigenasa (IDO) que cataliza la degradación del triptófano en la ruta metabólica a quinurenina, debido a que la inmunosupresión ocurre por la depresión del triptófano, que es un aminoácido esencial, y la acumulación local de metabolitos. La enzima IDO es requerida para la inhibición de células productoras de IFN- γ y junto a la PGE2 bloquea la actividad de las células NK. En el futuro planeamos evaluar la expresión de factores de crecimiento beta 1 (TGFB-1), Prostaglandina E2 (PGE2),

Interleukinas 6 y 10 (IL-6, IL10) y el Factor de Necrosis Tumoral Inducible (TSG-6) entre otros. Además, desarrollamos un modelo de diente para la regeneración tisular en base a un biomaterial natural y DPSCs. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Stata11, utilizando el test de Kruskal Wallis y Graph Pad.

3.0 INTRODUCCIÓN

3.1 Células madre

Las células madre son células indiferenciadas con potencial de proliferación elevado, con capacidad de auto renovarse y de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo (1). Estas células pueden encontrarse en la mayoría de los tejidos, tales como la médula ósea (2), intestinos (3), y piel (4), entre otros. En condiciones normales no se dividen, pero si hay alguna injuria en los sitios donde estas células se encuentran, éstas se diferencian y favorecen el proceso de reparación (5). Las células madre pueden ser clasificadas como embriogénicas y postnatales (adultas) (6), siendo estas últimas las más utilizadas en investigación.

3.1.1 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales o también llamadas estromales multipotentes (MSC), corresponden a un grupo determinado de células indiferenciadas las cuales tienen un elevado potencial proliferativo (1), caracterizándose además por su capacidad de autorenovación y por generar uno o más tipos celulares con funciones específicas (1). Se ha observado que estas células son multipotentes y tienen una morfología fibroblastoide (1,7). Las MSCs tienen la capacidad de originar diferentes estirpes celulares en forma unidireccional, dentro de los que se destacan fibroblastos medulares, células reticulares, osteocitos, adipocitos y condrocitos. Las MSCs provienen de diversos tejidos, entre los que podemos mencionar la médula ósea (8), los músculos, tejido sinovial, placenta, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico, membrana amniótica, tejido adiposo, hígado, pulmón y tejidos dentarios entre otros (9,10). Es importante destacar la plasticidad celular que se traduce en la capacidad de diferenciación en cualquier tipo de célula (mesodérmicas, endodérmicas y ectodérmicas) (11).

3.1.2 Características de las MSCs

En el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, sigla en inglés), propuso los criterios mínimos para definir las MSCs humanas. Las MSC tienen la característica de ser plástico-adherentes cuando se mantienen en cultivo estándar, poseen forma fusiforme alargada similar a fibroblastos y son capaces de proliferar y diferenciarse a células de tejido adiposo, condroblasto y osteoblasto entre otros (7). Fenotípicamente las MSCs se caracterizan por tener una forma alargada similar a fibroblastos, por carecer de marcadores hematopoyéticos, como CD11b (Integrina expresada principalmente en monocitos, granulocitos y macrófagos), CD34 (Glicoproteína involucrada en adhesión célula-célula que se expresa tempranamente en células de origen hematopoyético), CD14 (Co-receptor del receptor del tipo toll presente principalmente en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas), CD45 (Glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa, expresado en superficie de células hematopoyéticas) y por presentar positividad para los marcadores CD29, CD44 (Receptor de ácido hialurónico que participa en adhesión y contacto celular), CD73, CD105, CD90 (12). Estas células además son capaces de sintetizar componentes de la matriz extracelular como fibronectina, versicán y colágeno-1, también producen factores solubles como G-CSF (Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos), GM-CSF (Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos), IL-1, IL-6, IL-7, IL-11 (citoquinas), TGF- β 1 (Transforming growth factor), SDF-1 (Factor derivado de célula de estroma),IDO (Indolamina 2,3 dioxigenasa), PGE2 (Prostaglandina E2), entre otros (13). Estos factores solubles se ven involucrados en procesos inflamatorios y en respuesta a estimulaciones mediadas por quimiotaxis. Las MSCs se alojan en los tejidos dañados modulando la respuesta inflamatoria mediante la expresión de quimioquinas y receptores de citoquinas que les permiten migrar hacia estos sitios dañados.

3.1.3 Propiedades de las MSCs

Las propiedades que presentan las MSCs, podemos encontrar las siguientes:

- Auto renovación: Capacidad que tienen las células para dividirse y dar origen a células idénticas a la célula progenitora (14).
- Multipotencialidad: Capacidad que tiene una célula para dar origen a distintos tipos celulares dentro de un mismo tejido (2, 14).
- Plasticidad: Capacidad que tiene una célula para diferenciarse en células distintas a las de su tejido de origen, incluso si son de distintos origen embrionario (15, 16). Existen varios mecanismos propuestos para explicar la aparente plasticidad de las células madre mesenquimales:
 - La transdiferenciación, describe la conversión de una célula de un linaje tisular a otra célula de un linaje completamente distinto. Esto conlleva a la pérdida de los marcadores tisulares específicos y las funciones del tipo celular original, junto con la adquisición de marcadores y funciones del tipo celular transdiferenciado.
 - La fusión entre una célula madre mesenquimal y una célula de un tejido específico.
 - La existencia de múltiples poblaciones de células madre dentro de un grupo de células.
 - La capacidad de las MSC para desdiferenciarse a un linaje celular más primitivo y menos especializado, y luego, rediferenciarse hacia otro linaje celular (17).

Las células madre mesenquimales poseen un número determinado de divisiones celulares, hasta alcanzar la senescencia de replicación celular (2,18,19).

3.1.4 Proliferación

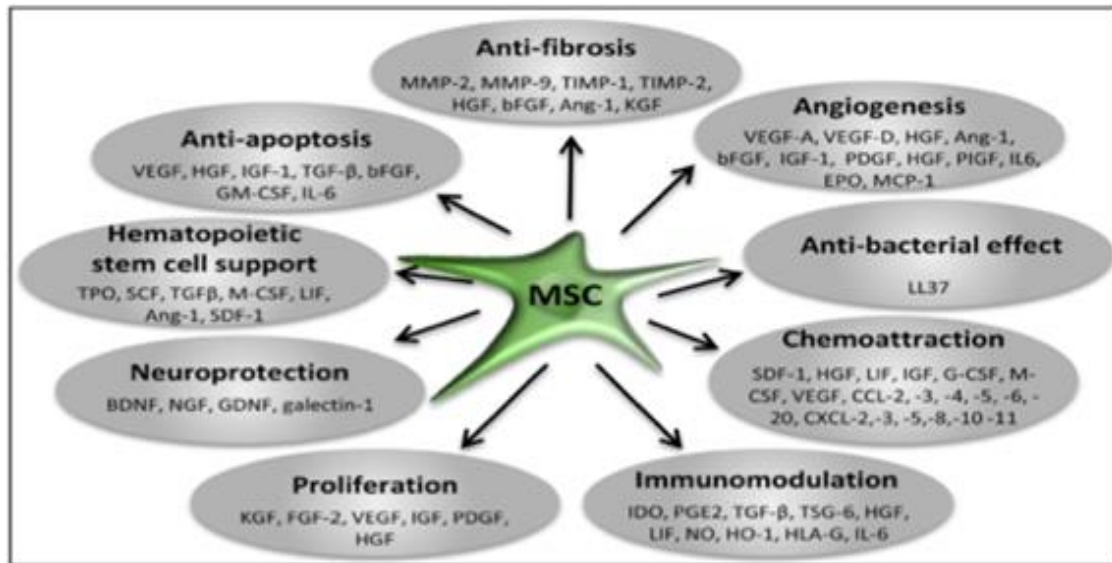
Las células madre se han definido como células con un amplio potencial de auto renovación (20), así como por una elevada capacidad de proliferación y potencial de diferenciación (21). El término proliferación, se refiere a su capacidad de producir una MSC diferenciada mediante una división celular asimétrica. El número de estas se mantendrá constante si únicamente se lleva a cabo la división simétrica, siempre y cuando en cada ciclo una MSCs pueda dar lugar a dos células madre hijas. La división simétrica provee un mecanismo para incrementar la población después de una pérdida de las mismas (22).

3.1.5 Inmunomodulación

Esta propiedad de las MSCs comprende todos aquellos mecanismos utilizados para potenciar o disminuir la respuesta inmunológica. Las MSCs tienen acción sobre los linfocitos T helper y T reguladores, los cuales mantienen el equilibrio del sistema inmune y promueven la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios. Específicamente, inducen la inhibición de linfocitos T de manera eficiente sin llevarlos a apoptosis. El mecanismo inhibitorio por el cual la MSC lleva a cabo este proceso está mediado por contacto directo y secreción de moléculas solubles (23).

En los últimos años se ha demostrado que las MSCs poseen propiedades inmunomoduladoras, sin embargo, a pesar de las investigaciones aún no se han determinado los mecanismos subyacentes (24). En la inmunomodulación las MSC son capaces de afectar a las células innatas y adaptativas del sistema inmune a través de dos mecanismos, uno mediante contacto directo célula a célula (T, B, dendríticas y macrófagos) y el segundo mediante la liberación de factores solubles como prostaglandina E2 (PGE2), factor de crecimiento transformante beta (TGF β), óxido nítrico (NO), indolamina 2.3-

dioxigenasa (IDO), factor de crecimiento hepático (HGF) y el antígeno G leucocitario (HLA-G) entre otros (25). Por otro lado se ha descrito que las MSCs liberan factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas, y hormonas, las que ejercen efectos paracrinos, favoreciendo la migración, proliferación y adhesión potenciando así sus propiedades funcionales (26). Las MSCs tienen efectos inhibitorios o inmunosupresores en la proliferación y activación de los Linfocitos T (LT) (27, 28, 29). Varios reportes resumen las propiedades inmunosupresoras de MSCs adultas de la siguiente manera: 1.-Las MSC adultas suprimen la proliferación de Linfocitos T, la secreción de citoquinas y citotoxicidad y regulan el balance de las estirpes Th1/Th2 (27, 30). 2.-Las MSC regulan la función de las células T Reguladoras (Tregs); aumentan la viabilidad de las células B o inhiben su proliferación y detienen el ciclo celular (31). 3.-Las MSCs afectan a la secreción de anticuerpos y a la producción de moléculas co-estimuladoras de células B. 4.-Las MSC inhiben la maduración, activación y presentación de antígenos de las células dendríticas (32) y además inhiben la activación de células Natural Killer (NK) mediante la Interleucina -2 (IL-2) (25, 33). Las MSC derivadas de pulpa dental (DPSC) aisladas el año 2000 (34) presentan una alta tasa de formación de colonias y son capaces de diferenciarse a odontoblastos, adipocitos, condrocitos, osteoblastos y neuronas (35). Las DPSCs exhiben una mayor tasa de proliferación en comparación a las BMSCs (34, 36, 37). Las DPSCs son células clonogénicas, altamente proliferativas y capaces de regenerar tejidos tales como vasos sanguíneos con una disposición similar a la encontrada en dientes humanos (27, 35, 38). También se ha descrito la capacidad de las DPSC de inhibir la proliferación de LT estimulados, lo que hace que su capacidad inmunomoduladora sea interesante evaluar al momento de un contexto de trasplantes alogénicos de médula ósea (38).



Representación de las Funciones de MSC, imagen tomada del artículo de (Maumus *et al* 2013) (31).

3.1.6 Fuentes de obtención de MSCs

Se ha descrito que las células madre mesenquimales pueden ser encontradas en diversos tejidos de distintos orígenes embrionarios. Dentro de los tejidos de origen mesodérmico en los cuales se han aislado MSCs se pueden mencionar la médula ósea (2), el músculo (39), el tejido adiposo (40), la membrana sinovial (41) y el periostio (42). En los tejidos de origen endodérmico, se han aislado en de sitios como el intestino (3), y de tejidos ectodérmicos como la piel (4), tejido nervioso y de los tejidos dentarios y periodontales (42,43).

3.1.7 MSCs de origen oral y dental

En lo que respecta a los sitios de obtención de MSC intraorales y dentales, Diogenes *et al* en el año 2013 (44), logró identificar 12 potenciales sitios donde sería posible encontrar estas células. Dentro de las más investigadas podemos mencionar las siguientes:

SHED: MSCs de dientes primarios exfoliados (45).

PDLSC: MSCs del ligamento periodontal (46).

SCAP: MSCs de la papila apical (47, 48).

DFSC: MSCs del folículo dental (49).

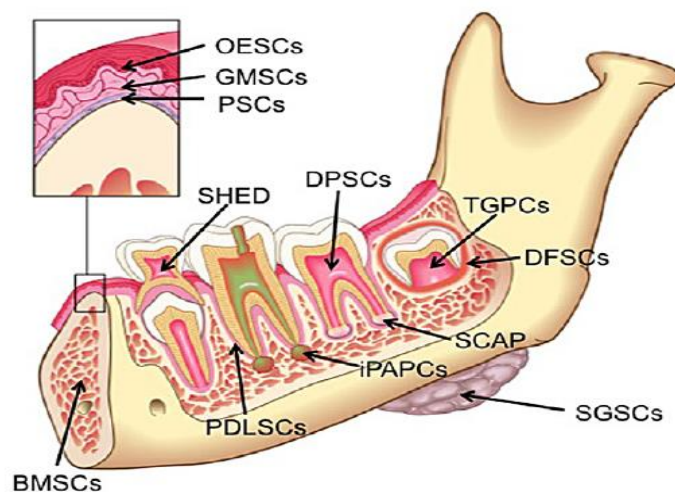
DPSC: MSCs de la pulpa dentaria (34, 35).

BMSC: MSCs de la médula ósea de huesos orofaciales (maxilar y mandíbula) (50).

GMSC: células madre gingivales derivadas del mesénquima (51)

Otras células madre que están siendo estudiadas:

PSC: MSCs derivadas del periostio (PSC), de glándulas salivales (SGSC), de germen de diente permanente (TGPC), del epitelio oral OESC (50).



Dibujo esquemático de los potenciales sitios de obtención de células madre post-natales en la cavidad oral tomada del artículo de Diogenes *et al* 2013 (44).

3.1.8 Células madre mesenquimales derivadas de tejido gingival

Las MSC derivadas de tejido gingival (GMSCs) descubiertas el año 2009, se ha demostrado que poseen capacidad inmunomoduladora (36), también poseen un gran potencial de proliferación y adherencia al plástico y morfología fibroblastoide (52). Además, tienen potencial de diferenciación a varios linajes (52, 53). Son de fácil cultivo y proliferan rápidamente en comparación a las MSC provenientes de médula ósea (BMSC), también muestran un potente efecto inhibitorio en la proliferación de los LT (51). En enfermedades inflamatorias experimentales como colitis, se ha visto favorecido el fenotipo M2 en macrófagos permitiendo la cicatrización de los tejidos (37, 52). TNF-alfa e IFN-gamma actuarían como señales en la intercomunicación entre las células inmunes y las MSC, con un posible papel en la inmunosupresión mediada por MSC (53).

3.1.9 Células madre mesenquimales derivadas de pulpa dental

Las MSC derivadas de pulpa dental (DPSC) aisladas el año 2000 (34), presentan una alta tasa de formación de colonias y son capaces de diferenciarse a odontoblastos, adipocitos, condrocitos, osteoblastos y neuronas (35). Las DPSCs exhiben una mayor tasa de proliferación y viabilidad de DPSCs en los primeros pasajes en comparación a las BMSCs (36, 37). Las DPSCs son células clonogénicas, altamente proliferativas y capaces de regenerar tejidos tales como vasos sanguíneos con una disposición similar a la encontrada en dientes humanos (27, 35, 38). También se ha descrito la capacidad de las DPSC de inhibir la proliferación de LT estimulados, lo que hace que su capacidad inmunomoduladora sea interesante evaluar al momento de un contexto de trasplantes alogénicos de médula ósea (38). Las DPSCs también inducen la apoptosis de LT activados, propiedad importante en el caso de tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias (38).

El mecanismo de inhibición de la proliferación de LT sería mediante la secreción de TGF- β 1 (34, 38). Los receptores de tipo Toll (TLR) presentes ampliamente en células del sistema inmune desencadenan la inmunosupresión de las DPSCs, mediante la expresión de TGF β e IL-6 (34).

La cantidad de tejido pulpar obtenido de los terceros molares es alta, pero el problema radica en la dificultad que dicha obtención implica. La extracción de terceros molares, por lo general, requiere de un procedimiento minucioso y detallado que se realiza frecuentemente en pabellones quirúrgicos. Por esta razón, la obtención de las DPSCs a partir de terceros molares es difícil (16). Otra manera de obtener tejido pulpar y no necesariamente de terceros molares, es por medio de la extracción pulpar al momento de realizar una biopulpectomía, obteniendo así pulpa dentaria con diagnósticos clínicos de pulpa normal y pulpitis. Esta manera de obtención de tejido pulpar, favorecería la obtención de una mayor cantidad de DPSCs y no significaría ningún daño hacia el paciente, ya que la remoción pulpar es una parte de la misma terapia endodóntica, con la única diferencia que se guardaría dicho tejido en vez de ser desechado. La mayoría de los estudios en DPSCs se han realizado con terceros molares extraídos sanos, libres de caries o que han sido extraídos motivos ortodónticos, teniendo así un diagnóstico pulpar de pulpa normal (16). En los últimos años, se han identificado y caracterizado DPSCs obtenidas a partir de pulpa dentaria inflamada es decir, con un diagnóstico de pulpitis irreversible (59,61). En un estudio recolectaron pulpas normales a partir de terceros molares extraídos libres de caries y muestras de pulpa inflamada de dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible (54). Se aislaron y caracterizaron las DPSCs de pulpa inflamada y luego, analizaron su potencial regenerativo en un modelo de estudio *in vivo*. (54, 55) Sus resultados permitieron concluir que fue posible aislar DPSCs de tejido pulpar inflamado, y estas expresaron los marcadores

característicos de células madre mesenquimales de manera similar a las de DPSCs de pulpa normal. En los experimentos *in vitro*, las DPSCs de pulpa inflamada presentaron un menor potencial osteogénico y dentinogénico que las DPSCs de pulpa normal (54). Aún se desconocen los mecanismos moleculares que determinan las alteraciones en las DPSCs derivadas de pulpa inflamada, por lo que es necesario realizar más estudios para determinar si se pueden utilizar como fuente de DPSCs (54). En otro estudio realizado el año 2012 por Pereira et. al., se compararon la morfología, la capacidad de proliferación y potencial de diferenciación de las DPSCs aisladas de pulpa normal y de pulpa inflamada. Sus resultados sugieren que la morfología, la capacidad proliferativa y el potencial de diferenciación entre las DPSCs de pulpa normal e inflamada eran similares (55).

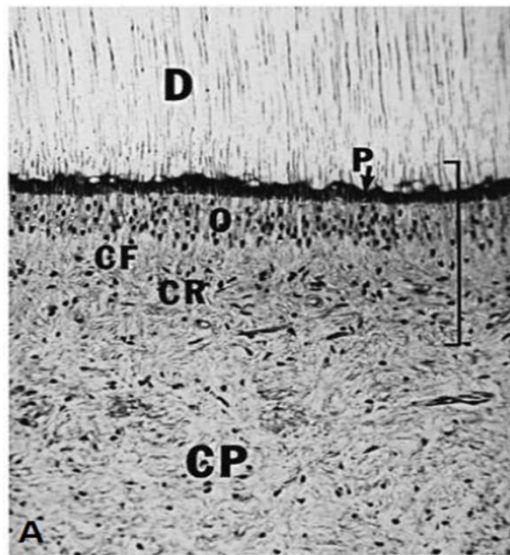
3.2 Pulpa dental

3.2.1 Histología de la pulpa dental

La pulpa dental es un tejido compuesto por tejido conectivo, componentes vasculares, linfáticos y nerviosos que ocupan la zona central (cámara pulpar) y los canales radiculares o conductos de la pieza dentaria (56). de las funciones de la pulpa destacamos la formativa, que se caracteriza por la formación de dentina primaria y secundaria por los odontoblastos en la capa externa del órgano pulpar. Además, la pulpa nutre a la dentina debido a los vasos sanguíneos ubicados bajo las células odontoblásticas. Otras funciones son la sensorial que permite alertar cuando una injuria ocurre y provoca daños en la pieza dentaria, así mismo la respuesta directa o defensiva para detener diversos procesos dañinos que afectan a la pieza dentaria, como por ejemplo, un proceso carioso mediante la formación de dentina terciaria (reparativa o reaccional), o bien, la formación de dentina esclerótica, provocando la obliteración de los túbulos dentinarios. La cámara pulpar está en la corona del diente y refleja la forma externa del esmalte, pero en las piezas posteriores,

podemos observar la presencia de cuernos pulpares, los cuales son una prolongación de la pulpa hacia las cúspides de los molares (57). El canal radicular, es la continuación de la cámara pulpar, pero ubicado en la raíz dentaria (zona apical). La pulpa se ubica por en el centro de la raíz, y sigue su anatomía (58). La pieza dentaria tiene inervación e irrigación, las cuales entran por el foramen apical, que cuando el diente es joven, está abierto. Mediante el proceso de maduración dentario, se va formando el canal radicular principal y los canales radiculares accesorios, resultando muchas veces una intrincada anatomía de los canales, así como la aparición de múltiples foraminas, aparte del foramen apical, provocando la comunicación con el ligamento periodontal no solo en la zona apical de la raíz, sino que también en otros tercios radiculares (59). La pulpa dental contiene un reservorio de células que provienen de células indiferenciadas de la papila dentaria. Estas células indiferenciadas multipotentes son tipo fibroblastos que mantienen la capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares. Bajo la capa de odontoblastos, en la zona rica en células, encontramos dichas células. Además, posee otros tipos celulares, tales como los fibroblastos. La mayor parte de las células de la pulpa son fibroblastos y sintetizan y secretan componentes de la matriz extracelular, tales como colágeno. Por otro lado, observamos la presencia de células defensivas tales como histiocitos y macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, y mastocitos, entre otros. Los odontoblastos son las principales células encargadas de la formación de dentina. Estas células emergen de las células mesenquimales de la papila durante el desarrollo dentario y sintetizan y secretan glicoproteínas. La glicoproteína forma la matriz de la predentina la cual es mineralizable por el odontoblasto, generando así la dentina (60).

Al analizar histológicamente la pulpa dentaria, podemos distinguir las siguientes regiones o zonas: Adyacente al tejido calcificado de la dentina, específicamente a la predentina (P), encontramos la capa odontoblástica (O). Bajo la capa odontoblástica, encontramos la zona libre de células o acelular (CF), en donde hay plexos capilares y pequeñas fibras nerviosas. Más al centro identificamos la zona rica en células o celular (CR), la cual contiene fibroblastos y células madre indiferenciadas y finalmente, observamos la zona central de la pulpa (CP), la cual contiene grandes vasos y nervios (60, 61).



Microfotografía de pulpa dental que muestra dentina (D), predentina (P), capa odontoblástica (O), zona libre de células (CF), zona rica de células (CR), y zona central de la pulpa (CP) tomada de Pashley *et al* 1994 (60).

3.2.2 Patología pulpar

La Sociedad Americana de Endodoncia (AAE) (62), estandarizó los diferentes diagnósticos pulpares y periapicales con el fin de poder entender y favorecer el diálogo entre los diversos endodoncistas a nivel mundial, haciendo uso de solo una terminología, permitiendo una homogenización de los diversos diagnósticos que pueden presentar las piezas dentarias. Los principales diagnósticos a nivel pulpar entregados por la Sociedad Americana de Endodoncia, son los siguientes:

- Pulpa Normal: Diagnóstico clínico en donde la pulpa dental está asintomática y responde normalmente a las pruebas de sensibilidad. Aunque la pulpa dental puede no estar normal a nivel histológico, clínicamente la pulpa normal responde a la prueba de frío, con una duración no mayor a 1 o 2 segundos de retirado el estímulo. No se puede llegar a un diagnóstico sin comparar el diente de interés con un diente sano (diente control), idealmente su homólogo contralateral no afectado.
- Pulpitis Reversible: son hallazgos subjetivos y objetivos que indican que la inflamación pulpar puede resolverse y regresar a la normalidad si se tiene un manejo adecuado de la etiología. El malestar será experimentado cuando un estímulo como el frío o dulce es aplicado sobre el diente y desaparece a los pocos segundos de retirado el estímulo. Dentro de las etiologías más comunes, podemos incluir la exposición dentinaria (sensibilidad dentinaria), caries o restauraciones profundas. No hay cambios radiográficos en la zona periapical del diente afectado y el dolor no es espontáneo. Seguido del tratamiento de la etiología, el diente requiere de evaluaciones futuras para determinar si el estado de pulpitis reversible, volvió a la normalidad (63).

- **Pulpitis Irreversible Sintomática:** son hallazgos subjetivos y objetivos que indican que la pulpa vital inflamada es incapaz de sanar y que el tratamiento endodóntico es el indicado. Podemos encontrar: dolor agudo a los estímulos térmicos, persistente 30 segundos o más después de retirado el estímulo, espontáneo y referido. Algunas veces el dolor se acentúa por cambios posturales, tales como acostarse o inclinarse, y en este caso, los analgésicos son inefectivos. Las etiologías más comunes son caries profundas, grandes restauraciones, o fracturas con exposición pulpar. El diente con pulpitis irreversible sintomática puede ser difícil de diagnosticar porque la inflamación aún no alcanza los tejidos periapicales, haciendo que no duela o presente molestias a la percusión. En estos casos, la historia dental y las pruebas de sensibilidad térmica son la principal herramienta para diagnosticar este estado pulpar. (64)

- **Pulpitis Irreversible Asintomática:** diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos que indican que la pulpa vital inflamada es incapaz de sanar y que el tratamiento endodóntico es el indicado. En esta categoría, podemos encontrar el pólipo pulpar o pulpitis hiperplásica, y la reabsorción radicular interna o endorrizálisis. El pólipo pulpar se da normalmente en niños o en pulpas con una gran irrigación. El tejido pulpar comienza a inflamarse y a formar un epitelio plano pseudoestratificado que empieza a aflorar y a juntarse con las células descamativas de la mucosa, observándose como una verdadera masa al interior del diente. En la endorrizálisis, la pulpa, en vez de reparar ante un trauma o estímulo nocivo crónico de baja intensidad, comienza a fibrosarse o necrosarse, produciendo dentinoclastos que van provocando la reabsorción de la dentina (65).

3.3 Aplicaciones de células madre.

La regeneración tisular implica el reemplazo de tejidos afectados con células idénticas que pueden ser generadas a partir de la estimulación de MSC por diferentes mecanismos moleculares y celulares involucrados en la morfogénesis dental; por ello se buscan diferentes opciones para facilitar la utilización de MSC como tratamiento clínico de enfermedades periodontales y traumas bucales funcionales (21). Dado el potencial de diferenciación de las MSC a otros linajes celulares, así como su fácil obtención, cultivo, manejo y alta tasa de proliferación *in vitro* son consideradas como una poderosa herramienta terapéutica para el tratamiento de patologías caracterizadas por el daño o destrucción de tejidos, como por ejemplo enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco y hematopoyético, entre otros. Se ha descrito que las MSC mejoran la función hematopoyética en el trasplante de células madre; y tratamiento de enfermedades inmunes tales como enfermedad de injerto contra huésped, artritis reumatoide, encefalomiелitis autoinmune experimental, sepsis, pancreatitis aguda, esclerosis múltiple, diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular entre otras (66, 67). Otras investigaciones han reportado que el uso de MSC derivadas de tejido adiposo en conjunto con una fracción vascular del estroma tiene capacidades inmunomoduladoras (68). Otros estudios se enfocaron en inducir la diferenciación de los DPSCs en los condrocitos, mostrando que la estrategia propuesta puede tener un enfoque directo y eficaz para la ingeniería de tejidos con el objetivo de la terapia de las lesiones de cartílago (69). Dentro de las patologías asociadas a la diabetes, se han realizados estudios en neuropatías, mediante el trasplante de DPSC cuyos resultados sugieren que este trasplante y dosificación fue beneficioso para la recuperación de los parámetros neuropáticos en pacientes diabéticos (70).

Para la regeneración de la pulpa dental, se han descrito dos enfoques, uno de ellos consiste en que las células huésped de la papila apical migran hacia el conducto radicular y se diferencian en un tejido de pulpa vascularizado (71). El siguiente enfoque usa las MSC en un material biocompatible en un modelo de diente. El potencial de diferenciación de las MSC funcionaría directamente en el canal radicular para la neoformación de un tejido de pulpa dental (72, 73). En ambos casos, las MSC parecen jugar un papel importante en la regeneración del tejido de la pulpa. Sin embargo, los materiales utilizados en muchos estudios fueron materiales sintéticos (PuramatrixTM y Matrigel^{BD}) los que pueden generar productos de degradación ácida que son citotóxicos para los cultivos celulares (73, 74). Los investigadores en regeneración pulpar habían utilizado el modelo de bloque de dentina y un andamiaje biodegradable sembrado con DPSCs lo que permitió la generación de un tejido similar a la pulpa dental (73). El diseño del biomaterial que utilizamos en este proyecto fue en base a un hidrogel Agarosa VII Sigma® la cual ha sido estudiada desde sus propiedades funcionales hasta mecánicas, y se ha demostrado su capacidad de permitir la diferenciación condrogénica de células madre adultas, entre otras características (75). Además, se generó un modelo heterotípico 3D de mucosa oral artificial y piel basada en fibrina-agarosa con células madre derivadas de la gelatina de Wharton (76). También quisimos incluir un derivado de sangre autólogo, plasma rico en plaquetas (PRP) que es una fuente rica de factores de crecimiento concentrados, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1, TGF- β 2), insulina (IGF-1, IGF-2) y factor de crecimiento endotelial vascular que actúa como un factor estimulante para la proliferación de condrocitos *in vitro* (77, 78).

En base a todos los antecedentes presentados, el objetivo general de este estudio fue analizar las características funcionales y las propiedades inmunomoduladoras de las células

madre mesenquimales provenientes de pulpa dentaria humana para el desarrollo de un modelo de regeneración tisular basado en un bloque de dentina con DPSCs en un andamiaje de fibrina-agarosa. La relevancia de este estudio es presentar los fundamentos de una nueva opción para la práctica clínica en la futura aplicación potencial de las DPSC en medicina regenerativa.

4.0 HIPÓTESIS

H0: No existen diferencias en la proliferación, viabilidad y capacidad inmunomoduladora de las MSCs obtenidas a partir de pulpas dentarias humanas con diagnóstico de pulpa normal y de pulpitis irreversible.

H1: Existen diferencias en la proliferación, viabilidad y capacidad inmunomoduladora de MSCs obtenidas a partir de pulpas dentarias humanas con diagnóstico de pulpa normal y de pulpitis irreversible

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar las características funcionales y las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs provenientes de pulpa dentaria humana para el desarrollo de un modelo regeneración tisular.

5.2 Objetivos específicos

1. Comparar las características funcionales de las DPSCs derivadas de pulpa sana e inflamada.
2. Evaluar la capacidad inmunomoduladora de las DPSCs (sanas e inflamadas) sobre la proliferación de los linfocitos T-CD3.
3. Desarrollar un tejido artificial por técnicas de ingeniería tisular y analizar el comportamiento de las DPSCs en un biomaterial natural.

6.0 METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio

Este estudio es analítico y observacional. Experimental *in vitro*.

6.2 Lugar de estudio

Este estudio se realizó en el Centro de Investigación en Biología y Regeneración Oral (CIBRO), de la Facultad de Odontología de la Universidad de los Andes, ubicada en Av. Mons. Álvaro del Portillo n° 12455. Las Condes, Santiago, Chile.

6.3 Obtención de muestra pulpar

Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Oriente, Santiago de Chile (03-2017). Además fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación (CER) de la Universidad Internacional de Catalunya (UIC). Código del estudio CBAS 2018-06. Considerando los principios éticos de la declaración de Helsinki, los donantes que aceptaron participar firmaron un consentimiento informado. Las muestras de pulpa se obtuvieron de pacientes sanos hombres y mujeres, no fumadores entre 22-45 años de edad que asistieron al Centro Odontológico de la Universidad de los Andes durante marzo a mayo del 2017. Las pulpas sanas fueron obtenidas de 5 pacientes que donaron los terceros molares o premolares libres de caries extraídos por indicación ortodóncica y las encías fueron obtenidas de la zona del triángulo retro molar, durante el procedimiento de exodoncia. Cada donante se enjuagó con 5 ml de Clorhexidina Lacer ® al 0,12% por 1 minuto. Luego, se anestesió el diente con 2 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% con epinefrina 1: 80,000 (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Francia). Una vez comprobado el efecto anestésico, se colocó un campo estéril y se realizó la exodoncia. Una vez avulsionado el diente, se colocó en PBS1X (Corning®) con Penicilina/Streptomicina al 1% (Pen/Strep Corning®), para ser trasladado al Centro de Investigación en Biología y

Regeneración Oral de la Universidad de los Andes (CIBRO). Los dientes se trabajaron en la campana de flujo laminar (ZHJH-C1106C, Zhicheng). El diente se puso en una placa de Petri para cortarlo transversalmente con una fresa Endo-Z (Av 152 Maillefer®) a nivel del límite amelocementario, dejando expuesta la cámara pulpar y la pulpa se extrajo con un extractor pulpar VDW®. Las pulpas dentales inflamadas fueron obtenidas de 5 pacientes con diagnóstico de pulpitis irreversible que requerían tratamiento endodóntico para remover el tejido pulpar. Los especialistas en endodoncia según práctica clínica, incluyendo el historial de dolor espontáneo y el dolor persistente ante el estímulo frío determinaron el diagnóstico de acuerdo al consenso establecido por la AAE. La vitalidad de la pulpa se confirmó con el acceso endodóntico y aquellos tejidos de pulpa necrotizados fueron excluidos. En los casos de biopulpectomía las pulpas inflamadas se obtuvieron con un extractor pulpar VDW®estéril de tamaño adecuado para cada caso. Las muestras de tejido fresco se colocaron en medios de transporte fríos que consistió en PBS1X (Corning®) con Penicilina/Streptomicina (Pen/Strep Corning ®) al 1% y se enviaron inmediatamente al Centro de Investigación en Biología y Regeneración Oral (CIBRO) en la Universidad, para su procesamiento. Las imágenes fotográficas macroscópicas fueron capturadas con una cámara Nikon D5000.

6.4 Cultivo y expansión de células madre mesenquimales de pulpa dental.

Todos los explantes obtenidos se colocaron en flasks de 12,5 cm² (Falcon ®) con medio de cultivo completo Alpha MEM (Corning®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Hyclone®), 1% de Anfotericina B (Corning ®) y 1% de Pen/Strep (Corning®) en una incubadora de cultivo Sanyo ® a 37°C, con aire humidificado y 5% de CO₂. Las muestras fueron lavadas cada 3 días con PBS1X (Corning®) y además se realizó el cambio de medio. A las 2 semanas de cultivo el explante fue retirado del flask y se

observaron las primeras células. Los explantes de las DPSC se conservaron en Formalina tamponada al 10% (Sigma ®) hasta su posterior procesamiento. Las células se cultivaron durante 3 semanas hasta una confluencia de 80%, se tripsinizaron con 1 ml de Tripsina (Triple/Select, Corning®), a 37°C, las MSCs se resuspendieron en medio completo y se cultivaron hasta el pasaje 3 a 6, para la caracterización funcional. El monitoreo de los cultivos se realizó en un microscopio óptico invertido Olympus CKX41 (Tokio, Japón) y las fotografías fueron capturadas con la cámara digital incorporada y procesadas con el software Micrometrics SE Premium. Las GMSCs que se utilizaron en esta tesis doctoral fueron caracterizadas previamente por el mismo equipo de investigación (79).

6.5 Inmunotipificación

3.5×10^6 MSC, se separaron en tubos de citometría y se incubaron con el anticuerpo según el panel aplicado CD90, CD105, CD73, CD45, CD34, CD19, CD11b y HLADR para las DPSCs. Todos los anticuerpos monoclonales fueron obtenidos de BD *Bioscience*®. Las células se adquirieron en el citómetro de flujo (BD FACSCanto II), los datos fueron analizados mediante el software BD FACS Diva™.

6.6 Tridiferenciación

Para la diferenciación osteogénica se sembraron 30.000 cel/cm² en los pocillos de la placa de 9,5cm² (SPL®) con medio de cultivo completo a 37°C y 5% de CO₂. Al llegar a la confluencia del 70% se agregaron 300µl de medio de diferenciación osteogénico (StemPro®) y medio completo para los pocillos de los controles negativos. Se realizó cambio de medio cada 4 días y a los 21 días las células fueron teñidas con Tinción Von-Kossa (Abcam®). En la diferenciación condrogénica, se cultivaron 30.000 células en 10µL de medio completo en la placa de 9,5cm² (SPL®) y con 300µl de medio de diferenciación Condrogénico (StemPro®) y sin medio de diferenciación en los controles negativos. El

cambio de medio fue cada 4 días y a los 14 días las células fueron teñidas con Tinción Safranina O (Sigma®). En la diferenciación adipogénica se ocuparon 30.000 cel/cm² las cuales se sembraron en placa de 9,5cm² (SPL®), al alcanzar una confluencia del 70% se agregaron 300µl de medio de diferenciación adipogénico (StemPro®) y a los controles negativos se les agregó medio completo, realizando el cambio de medio de cultivo cada 4 días. A los 21 días las células fueron teñidas con Oil red (Sigma®). El registro se realizó en un microscopio óptico invertido Olympus® CKX41 (Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas por la cámara digital incorporada y procesadas con el software Micrometrics SE Premium.

6.7 Proliferación celular

En la placa de 96 pocillos se sembraron 10.000 células, a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas y se agregaron 10µl del reactivo colorimétrico WST-1 Proliferation assay (Roche®). El ensayo fue medido a una longitud de onda de 450nm en un lector de ELISA Rayto 2100C®. Las mediciones se realizaron en triplicado a cada tiempo.

6.8 Viabilidad celular mediante tinción con Azul Tripán

La viabilidad se determinó por la técnica de exclusión vital, o sea, exclusión de las células no teñidas por el azul de tripán (T8154 Sigma ®). En este experimento, las 5 muestras de cada grupo experimental de DPSCs derivadas de pulpas dentales con diagnóstico de pulpa sana y con diagnóstico de pulpitis irreversible fueron tripsinizadas de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Para realizar la tinción, en un tubo eppendorf se mezclaron 50µl de células madre mesenquimales y 50µl de Azul Tripán al 0,4% (T8154 Sigma ®). De esta mezcla, se tomaron 10µl y se colocaron en la cámara de Neubauer Marienfeld®. Mediante observación en un microscopio óptico de luz invertido con contraste de fase Olympus CKX41, fueron contadas las células viables, las cuales se

observaron redondas, brillantes y no coloreadas, como también las células no viables, Este experimento fue realizado en duplicado. La viabilidad celular se expresó como porcentaje aplicando la ecuación:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

6.9 Ensayo de unidades formadoras de colonia (UFC)

Para realizar el ensayo de UFC, 150 DPSCs en pasajes tempranos entre 2 y 3 se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos (SPL®) suplementado con 2,5ml de medio de cultivo completo y fueron incubadas durante 14 días a 37°C y 5% of CO₂. El medio de cultivo fue removido y las UFC fueron fijadas con 500µl of alcohol:acetona (Lablisan®#1014) durante 2 minutos y posteriormente teñidos con cristal violeta (Lablisan® #1010). Cada ensayo por paciente se realizó en triplicado y las placas fueron fotografiadas una cámara digital Panasonic® Lumix DMC-FZ100 en una posición fija y sin zoom. El número de UFC fue contabilizado por el operador, sin embargo las colonias de tamaño menor a 2mm o UFC débilmente teñidas se descartaron del conteo. El porcentaje de eficiencia de formación de colonias se calculó de la siguiente manera (%EUFC):

$$\% \text{EUFC} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ total UFC} \times 100)}{150} \quad 150 = \text{N}^{\circ} \text{ de DPSC sembradas.}$$

6.10 Histología de tejidos pulpaes

La morfología celular se examinó mediante cortes histológicos Una vez que proliferaron las DPSCs, el tejido de pulpa dental sano e inflamado se eliminó y se fijó en formalina tamponada al 10% (Sigma®). Los tejidos fijos se deshidrataron en un gradiente de alcoholes (PureView®) y luego se incluyeron en parafina. Se obtuvieron secciones de 3 µm de espesor en el micrótopo (Sakura®) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E) (Sigma Aldrich®), Masson Trichrome (M-T) (Sigma Aldrich®) y se montaron con

Entellan R (Merck Millipore®). Además, las DPSCs se sembraron en placas de cultivo de 9,5 cm² (SPL®) se fijaron en alcohol 70 ° C (PureView®) y luego se realizó la tinción con H-E. Las imágenes fueron capturadas con el microscopio óptico de contraste de fase, invertido, Olympus® CKX41 (Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas por una cámara digital (Olympus® U-TV0.5XC-3) y procesadas con el software Micrometrics SE Premium.

6.11 Histología de DPSCs

Posterior a la tinción de las células madre con hematoxilina-eosina, se tomaron 4 fotos por pocillo con magnificación 10X. Se evaluó mediante microscopio óptico invertido (Olympus® CKX41) donde los resultados obtenidos fueron capturados por registro fotográfico (Olympus® U-TV0.5XC-3) y software Micrometrics® SE Premium. Se analizó de manera cualitativa y cuantitativa la morfología celular. Se realizó un conteo de núcleos, de ambos cultivos en donde se graficaron el promedio de estos con su respectiva desviación estándar.

6.12 Análisis cuantitativo nuclear

En los siguientes esquemas se indica el análisis cuantitativo mediante el uso del software Image J para el conteo de núcleos.

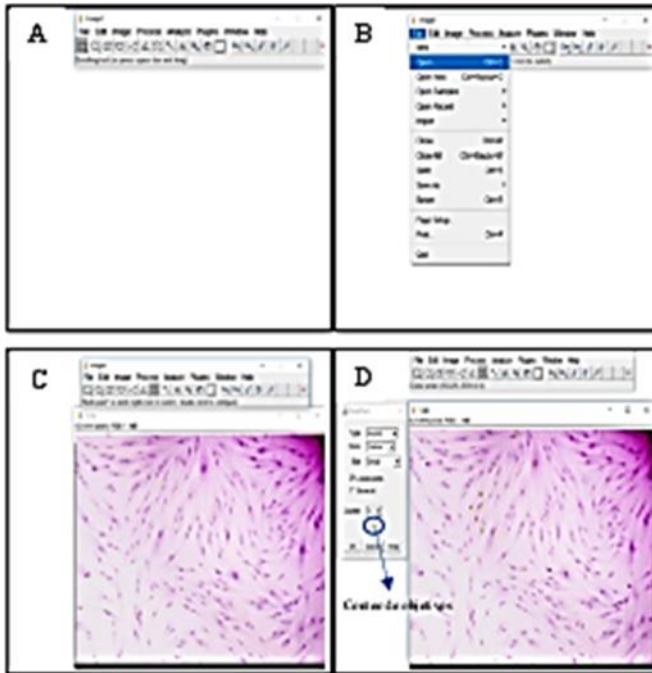


Ilustración 1: Screenshots cuantificación nuclear.

En el esquema “A” se señala la apertura del software Image-J, luego en “B” se seleccionó la opción file, luego open y seleccionar la foto a cuantificar; “C” con la imagen abierta “D” seleccionar la opción de “cell counting”, el cual es un “plug in” del software, configurar el tipo de marca, color y tamaño, se realizó mediante selección con el cursor los objetivos a escoger en la foto, en círculo se señala el número de objetivos contados.

6.13 Análisis cuantitativo colágeno

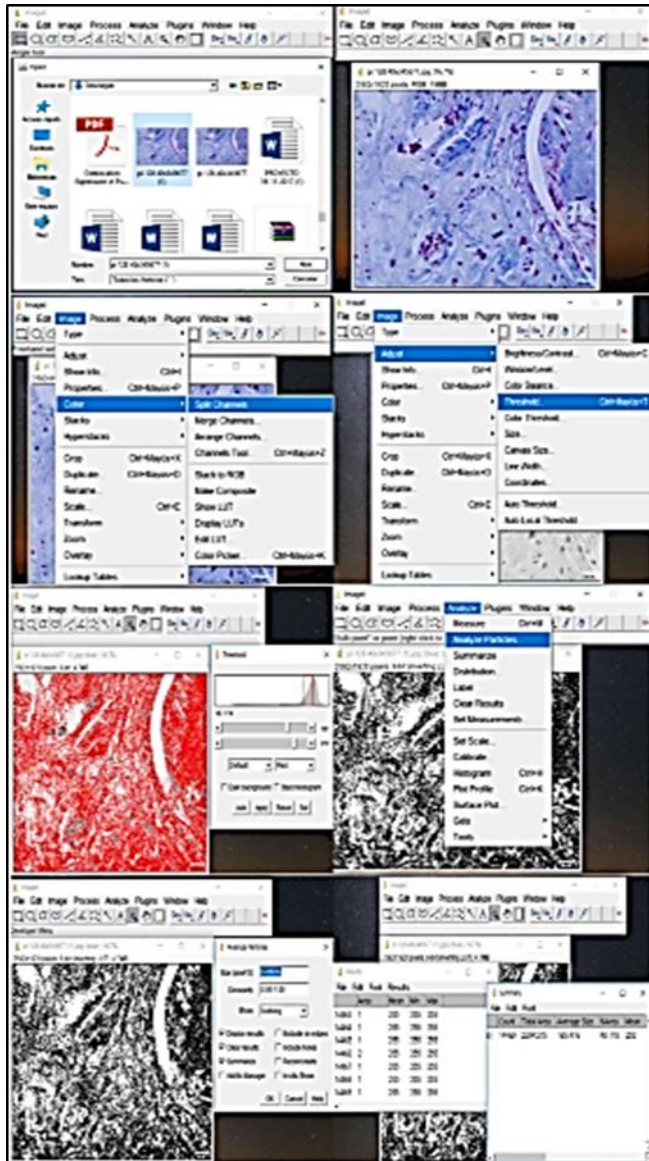


Ilustración 2: Screenshots cuantificación colágeno.

En la imagen “A” se realizó la selección de imagen mediante la opción “file” y “open”. En la imagen “B” ya la imagen fue abierta, luego en la imagen “C” se seleccionó imagen y luego la opción “color”, luego la opción “Split Channels”, tras esto se abrieron 3 ventanas de nombre “Red, Green, Blue”, solo dejar abierta la ventana “Blue”, luego en la imagen “D” se selección “image” luego “Adjust” y “Treshold”, en la imagen “E” se selecciona el área correspondiente al tejido conectivo azul, excluyendo lo que sea de otro color, el canal “Blue” nos permite seleccionar de manera que dejar fuera los elementos no azules en este caso. En “F” se seleccionó “Analyze particles” y en F se mantuvieron los valores por defecto que arroja el programa para las medidas a analizar, luego presionar “OK” y en “H” se muestran los resultados finales del porcentaje de marcación en la muestra para el canal “Blue”.

6.14 Proliferación de mononucleares de sangre periférica (MSP) humana

Los MSP fueron obtenidos de 7 ml de sangre periférica en un tubo con heparina (BD® vacutainer) de un donante normal. En un tubo de 15 ml (Falcon ® se agregaron 5 ml de Ficoll Histopaque (Sigma ®) y se adicionó lentamente los 7 ml de sangre. Luego el tubo se centrifugó (Spectrafuge Labnet ®) a 1700 rpm durante 20 min con modo sin freno para obtener plasma, mononucleares y glóbulos rojos. Se rescató la fase intermedia blanquecina que son los MSP, los que fueron lavados y cuantificados en cámara Neubauer®.

6.15 Ensayo de proliferación de linfocitos T-CD3

Los MSP se tiñeron en oscuridad con Cell/Trace Violet (CTV, Molecular Probes®) durante 20 minutos a 37°C. El CTV se neutralizó con un volumen 4 veces mayor al inicial con RPMI glutamax (Corning®) suplementado con 10%FBS (Hyclone®) y se incubaron durante 5 minutos. Los LT se resuspendieron en RPMI glutamax y 10%FBS a una concentración de 1 millón MSP/ml y se conservaron a 4°C. Para la activación de linfocitos

T-CD3, se agregaron 10µl de Phytohematuglinina A (PHA, Sigma®) a una concentración final de 25 µg/ml en todos los pocillos excepto el basal, que correspondió al grupo de linfocitos que no reciben estimulación.

6.16 Ensayo de inmunosupresión

En la placa de 48 pocillos (SPL®) con 400µl de medio completo, se sembraron 0.5 millones de MSP marcados. Los grupos experimentales fueron 4: MSP sin estimular (Basal), estimulados con PHA y los grupos con DPSCs y GMSCs. Previamente al ensayo las MSCs fueron tripsinizadas y resuspendidas en PBS 1X y luego fueron cuantificadas en cámara Neubauer. La proporción de co-cultivo con los LT fue 1:10 (MSC:LT). Se ajustaron los volúmenes con RPMI glutamax, 10% FBS y 1% de pen/strep con 50 µl de B-mercaptoetanol (Sigma®) durante 5 días a 37°C y 5% CO₂. Los LT fueron marcados con 3 µl de CD3-FITC (Beckman Coulter®) y las MSC fueron resuspendidas en 250 µl de PBS 1X y 50 µl de Ioduro de propidio 1µg/ml (Sigma®). Las muestras fueron adquiridas en el Citómetro BD FASC Canto II (Biosciences BD® FACS Canto Diva™ software) para cuantificar la viabilidad y proliferación celular. Posterior al análisis en el citómetro se corroboraron los resultados obtenidos con el programa FCS Express 4 Plus Research Edition. Debido a que existen reportes previos de la actividad inmunosupresora de las GMSC (51), decidimos utilizar las GMSC como controles positivos del ensayo.

6.17 Medición de la actividad deIDO de DPSCs en cultivo

Previo a la medición de la actividad de laIDO, se suplementó el medio de cultivo con triptófano (Sigma®). A partir de 2000 células/cm² en placa de 96 pocillos, se agregó triptófano 10 µg/µl a cada pocillo a una concentración final de 1 µg/µl por 48horas a 37°C y 5% CO₂ en aire humedecido, como controles negativos se consideraron DPSCs en pocillos con medio de cultivo sin triptófano. Además se construyó una curva de calibración

de L-quineurina (Sigma®). Luego se tomaron 160 µl de sobrenadante de cada pocillo de cultivo y se agregaron 10 µl de ácido tricloro acético (TCA) (Merck ®) al 30% diluido en agua bidestilada estéril. Luego se incubó durante 30 min a 50°C (hidrolisis de N-Formyl quinurenina en quinurenina), se centrifugó a 2000 RPM (revoluciones por minuto) durante 10 minutos. De cada tubo Eppendorf (SPL®) se recuperaron 100 µl los que fueron transferidos a placas de 96 pocillos fondo plano (SPL®). A continuación, se añadieron 100 µl de a solución de Ehrlich (Sigma-Aldrich®) a 12 mg/ml (diluido en ácido acético) y se leyó la absorbancia a 450 nm o 490 nm en un lector de Elisa Rayto 2100C®.

Preparación de Triptófano

El L-triptófano (Sigma ®) se debe disolver en PBS 1X estéril verificando que el pH de este siempre se mantenga a un nivel básico para que esto no precipite. La concentración adecuada a utilizar para las células MSC fue de 100 µg/ml.

Curva de calibración L-quineurina

Se realizó una curva de calibración L-quineurina (Sigma ®) con escala de 0; 1,5; 3,1; 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 µm en DMEM sin rojo fenol. Luego a 160 µL de sobrenadante se agregó 10 µL de TCA al 30%, se homogenizó e incubó por 30 minutos a 50°C y se centrifugó por 10 minutos a 2000 RPM Del tubo se recuperaron 100 µl y se transfirieron a placa con solución de Ehrlich y se leyó a 450 y 490 nM un lector de Elisa Rayto®.

6.18 Preparación del andamiaje con DPSC en el modelo de regeneración pulpar.

El andamiaje en base a fibrina agarosa se basa en la preparación descrita previamente (109). Brevemente, se prepararon suspensiones fundidas del biomaterial Agarosa tipo VII fundida (A9045, Sigma, St. Louis, MO) disueltas en PBS 1X (HyClone®) a concentraciones finales de 0,1% p/v, 0,25% p/v y 0,5% p/v de Agarosa tipo VII (A9045, Sigma, St. Louis, MO). Los hidrogeles de agarosa se complementaron con plasma humano

obtenido de los mismos pacientes que administraron los tejidos dentales (el plasma se preparó con un protocolo estándar y se almacenó a -80°C hasta su posterior uso). También se adicionó α -MEM para un volumen final de 5ml y 1% de ácido tranexámico (Amchafibrin, Fides-Ecofarma, Valencia, España) para evitar la fibrinólisis espontánea., junto a 1% de CaCl_2 (Sigma, St. Louis, MO) para precipitar la reacción de polimerización de los hidrogeles, mezcla de 1 ml que se añadió rápidamente para llenar la placa de cultivo de 6 pocillos, luego la mezcla se polimerizó a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Las DPSC-S criopreservadas se descongelaron y plaquearon en medio completo suplementado hasta que los cultivos celulares alcanzaran un 80% de confluencia. Las células se cosecharon usando tripsina (Triple Select, Corning®) y luego se inyectaron 5×10^5 células con una jeringa de tuberculina sobre los andamiajes de agarosa de fibrina endurecidos con 5 ml de medio completo en aire humidificado a 37°C y 5% de CO_2 . El control del experimento fue una matriz de fibrina-agarosa sin células. Para monitorizar los cultivos de los andamiajes con DPSC-S se usó un microscopio óptico (Olympus® CKX41, Tokio, Japón). Además, las imágenes digitales macroscópicas se tomaron con una cámara Nikon D7100.

6.19 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó utilizando el reactivo LIVE/DEAD® (Molecular Probes, Life Technologies, Dublín, Irlanda). Se añadieron $100\mu\text{l}$ de reactivo LIVE/DEAD® para cubrir las células con la solución y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las imágenes de fluorescencia se tomaron inmediatamente usando un microscopio de fluorescencia (Zeiss Alemania, Axioskop).

6.20 Modelo de regeneración en bloques de dentina

Los molares humanos extraídos de los individuos sanos (los mismos pacientes que administraron tejidos dentales para la extracción de células madre) se cortaron horizontalmente con un grosor de 3 mm y una longitud de 1 mm con una sierra Dremel (100-N / 6 Kit de herramienta rotativa de velocidad única de 220 voltios) Para el bloque de dentina, preparamos cortes coronales de dientes humanos de 1 mm de espesor (cortes transversales). La rodaja de dentina se desinfectó con 2 ml de hipoclorito de sodio al 1,5% y se agitó en un vórtice durante 1 minuto, luego se centrifugó a 1.700 rpm durante 2 minutos. Después, las muestras se sumergieron en otro tubo estéril que contenía una combinación de 1 ml de hipoclorito de sodio al 1,5% y 1 ml de 1x PBS, después de lo cual se sometieron a vortex y se centrifugaron de nuevo a 1700 rpm durante 2 minutos. Finalmente, se añadieron bloques de dentina en un nuevo tubo estéril con 2 ml de PBS 1X, se agitaron y se centrifugaron a 1700 rpm durante 2 minutos y luego se secaron en una placa estéril de 10 mm en el interior de una cámara de flujo laminar hasta su posterior uso. Las imágenes macroscópicas se tomaron con una Nikon D7100.

6.21 Implantación de DPSCs en andamiajes de fibrina-agarosa en dentina

El bloque de dentina previamente preparada se cultivó en una placa de 24 pocillos con medios completos con α -MEM, 10% de FBS y 1% de Pen-Strep a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Luego se prepararon los hidrogeles de fibrina-agarosa al 0,25% p/v de acuerdo con los métodos descritos previamente, se inyectaron 20 μ l del fundido con una punta de pipeta (Axygen®) dentro del lumen del bloque de dentina. Una vez que el hidrogel se endureció, se inyectaron 5×10^5 DPSC-S con una jeringa de tuberculina. El bloque de dentina se cultivó durante 7 días en placas de 24 pocillos con 1 ml de medio completo a 37°C y 5% de CO₂. La fibrina-agarosa sin células se usó como control negativo. Se usó un microscopio óptico de luz Olympus CKX41 (Tokio, Japón) para

monitorizar las células. Se tomaron imágenes digitales macroscópicas del hidrogel de fibrina-agarosa con una cámara Nikon D7100.

6.22 Análisis estadístico

Los datos de los distintos experimentos fueron analizados utilizando las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para las comparaciones de medias múltiples y la prueba de Mann-Whitney para las comparaciones de grupos, utilizando para ello el programa estadístico Graph Pad Prism. El intervalo de confianza utilizado se fijó en un 95% y se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0.05$.

7.0 RESULTADOS

7.1 Obtención de muestras de tejido pulpar.

La extracción de pulpa dental a partir de un diente extraído fue un proceso largo que involucró dos etapas, la clínica (exodoncia) y la de laboratorio (corte del diente).

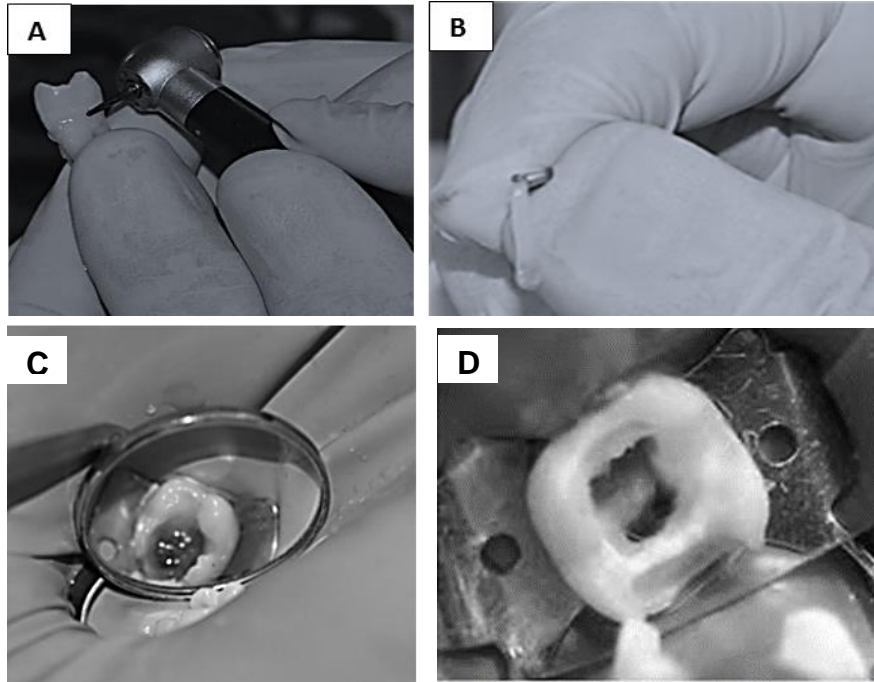


Figura 1: Macroscopía de procedimientos de extracción de tejidos dentales. Método de extracción de pulpa a partir de diente extraído. Corte coronal (A) y pulpa dental extraída con extractor pulpar (B). **Método de extracción pulpar mediante Biopulpectomia.** Diente en boca aislado (C) y diente sin pulpa, ya que fue removida con extractor pulpar (D).

7.2 Cultivo y expansión de células madre mesenquimales de pulpa dental.

En los explantes de pulpa sana y pulpa inflamada, las primeras células emergieron de los tejidos el día 14 y el día 16 respectivamente (Figura2).

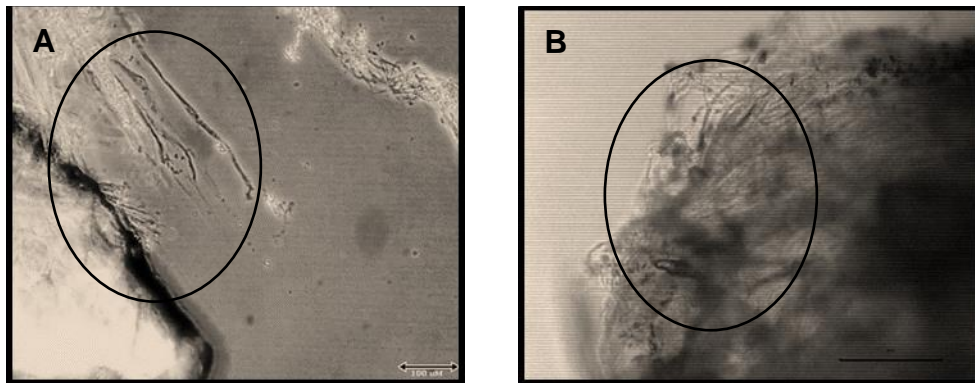


Figura 2: Células madre mesenquimales en cultivo derivadas de pulpa dental sana DPSC-S (A) y pulpa dental inflamada DPSC-I (B). En ambos cultivos se destaca con un círculo las células desprendiéndose del explante, magnificación 40x, barra 100µm.

Las células derivadas de ambos tejidos que fueron aisladas proliferaron exitosamente y se caracterizaron por su adherencia al plástico y morfología fibroblastoide (Figura 3).

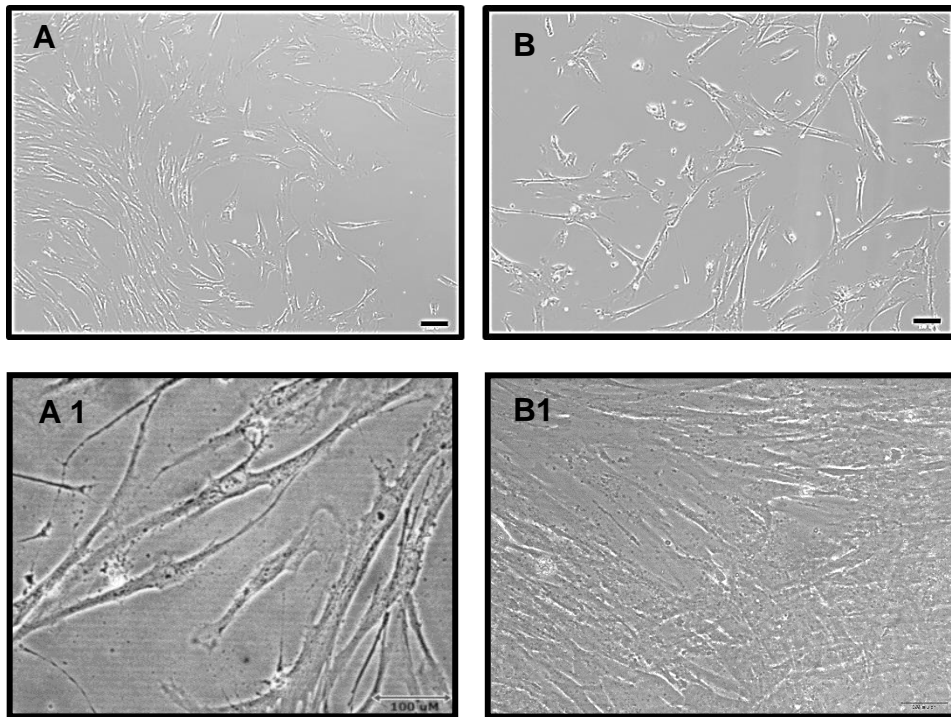


Figure 3. Cultivo de células madre mesenquimales derivadas de pulpa dental sana (A y A1) y de pulpa inflamada (B y B1). Microscopía óptica, magnificación 10x y 40x, barra 100 μ m.

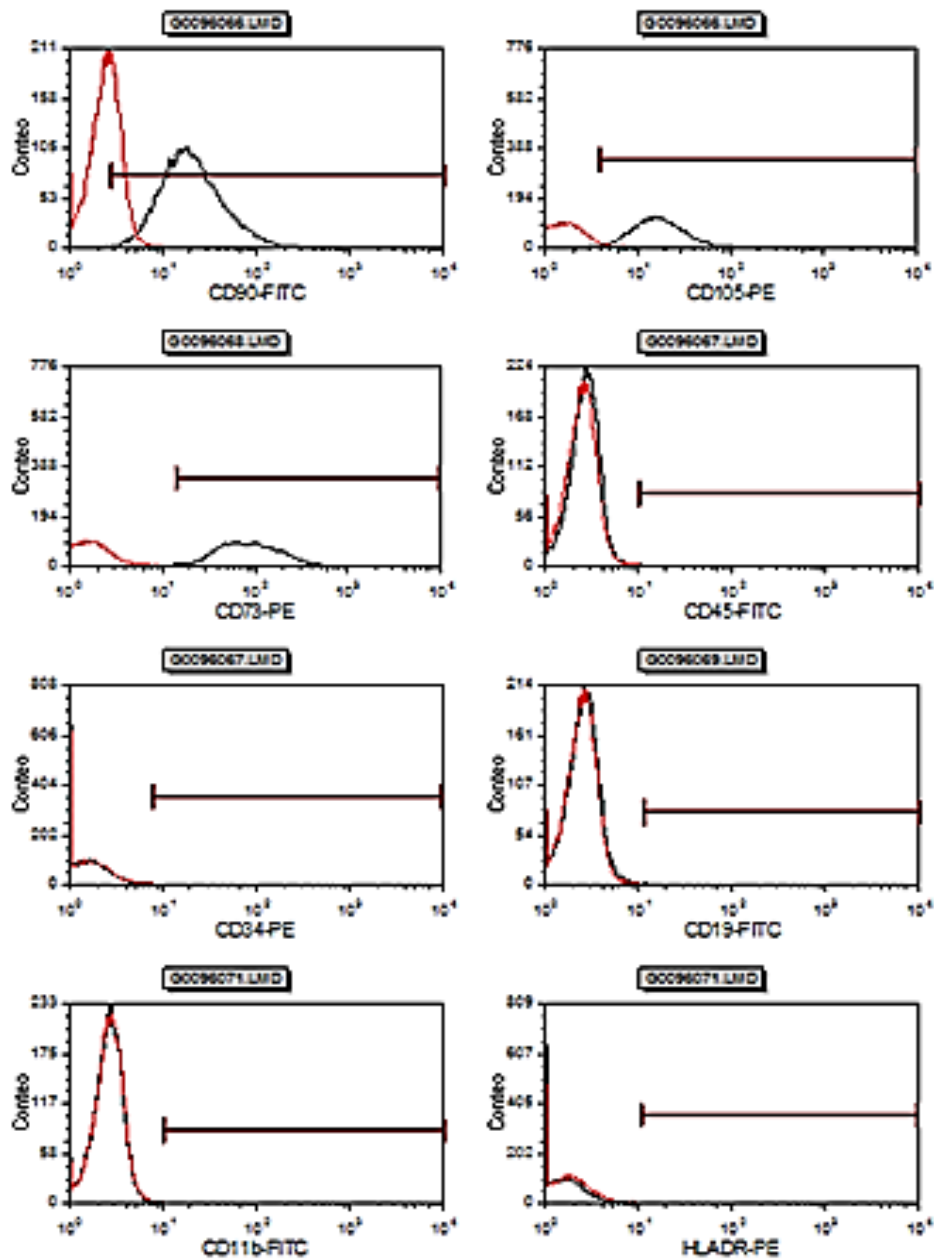
7.3 Inmunotipificación

El inmunofenotipo de las DPSCs se realizó a células en pasaje 4-5. Las DPSC-S expresaron CD73 (99,8%±0,1); CD90 (93,1%±10,8); CD105 (90,7%±13,6); CD11b (0,3%±0,3); CD19 (0,4%±0,3), CD34 (1,2%±1,1), CD45 (0,3%±0,3) y HLA-DR (1,3%±1,2). Las DPSC-I mostraron similares patrones de expresión CD73 (99,6%±0,5); CD90 (88,6%±11,9); CD105 (91,8%±6,5); CD11b (1,9%±3); CD19 (1,6%±3,1), CD34 (4,5%±3,6), CD45 (1,7%±5,6) y HLA-DR (3%±4,4). No se observan diferencias significativas en la expresión de estos marcadores para ambos grupos (Tabla 1 y Figura 4).

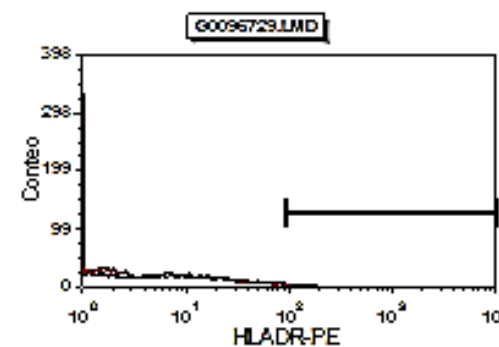
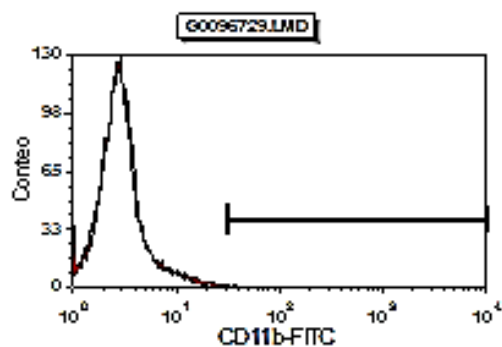
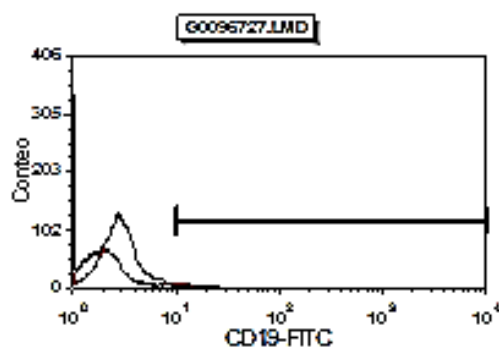
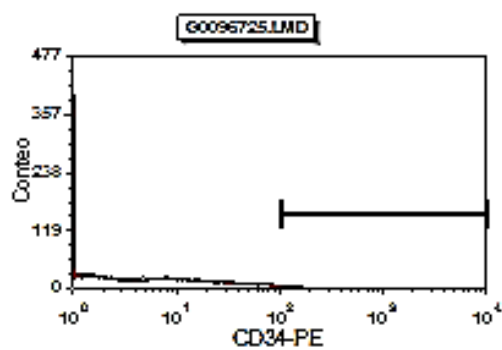
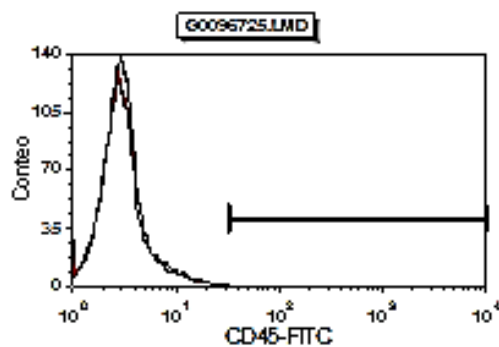
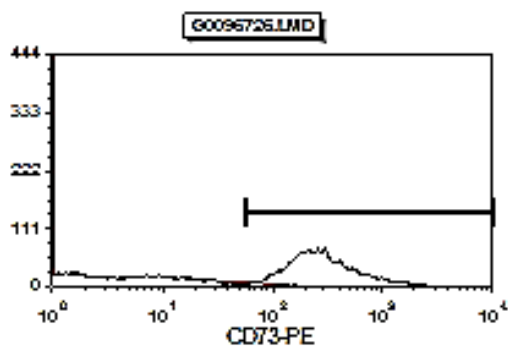
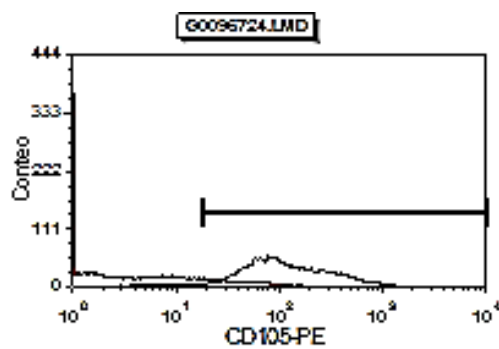
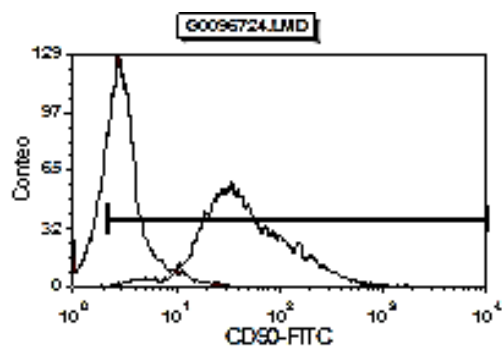
DPSC-S	CD73	CD90	CD105	CD11b	CD19	CD34	CD45	HLADR
código	%	%	%	%	%	%	%	%
1	99,6	73,9	67,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2	99,9	96,6	98,3	0,2	0,3	0,7	0,2	0,7
3	99,8	97,3	97,6	0,4	0,6	2,4	0,3	2,7
4	100	99,4	99,2	0,1	0,3	0,4	0,2	0,6
5	99,8	98,3	91,4	0,9	0,9	2,2	0,8	2,3
DPSC-I	CD73	CD90	CD105	CD11b	CD19	CD34	CD45	HLADR
código	%	%	%	%	%	%	%	%
1	99,9	93,1	97,1	0,2	0,1	7,4	0,2	10,8
2	99,8	99,2	96,1	7,0	7,0	9,0	6,9	8,7
3	99,8	91,8	95,0	0,2	0,3	3,0	0,4	6,0
4	98,7	90,8	89,2	1,7	0,4	2,7	0,6	2,1
5	100,0	68,2	81,6	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1

Tabla 1: Porcentajes de expresión de marcadores de inmunofenotipo de las DPSCs.

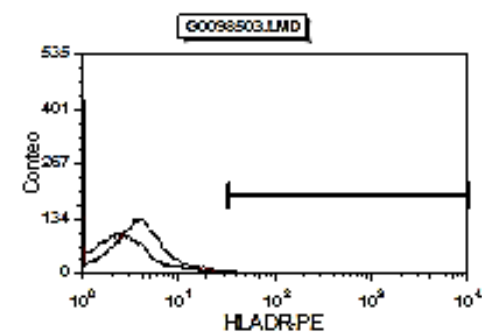
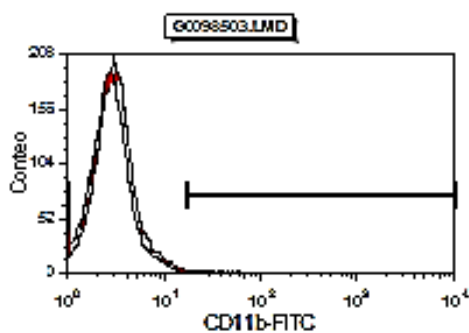
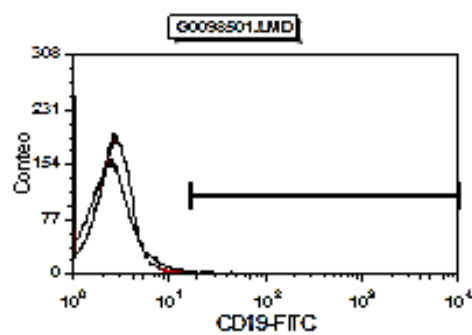
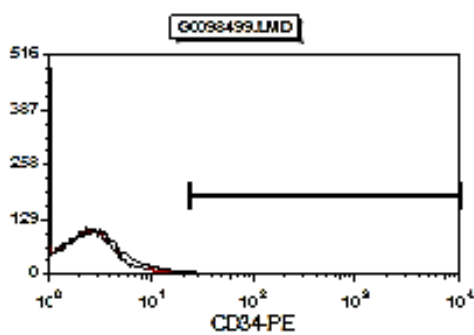
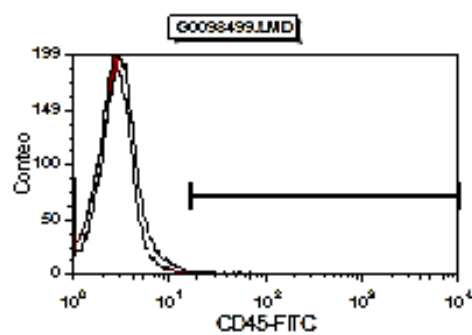
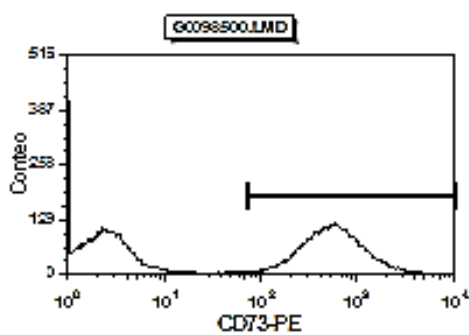
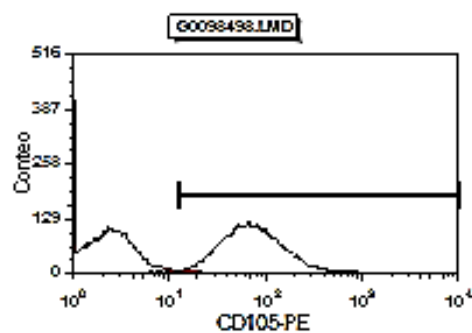
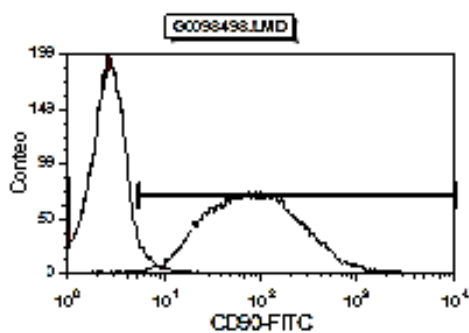
Histogramas DPSC-S muestra 1



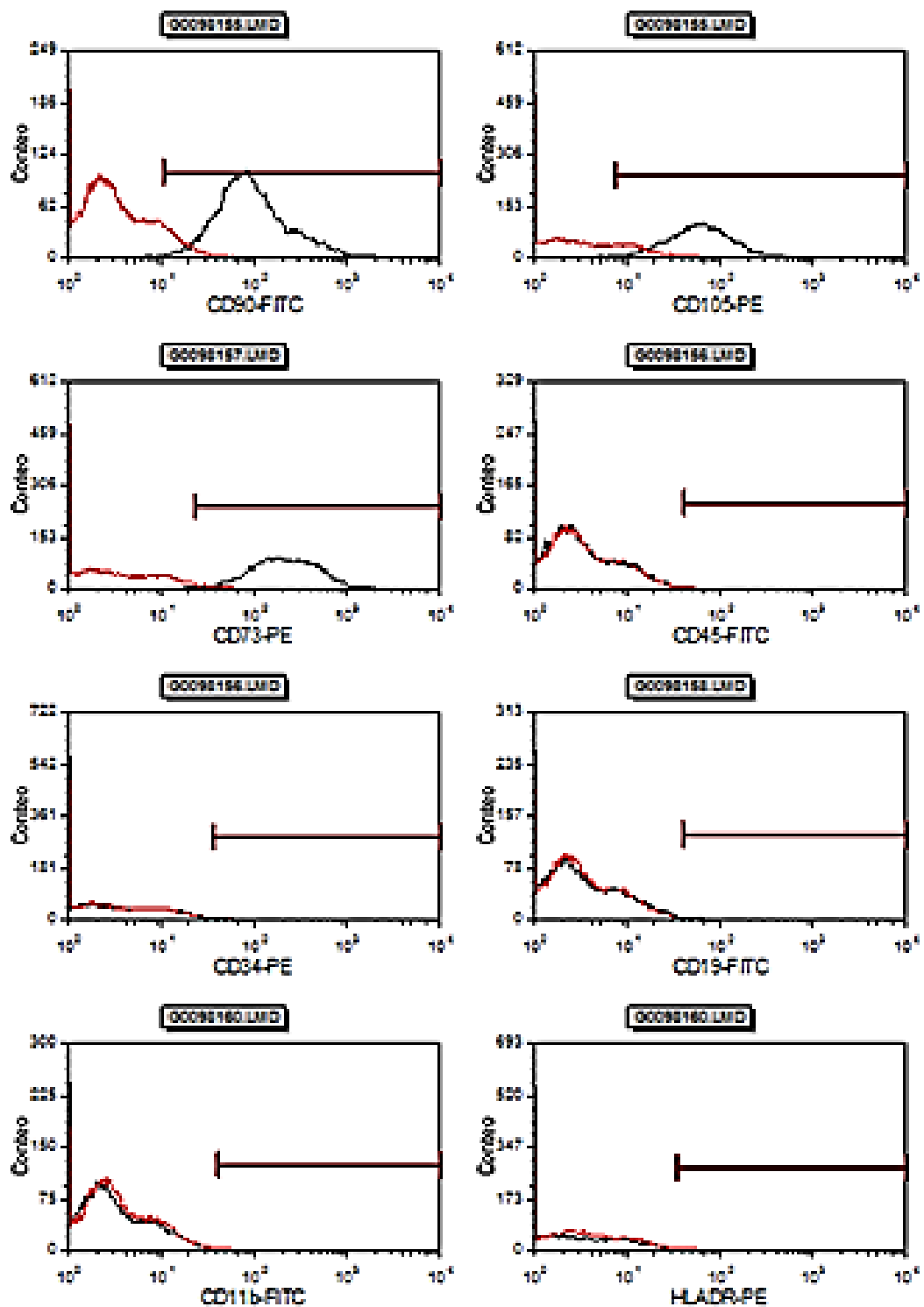
Histogramas DPSC-I Muestra 1



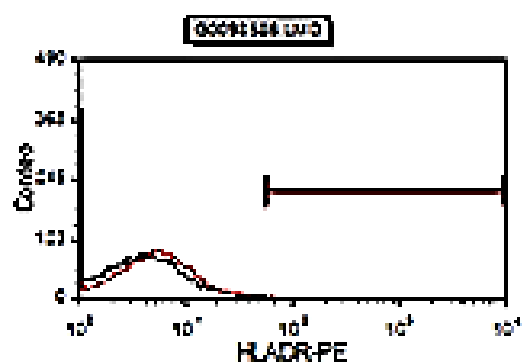
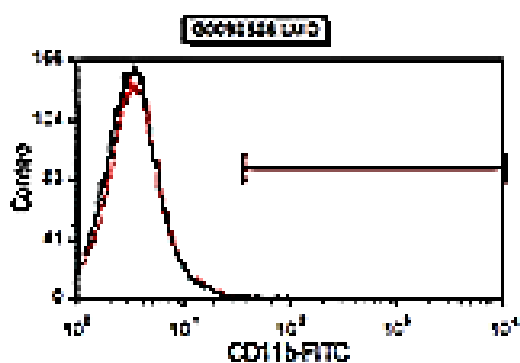
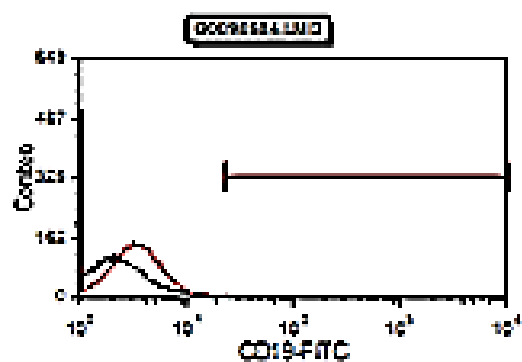
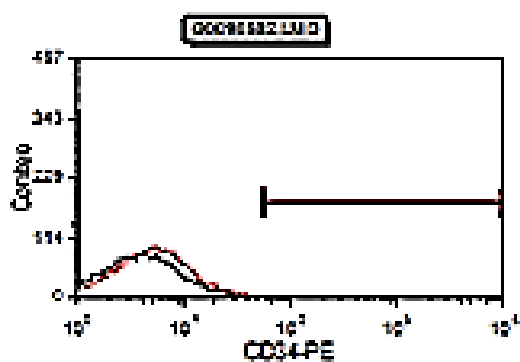
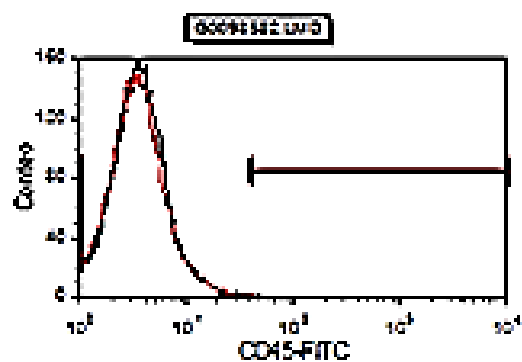
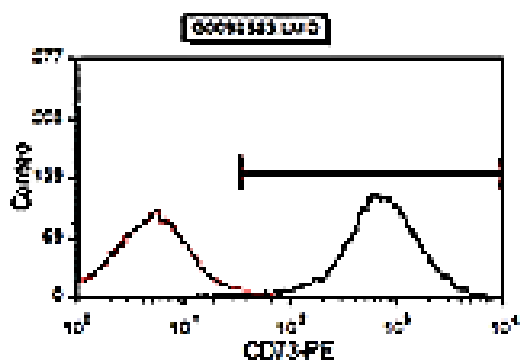
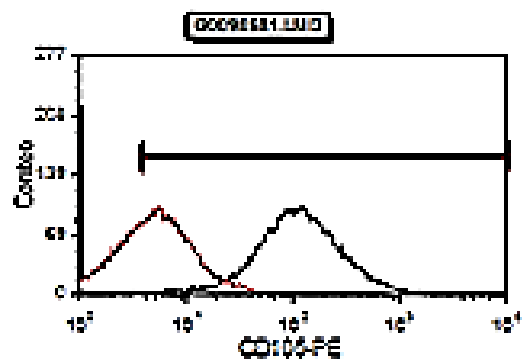
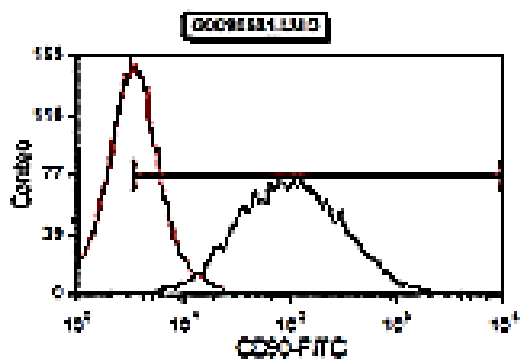
Histogramas DPSC-S muestra 2



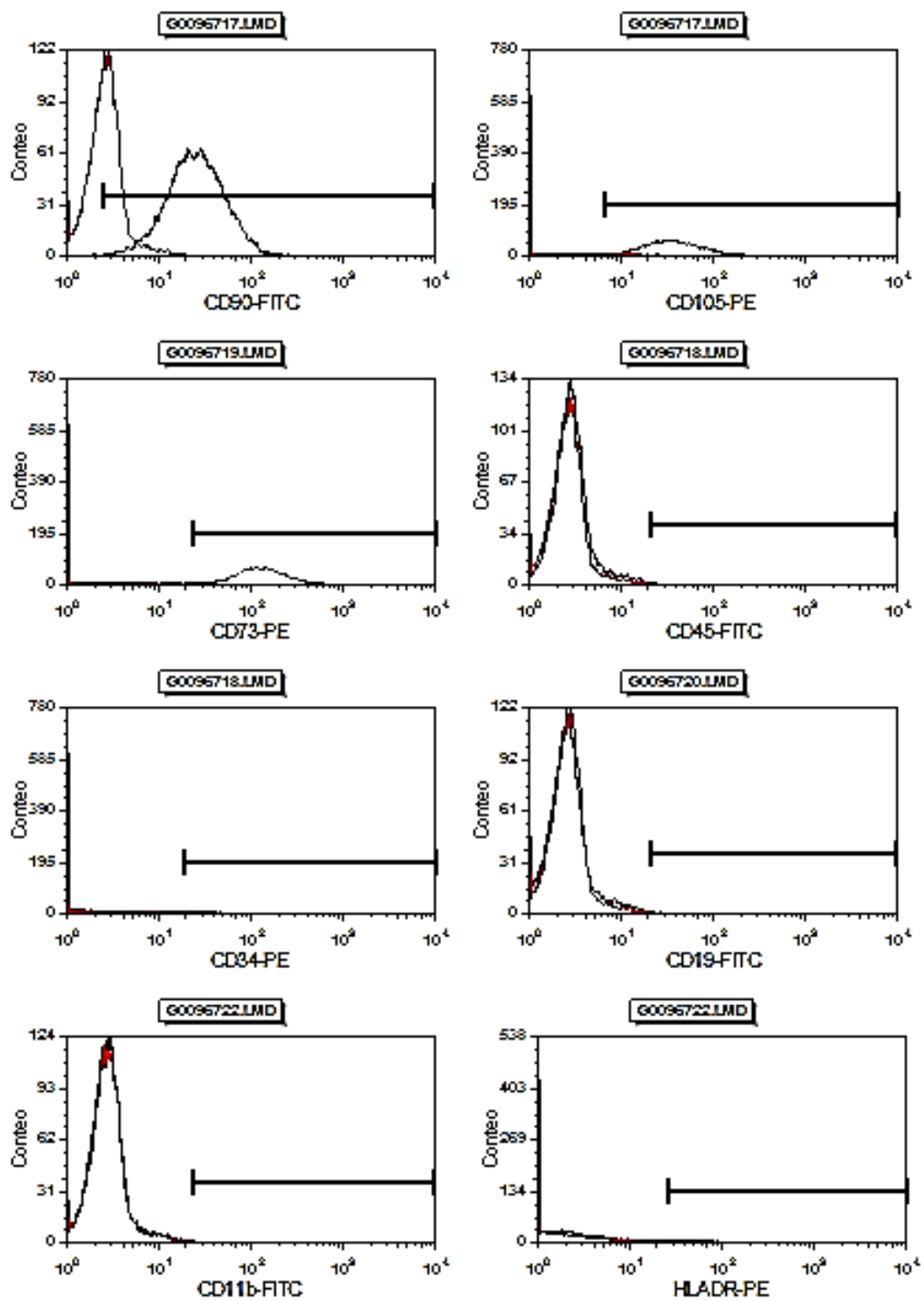
Histogramas DPSC-I muestra 2



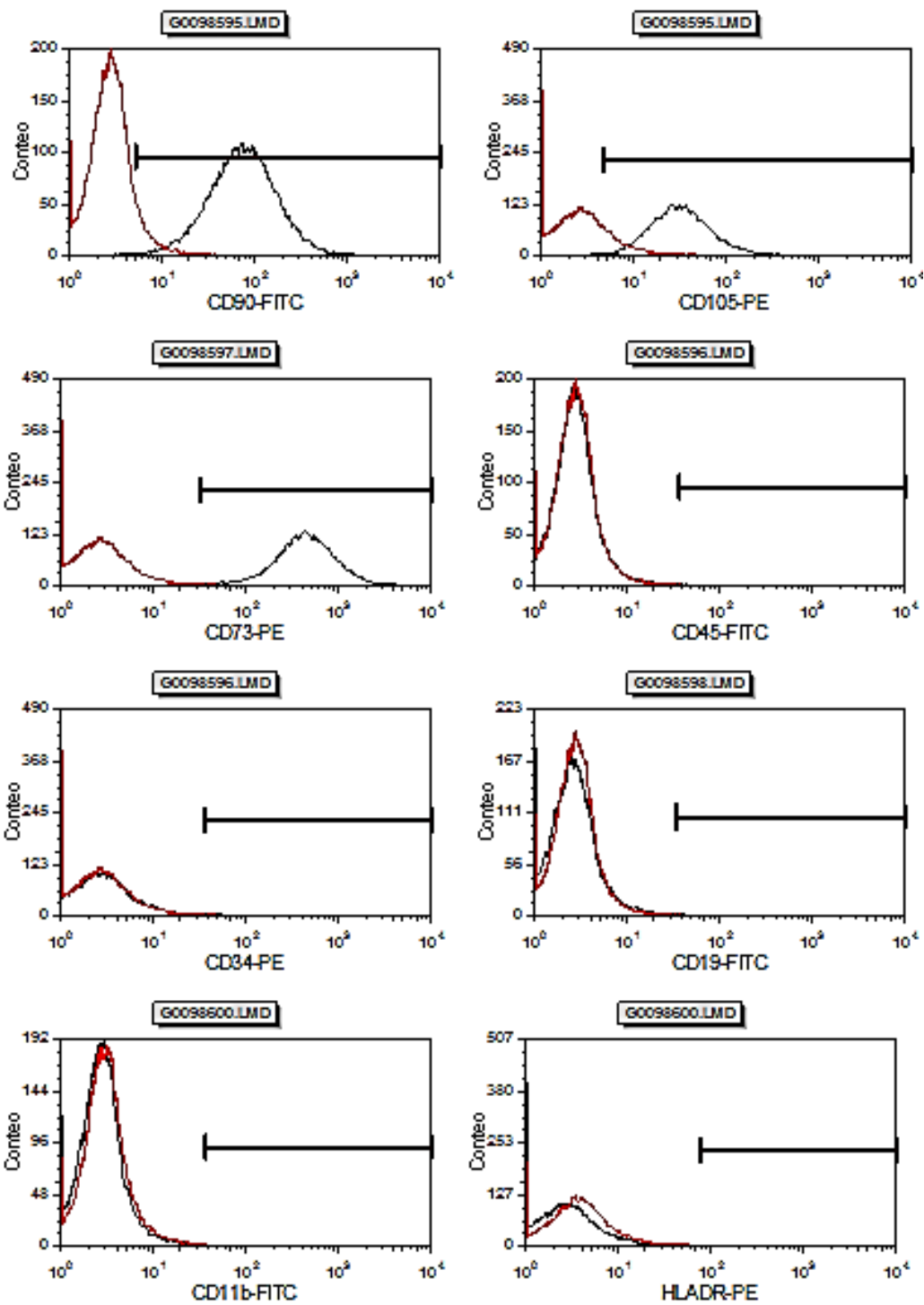
Histogramas DPSC-S muestra 3



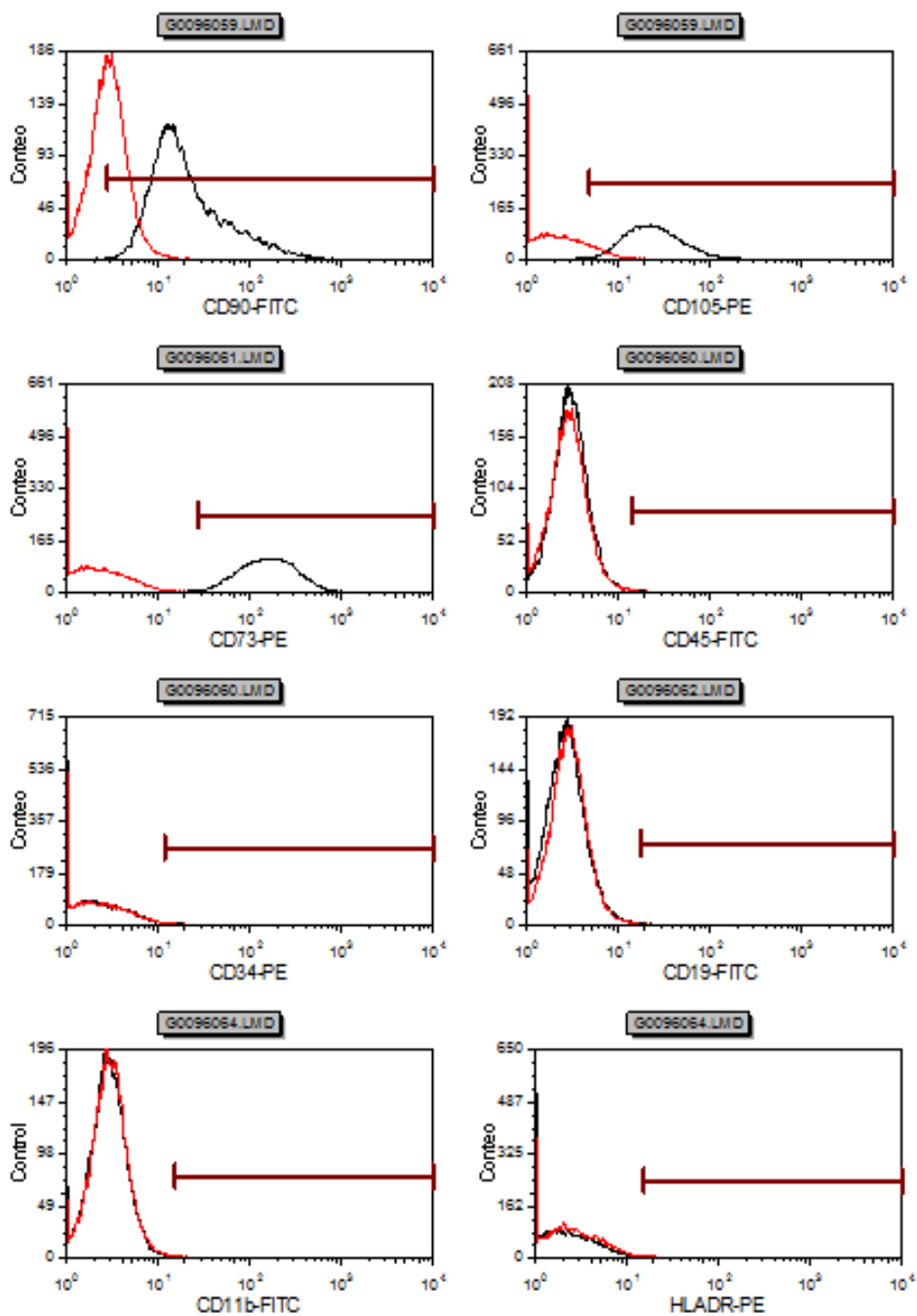
Histogramas DPSC-I muestra 3



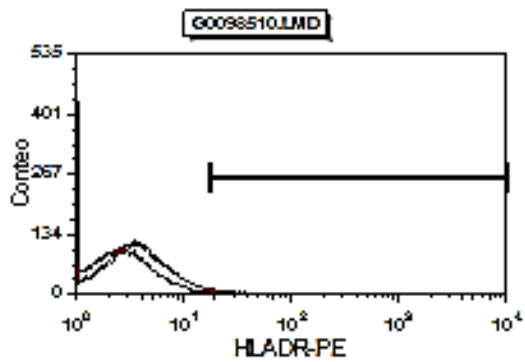
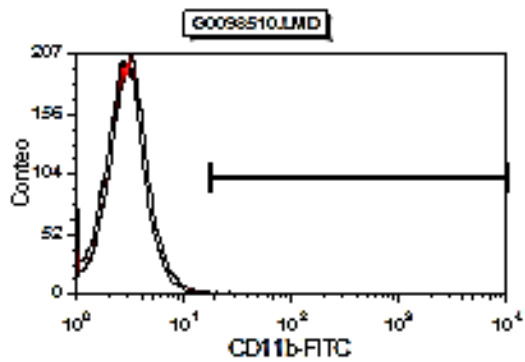
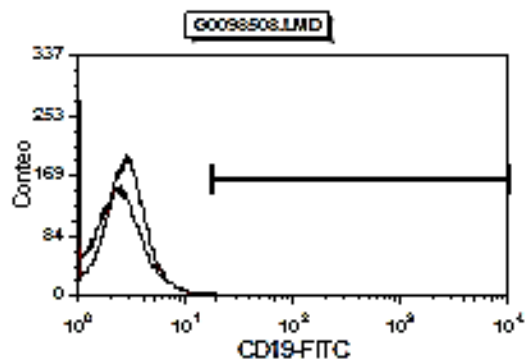
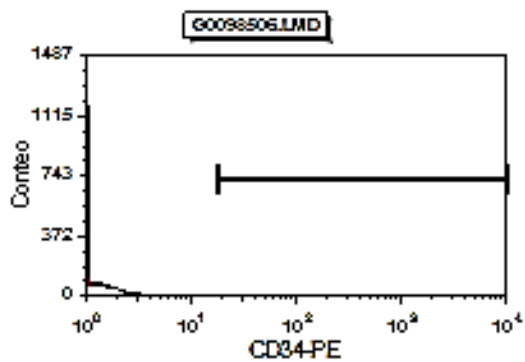
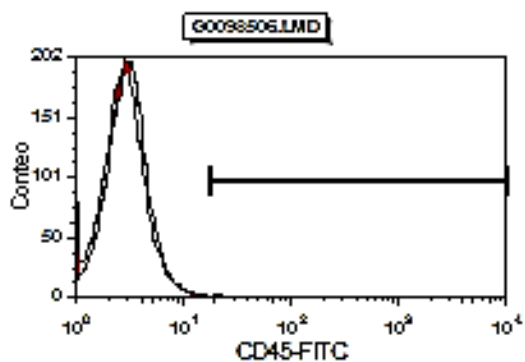
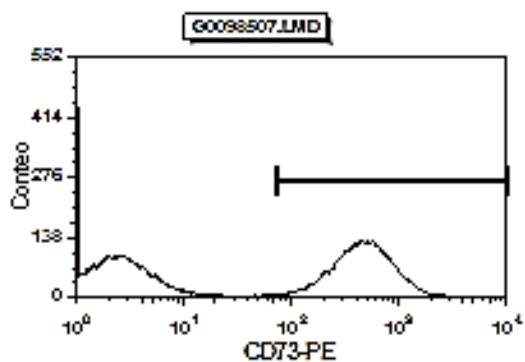
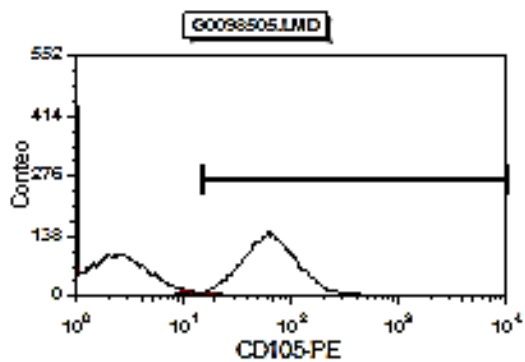
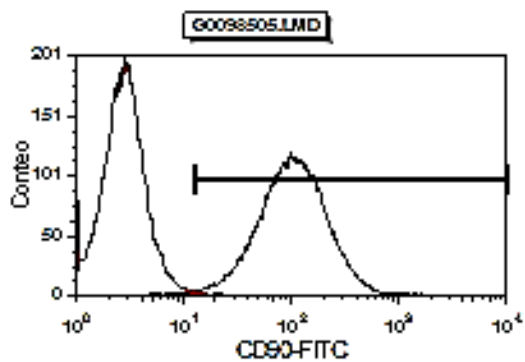
Histogramas DPSC-S muestra 4



Histogramas DPSC-I muestra 4



Histogramas DPSC-S muestra 5



Histogramas DPSC-I muestra 5

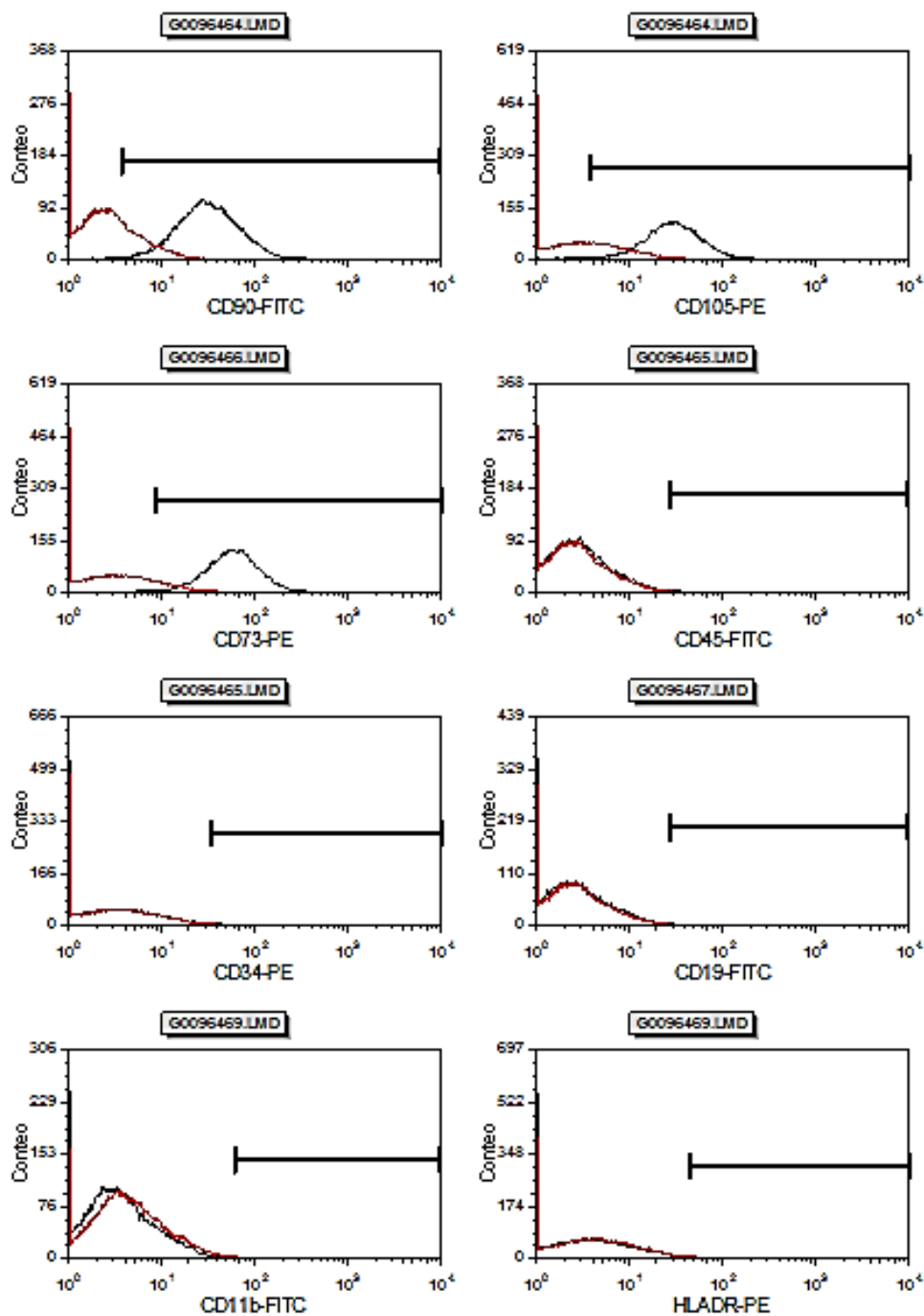


Figura 4: Histogramas de DPSC-S y DPSC-I con un n= 5 muestras de cada grupo para los marcadores CD73; CD90; CD105; CD11b; CD19; CD34; CD45 y HLA-DR.

7.4 Tridiferenciación

Los cultivos de DPSC-S y DPSC-I en medio de tridiferenciación fueron teñidos luego de varias semanas en cultivo, y se evidenciaron depósitos de calcio en la diferenciación osteogénica en ambos tipos celulares. Así mismo las DPSC-S mostraron mayor potencial de diferenciación adipogénica en comparación a las DPSC-I y además, se observó una evidente producción de proteoglicanos para las DPSC-S y las DPSC-I.

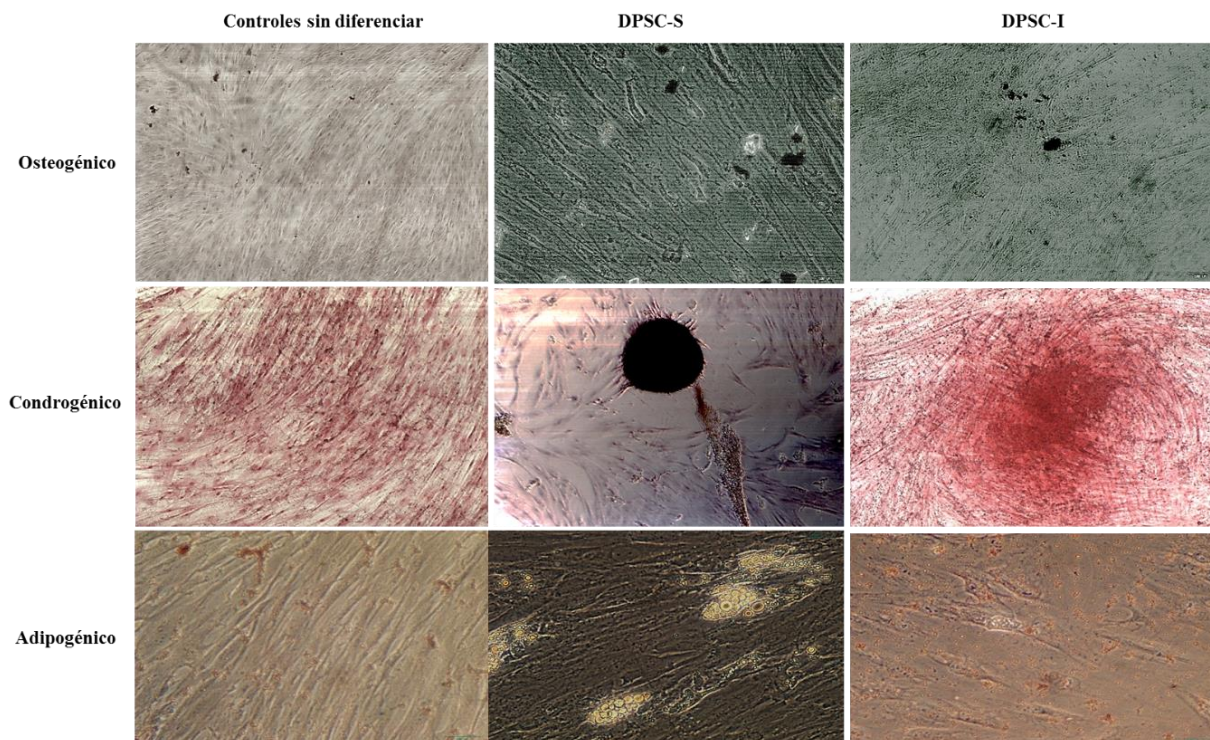


Figura 5: Diferenciación trilineaje de DPSC-S y DPSC-I. DPSCs diferenciadas a linaje osteogénico y teñidas con solución de Von Kossa, DPSCs diferenciadas a condrocitos teñidas con Safranina –O y DPSCs diferenciadas a fenotipo adipogénico teñidas con Oil Red. Los controles son DPSC-S sin medio de diferenciación Magnificación 10x, barra=100µm.

7.5 Proliferación celular de DPSC-S y DPSC-I

Los datos de proliferación se representaron como promedios de unidades de densidad óptica con su respectiva desviación estándar (SD). La prueba de varianza (ANOVA) se analizó en el mismo grupo experimental a lo largo del tiempo con un valor $p = 0,0005$ para DPSC-S y $0,0008$ para DPSC-I. El análisis de Mann Whitney no mostró diferencias significativas entre los grupos en el tiempo, los valores de p fueron $0,3095$; $0,999$; $0,8413$; $0,3095$ y $0,999$ para los tiempos 24, 48, 72, 96 y 120 horas respectivamente (Figura 6).

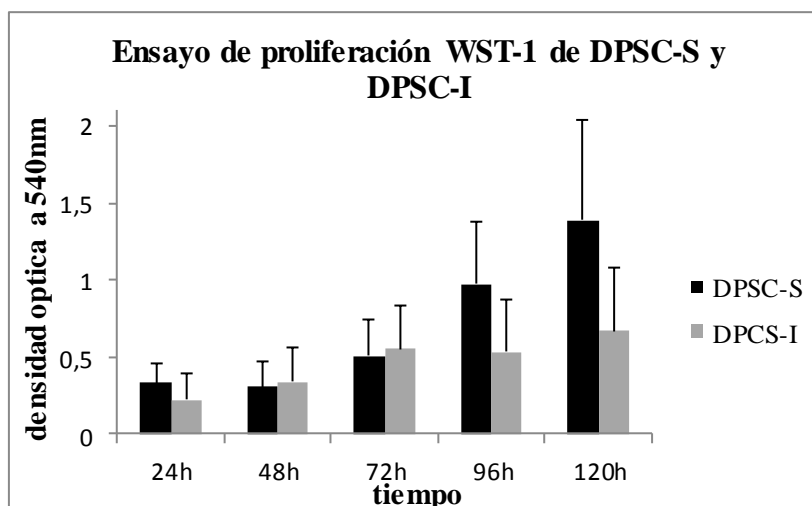


Figura 6: Ensayo de proliferación WST-1 de DPSC-S y DPSC-I. $n= 5$ muestras de cada grupo experimental DPSC-S y DPSC-I que se ensayaron a las 24, 48, 72, 96, 120 horas.

7.6 Viabilidad celular mediante tinción con Azul Tripán.

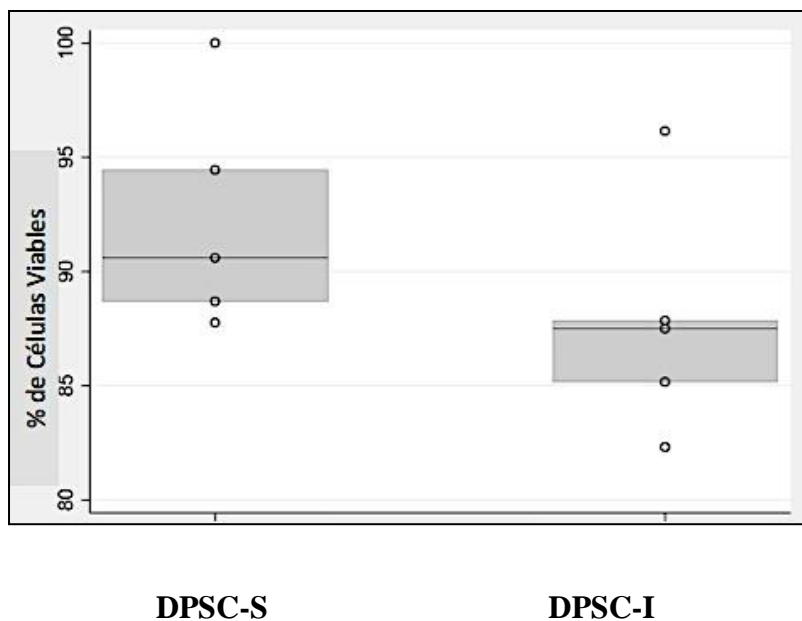


Figura 7. Viabilidad celular de DPSC-S y DPSC-I. Se representan las medianas de los % de células viables para cada grupo de estudio. No hubo diferencias significativas.

7.7 Ensayo de unidades formadoras de colonia (UFC)

En este ensayo se observó una gran variabilidad de forma, tamaño y distribución de las UFC, sin un patrón definido en ambos grupos experimentales. Los resultados en % UFC no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,6015$) (Figura 8).

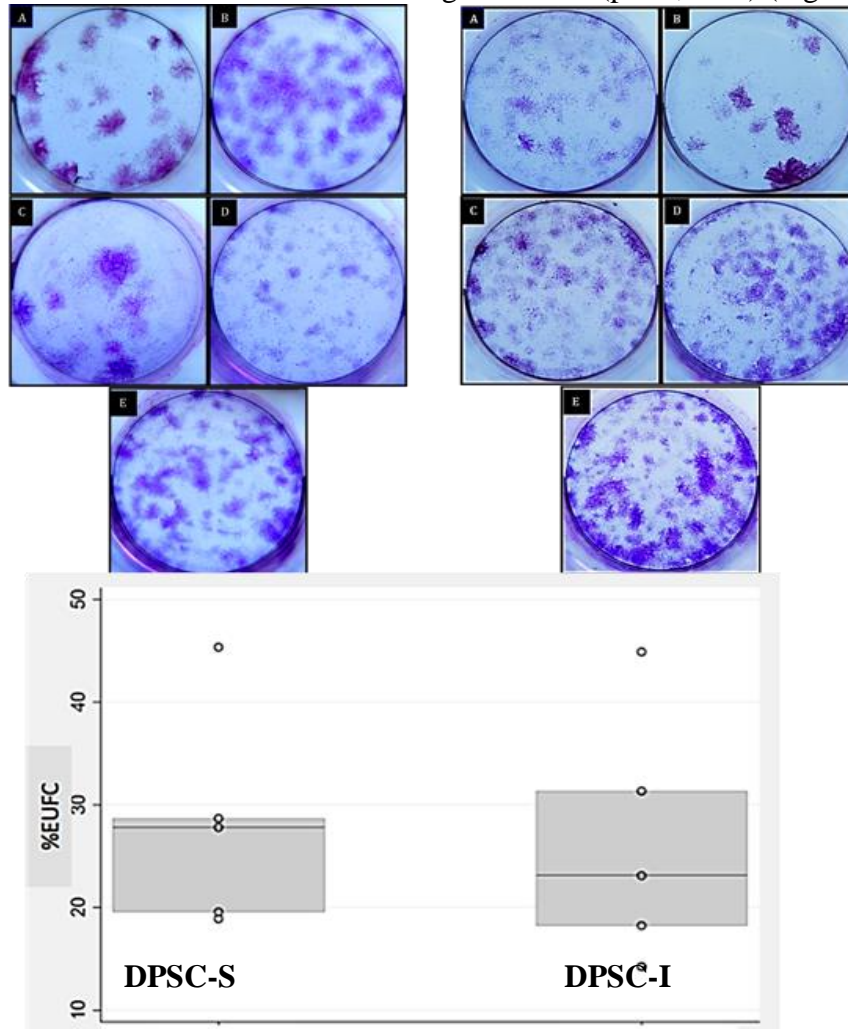


Figura 8: UFC y porcentaje de eficiencia de la formación de colonias (% EUFC) de DPSC-S (izquierda) y DPSC-I (derecha). La placa UFC teñida con cristal violeta corresponde a cada una de las 5 muestras de ambos grupos experimentales. El gráfico del tipo Boxplot representa la distribución de datos y la mediana del % EUFC. No se observaron diferencias significativas.

7.8 Histología de tejidos pulpaes

Se realizó un estudio histológico comparativo de las pulpas dentales post cultivo, analizando sus características morfológicas mediante la técnica de hematoxilina-eosina (Figura 9).

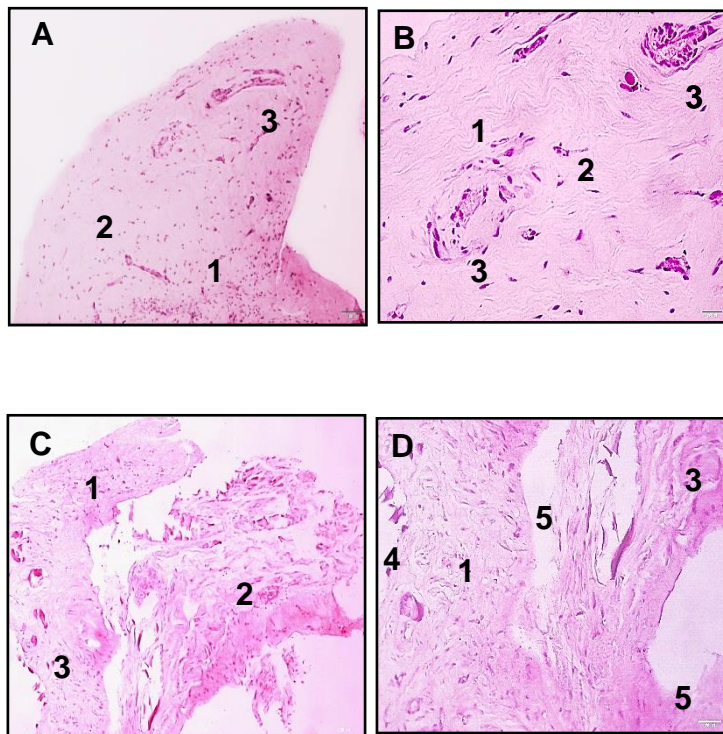


Figura 9: Tejidos pulpaes teñidos con tinción H&E. Tejido pulpar sano (A) e inflamado (C) magnificación 10x y tejidos sano (B) e inflamado (D) magnificación 40x respectivamente. Los núcleos se distribuyen por toda la matriz pulpar (1) y en los tejidos pulpaes inflamados se aprecia que la tinción nuclear es menos marcada. El tejido conectivo, se observa más laxo en las pulpas inflamadas (2). Se distingue la presencia de vasos sanguíneos en los tejidos pulpaes normales e inflamados, observándose un mayor aumento en las pulpas inflamadas (3). En los tejidos pulpaes inflamados se pueden apreciar restos de dentina (4) y lumen de arteriolas o vasos linfáticos (5) ausentes en los tejidos sanos. Magnificación 10x (panel izquierdo) y magnificación 40x (panel derecho), barra=100µm.

Los núcleos, el colágeno y otras estructuras presentes en el corte histológico se evidenciaron utilizando la técnica de Tricrómico de Masson, evidenciando la (Figura 10).

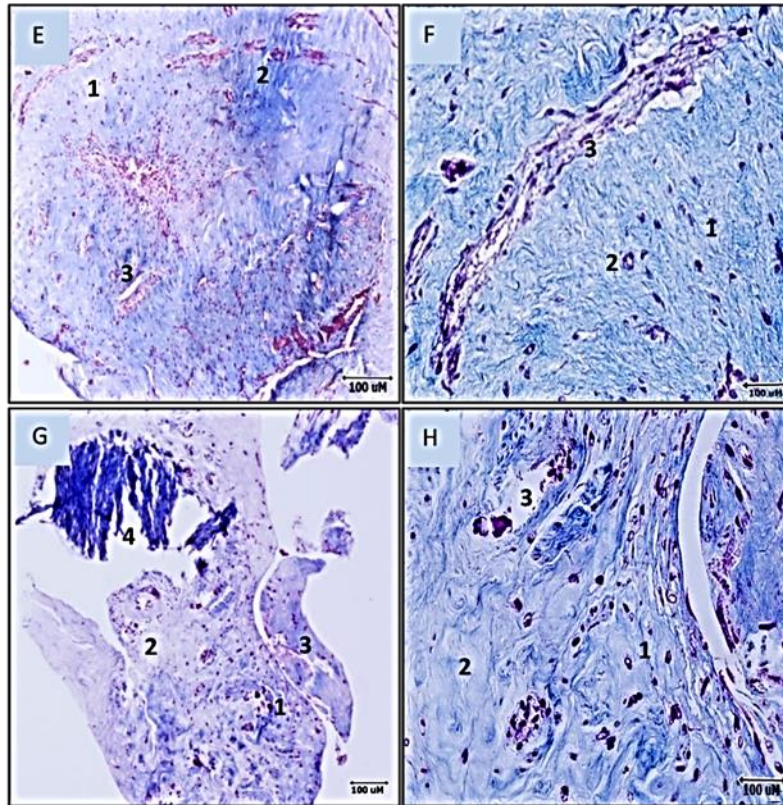


Figura 10: Tejidos pulpaes teñidos con tinción Tricrómico de Masson. Tejido pulpar sano (E) y (F) e inflamado (G) y (H). Se destacan los componentes tisulares en cada microfotografía. Los núcleos se observan por toda la matriz tisular, con una marcación más leve en el tejido pulpar inflamado (1). El tejido conectivo abarca la mayor área del tejido pulpar y en el tejido pulpar inflamado se observa mucho más laxo (2). Se aprecian vasos sanguíneos en el tejido pulpar sano e inflamado (3). Se destacan los restos de dentina en el tejido pulpar inflamado (4) y lumen de arteriolas o vasos linfáticos (5) ausentes en el tejido sano. Magnificación 10x (panel izquierdo) y magnificación 40x (panel derecho), barra=100 μ m

7.9 Histología de DPSCs

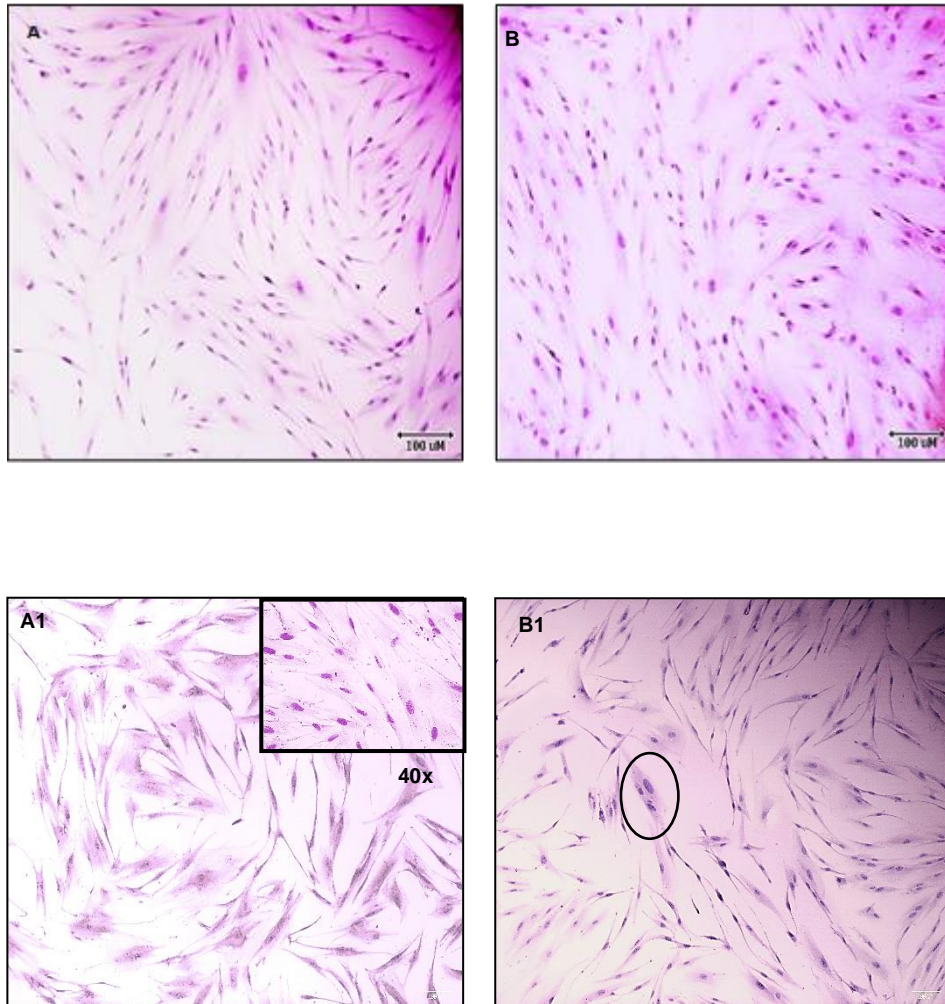


Figura 11: Cultivo de DPSCs teñidos con tinción H&E. DPSC-S y DPSC-I (A y B) Magnificación 10x y DPSC-S y DPSC-I (A1 y B1) magnificación 20x respectivamente. Barra de 100 μ m. Se destaca en A 1 las DPSC-S en cuadrado negro con magnificación 40 x Se evidencia tinción morado en los núcleos y tinción rosa en el citoplasma de todas las células del cultivo. Se destaca en B1 de las DPSC-I un círculo con la morfología alargada fibroblastoide y probablemente células multinucleadas o células muy próximas contactándose entre ellas.

7.10 Análisis cuantitativo

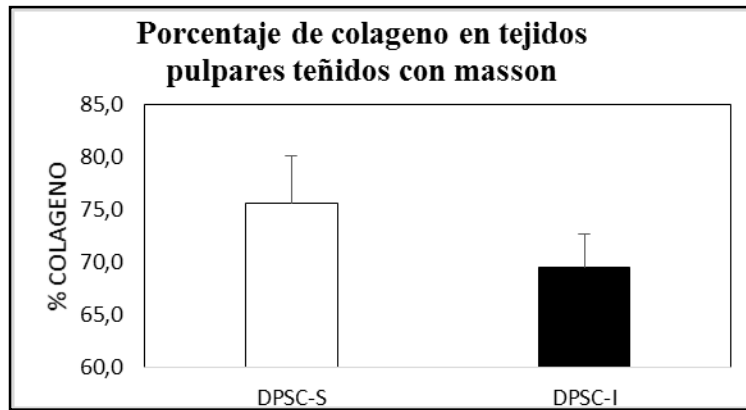


Figura 12: Porcentaje de colágeno presente en los explantes sanos e inflamados. Se graficó el promedio de los porcentajes de tinción azul correspondiente a fibras colágenas con su respectiva desviación estándar. No se observaron diferencias significativas.

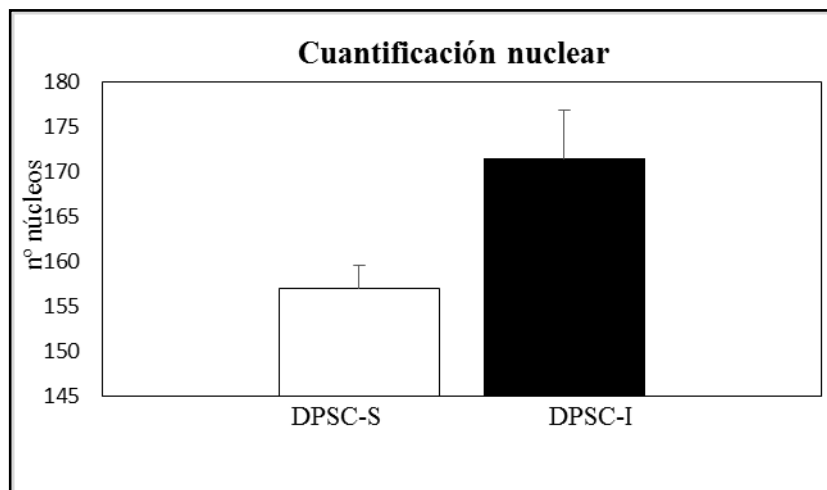


Figura 13: Número de núcleos por área total de DPSCs en cultivo derivadas de tejido pulpar sano e inflamado. Se graficó el promedio del número de núcleos contados por área para cada grupo con su respectiva desviación estándar. No se observaron diferencias significativas.

7.11 Inmunosupresión de la proliferación de linfocitos

Para determinar si las DPSC-S poseían capacidad inmunoreguladora, evaluamos a las DPSC-S en conjunto con las GMSC como controles positivos del ensayo. Se testearon en las mismas condiciones experimentales con sus respectivos controles basales y PHA en la proporción 1:10. Las GMSC y DPSC-S tienden a disminuir la proliferación de linfocitos TCD3 sin embargo este efecto inmunosupresor no fue significativo $p=0,1874$ y $p=0,1714$ respectivamente (Figura 14).

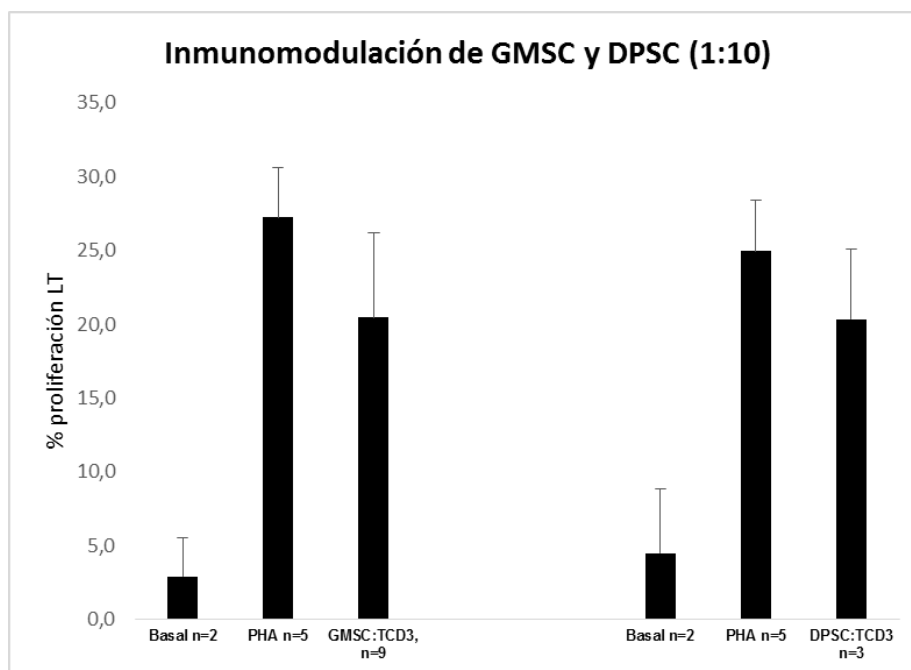


Figura 14: Inmunosupresión de la proliferación de linfocitos TCD3. Ensayo de inmunomodulación de GMSC y DPSC-S El punto basal corresponde a linfocitos sin estimular $n=2$, el punto PHA corresponde a linfocitos estimulados con PHA $n=5$ y el último punto corresponde a los grupos experimentales de MSCs:Linfocitos TCD3 de 1:10, GMSC ($n=9$) y DPSC-S ($n=3$). Se expresan valores promedios con su desviación estándar.

Para determinar si la DPSC-S y las DPSC-I poseían capacidad inmunoreguladora, iguales cantidades de MSC de ambos grupos se testearon en las mismas condiciones experimentales con sus respectivos controles basales y PHA en la proporción 1:10 (Figura 15) y 1:100 (Figura 16). Las DPSC-S tienden a disminuir la proliferación de linfocitos TCD3, pero, este efecto inmunosupresor no es significativo. Además, las DPSC-I tienden a inmunoestimular la proliferación de linfocitos, con significancia estadística en comparación al basal.

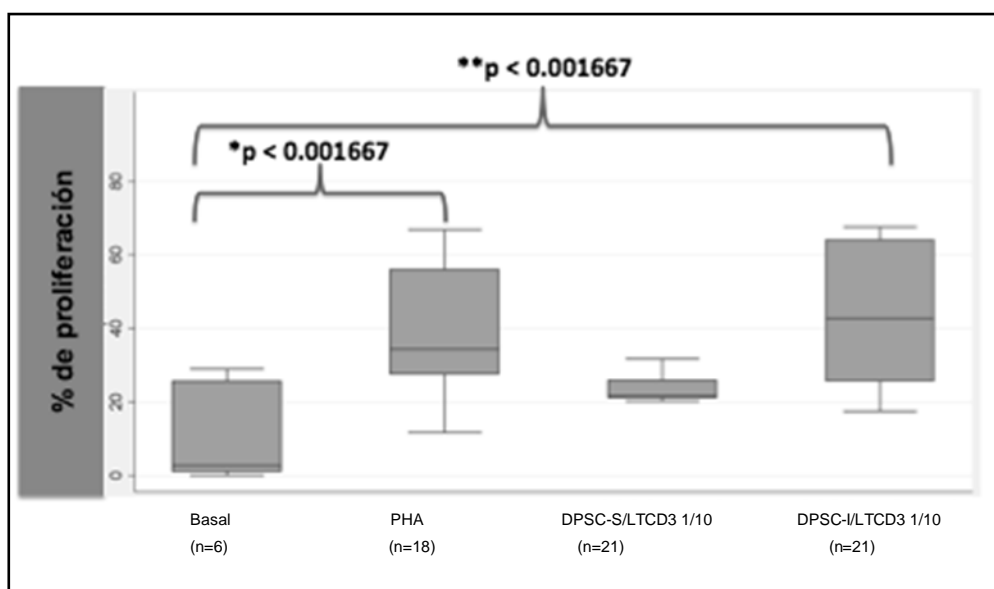


Figura 15: Inmunosupresión de la proliferación de linfocitos TCD3 en relación 1:10.

Ensayo de inmunomodulación de DPSC-S (sana) y DPSC-I (enferma). El basal corresponde a linfocitos sin estimular n=6, el PHA corresponde a linfocitos estimulados con PHA n=18, DPSC-S corresponde al grupo experimental de DPSC-S/LT-CD3 en proporción 1:10 (n=21) y DPSC-I/LT-CD3 (n=21). Se expresan valores como medias con su desviación estándar en el gráfico de cajas según el programa Stata. El análisis estadístico fue realizado con el Test de Kruskal Wallis y se consideró como significativo un $p < 0.001$.

Sin embargo, la inmunomodulación de la proliferación de los linfocitos T-CD3 con DPSCs-S y DPSC-I en relación de concentraciones 1/100 (DPSCs/LT-CD3) muestra similares resultados a los anteriores. Las DPSC-S tienden a disminuir la proliferación de linfocitos T-CD3, pero, este efecto inmunosupresor no es significativo. Además, las DPSC-I tienden a inmunoestimular la proliferación de linfocitos, con significancia estadística solo al compararlo con el basal (Figura 16).

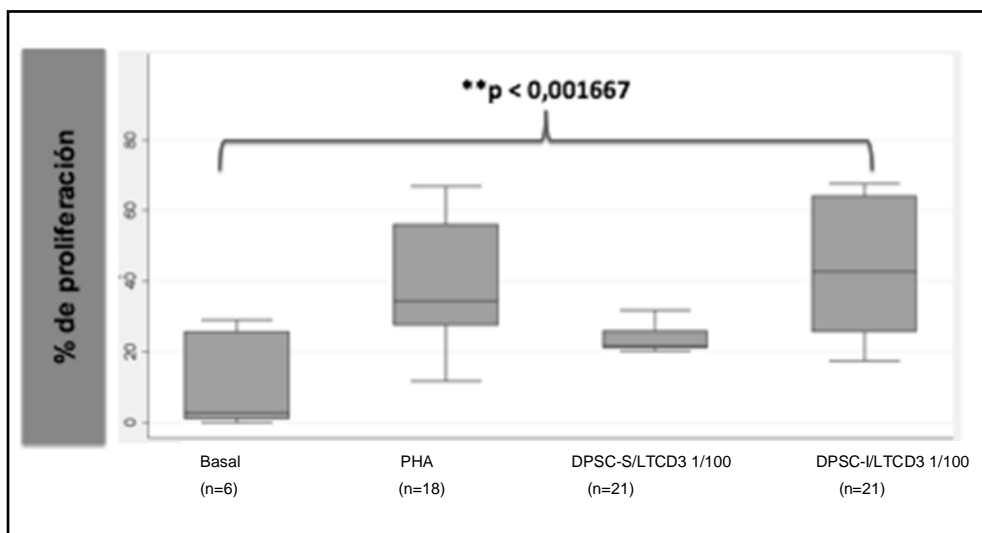


Figura 16: Inmunosupresión de la proliferación de linfocitos TCD3 en relación 1:100.

Ensayo de inmunomodulación de DPSC-S (sana) y DPSC-I (enferma). El basal corresponde a linfocitos sin estimular n=6, el PHA corresponde a linfocitos estimulados con PHA n=18, DPSC-S corresponde al grupo experimental de DPSC-S/LT-CD3 en proporción 1:100 (n=21) y DPSC-I/LT-CD3(n=21). Se expresan valores como medias con su desviación estándar en el gráfico de cajas según el programa Stata. El análisis estadístico fue realizado con el Test de Kruskal Wallis y se consideró como significativo un p value < 0,001.

7.12 Medición de la actividad deIDO de DPSCs en cultivo.

Luego del análisis del resultado de inmunosupresión anterior, evaluamos el rol de la IDO en la inmunomodulación de DPSC. Para lo cual realizamos una curva de calibración de l-quineurina (Figura 17).

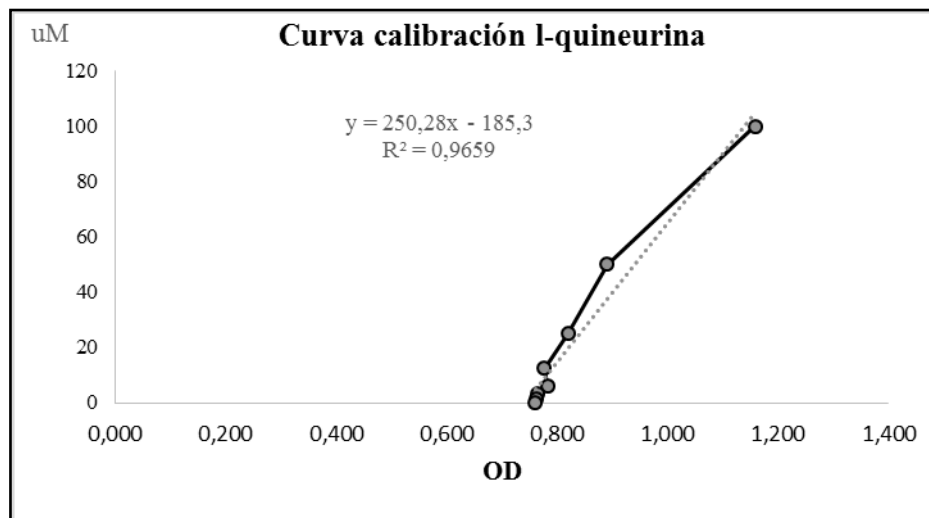


Figura 17: Curva de calibración L-quineurina en escala de concentraciones de 0; 1,5; 3,1; 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 μ m. El valor de $R^2=0,9659$ fue considerado aceptable y la pendiente fue igual a 250,28 y la intersección en el eje “y” es igual a -185,3. Se muestra en línea punteada azul la recta lineal. Cada punto de la curva correspondió al promedio de dos mediciones de densidad óptica a 490nm.

Evaluamos la actividad de IDO a las DPSCs n=5 de cada grupo experimental que fue evaluado en presencia y ausencia de triptófano en duplicado (Figura 18). Podemos concluir que las DPSC-S poseen una mayor actividad de IDO en comparación a las DPSC-I $p < 0,05$, lo que explicaría que el grupo de MSC de pulpa sana son más inmunosupresoras que las MSC de pulpa inflamada.

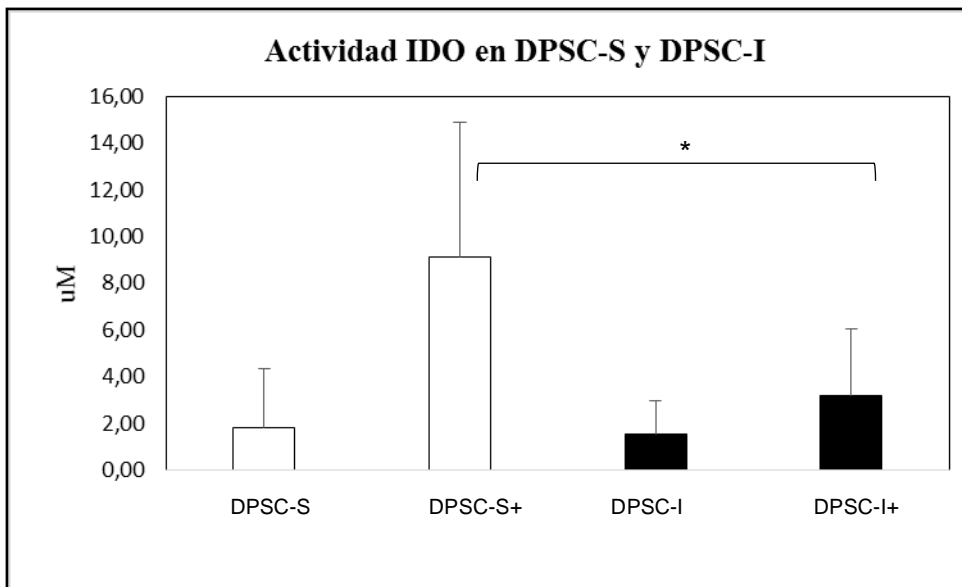


Figura 18: Medición de la actividad IDO en DPSC-S y DPSC-I. Los valores corresponden al promedio de los duplicados de cada condición para un n de muestras de 5 para cada grupo. Las DPSC-S y DPSC-I corresponden a los grupos de DPSC sin estimulación con triptófano, es decir son controles negativos. Las DPSC-S+ y DPSC-I+ corresponden a las estimuladas con triptófano. El * representa que existe una diferencia entre la actividad de IDO en las DPSC-S y las DPSC-I con un valor $p = 0,034$.

7.13 Proliferación de DPSCs en andamiaje de fibrina-agarosa

El hidrogel de fibrina-agarosa al 0,25% p/v fue la concentración de hidrogel de más fácil manipulación, con una consistencia adecuada que permitió el manejo en cultivo. Además, las DPSC-S en el hidrogel de fibrina-agarosa al 0,25% p/v proliferaron en condiciones de cultivo y se incorporaron al andamiaje. En la Figura 19 describimos la proliferación de DPSC lo que confirmó que la fibrina-agarosa al 0,25% p/v correspondería a la concentración apropiada de material que permitió la proliferación celular, debido a que sería un gel más estable en comparación al más delgado y frágil en concentraciones más bajas (0,1%). Aunque, queremos destacar que las DPSC-S sobrevivieron en todas las concentraciones testeadas, pero con menor proliferación al 0,5% p/v. De hecho, no se observaron diferencias significativas en la proliferación de DPSC-S en las diferentes concentraciones del hidrogel ensayado a lo largo del tiempo y en la densidad celular con un valor de $p > 0,05$.

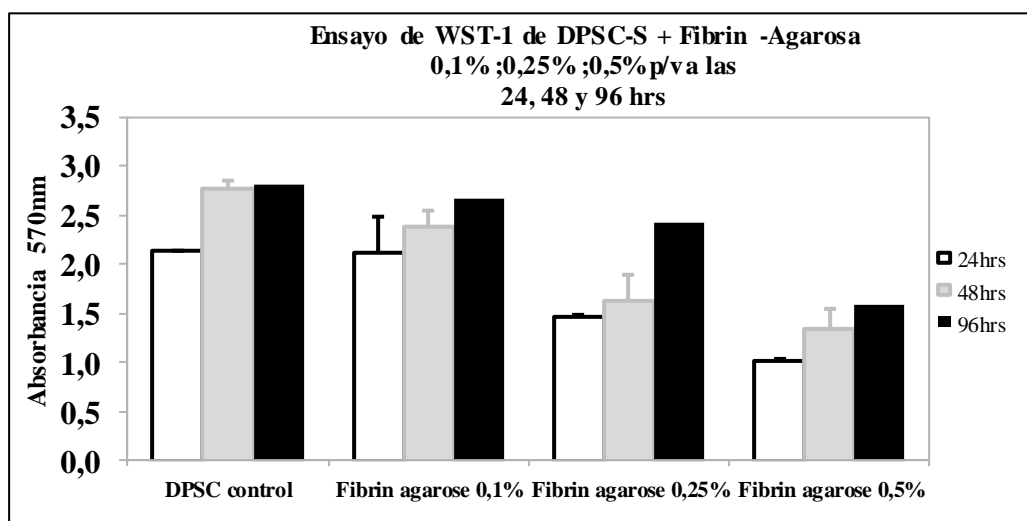


Figura 19: Ensayo de proliferación WST-1 de DPSC según la concentración de fibrina-agarosa a lo largo del tiempo. Los resultados de proliferación de DPSC se expresan como promedios de absorbancia en unidades arbitrarias de densidad óptica (DO) con sus SD.

7.14 Morfología de las DPSC en el andamiaje de fibrina-agarosa

Las DPSC-S teñidos con Calcein/AM se ensayaron a los 7 días en cultivo. El ensayo de viabilidad celular muestra el control de DPSC-S viables y libres el cultivo con alta densidad celular y muy pocas DPSCs muertas. Así mismo en los andamiajes se observan algunos núcleos de DPSCs pero no se observa la morfología celular. También se detectan núcleos teñidos de rojo, indicativos de muerte celular (Figura 20).

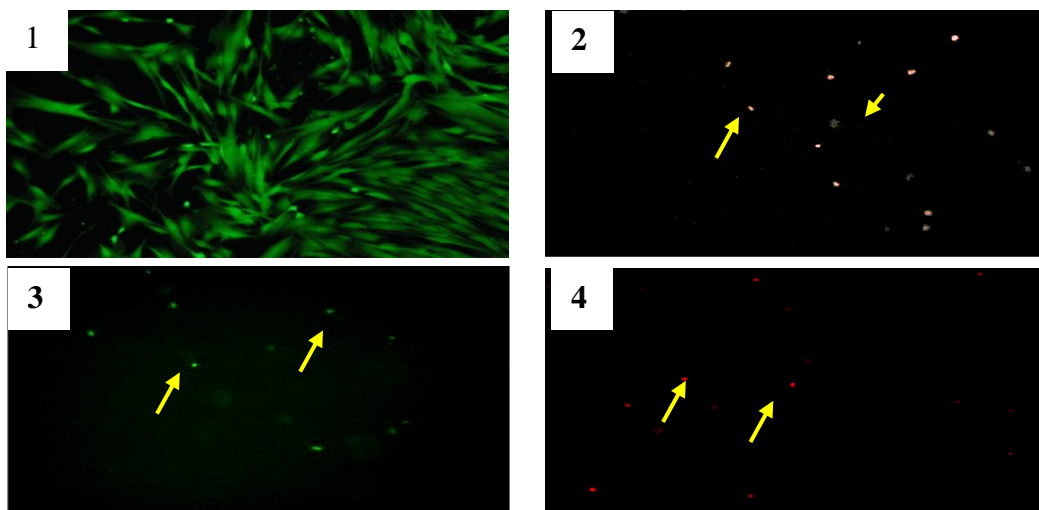


Figure 20: DPSC-S en el andamiaje de fibrina-agarosa al 0,25%p/v teñida con Calcein/AM. DPSC-S controles viables (1), DPSC-S controles muertas (2), DPSC-S viables en fibrina-agarosa 0,25% p/v (3) DPSC-S muertas en fibrina agarosa 0,25% p/v (4); las flechas en amarillo indican los núcleos. Magnificación 10X, barra 100 μ m.

7.15 DPSC-S en el andamiaje de fibrina-agarosa 0,25% p/v en el bloque de dentina.

Las DPSC-S se sembraron en el andamiaje de fibrina-agarosa y se cultivaron en los bloques de dentina. Se demuestra que las DPSC-S proliferaron dentro del andamio y dentro del lumen del bloque de dentina durante los 15 días en cultivo. Las imágenes macroscópicas y microscópicas del bloque de dentina mostraron adherencia del andamio a las paredes del bloque (Figura 21).

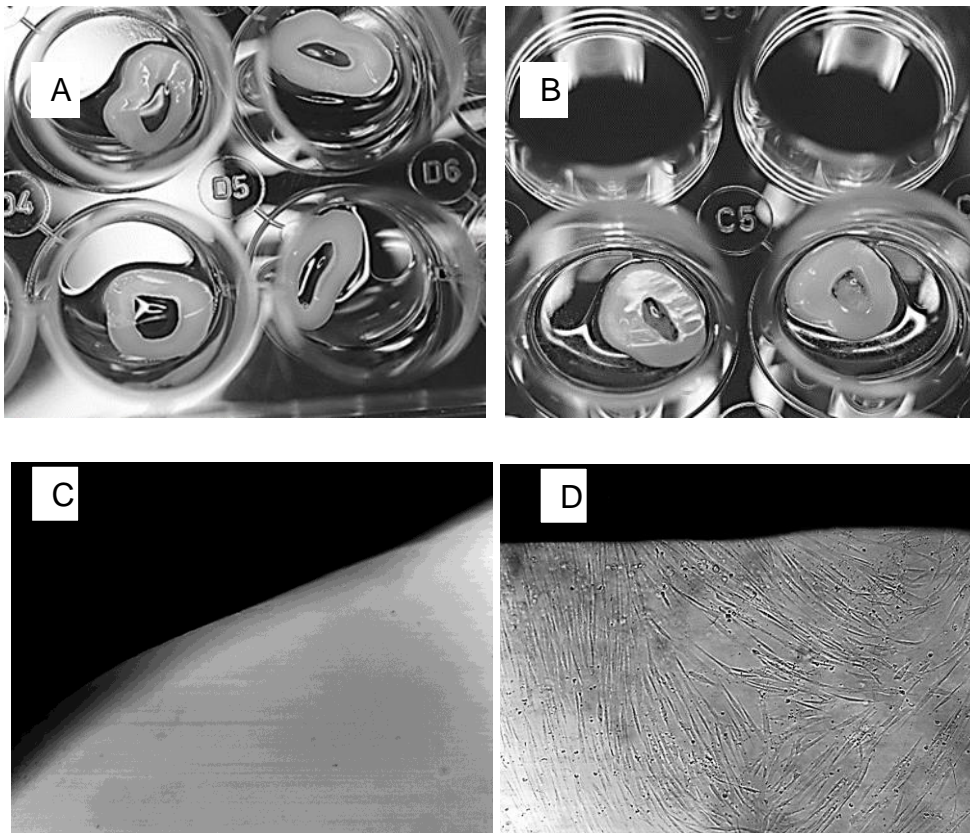


Figura 21: Cortes transversales del bloque de diente de dentina en condiciones de cultivo. Bloques de dentina vacío en medio de cultivo (A). Bloques de dentina en cultivo con andamiaje de fibrina agarosa al 0,25% p/v con DPSC (B), fotos macroscópicas. Lumen del bloque de dentina control con fibrina agarosa 2.5% p/v sin células (C) y lumen de bloque de dentina con fibrina agarosa 0.25% p/v con DPSC-S (D), imágenes microscópicas magnificación 10x.

8.0 DISCUSIÓN

El estudio con las DPSC comenzó en el año 2000 (34). Sin embargo, la mayoría de los estudios con DPSC consideran a MSC derivadas solamente de tejidos pulpaes sanos. Con respecto a las DPSC derivadas de pulpas inflamadas, hay muy pocos estudios (54, 55, 80). Es importante destacar que en este estudio los diagnósticos endodónticos realizados fueron estandarizados según la clasificación de la asociación americana de endodoncia (AAE) (62) lo que lo hace diferente a los estudios previos (54, 55, 80). Las DPSC-S poseen una alta capacidad de proliferación y son capaces de autorrenovarse y se diferencian a varios linajes. En esta tesis doctoral se estudiaron células provenientes de tejido gingival, tejido pulpar sano y con diagnóstico de pulpitis irreversible. Las muestras de pulpa dental y encía se obtuvieron de donantes jóvenes de ambos sexos de edades entre 23 a 44 años, que se considera como rango ideal para donar muestras de tejidos para la expansión de MSC, ya que corresponden a muestras jóvenes en los que se ha descrito que las MSC son fácilmente obtenidas y su proliferación celular es rápida (55, 81) (Anexo Tabla 2).

En este estudio demostramos que la extirpación de la pulpa con el método desarrollado y la biopulpectomía ejemplifican a ambos procedimientos como los adecuados para la obtención de tejidos idóneos como fuentes celulares (Figuras 1 y 2). Las células obtenidas de ambos tejidos demostraron ser autorrenovables y proliferaron en el tiempo con múltiples pasajes. En este estudio los ensayos funcionales se realizaron a MSCs en pasajes entre 3 a 6 (Figura 3) y se logró cultivar, expandir, inmunotipificar y diferenciar a las células derivadas de pulpa cumpliendo los criterios establecidos por la ISCT (7, 91). La caracterización celular concuerda con los estudios previos (18, 19, 34, 80, 81). Se ha descrito que las DPSCs proliferan así como las MSC derivadas de dientes humanos

exfoliados (SHED), probablemente debido a la expresión diferencial de genes involucrados en funciones biológicas similares tales como la proteína TIMP1 (Inhibidor de metaloproteinasas) el cual se encuentra en altos niveles de expresión en SHED; a diferencia de ColI (Cadena alfa del colágeno de tipo I) que se encuentra presente en la matriz extracelular y que se sobreexpresa en DPSCs (92). El inmunofenotipo para las DPSC-S y DPSC-I evidenció un marcaje positivo claro para CD105, CD73 y CD90, así como un marcaje negativo para los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD19 y HLA-DR. Sin embargo, queremos destacar que nuestros resultados de inmunotipificación en las DPSC-I para los marcadores hematopoyéticos mostraron porcentajes de expresión levemente más altos que las DPSC-S (Figura 4) de acuerdo a lo descrito anteriormente (54, 55, 80). Probablemente estas diferencias se deben a que las pulpas con diagnóstico de pulpitis irreversible provienen de un ambiente sujeto a estímulos de factores proinflamatorios liberados como resultado de una lesión que son los que inician los procesos de reparación donde los elementos figurativos aumentan en la línea hematopoyética, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), Interleucinas 2 y 6, factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG), citocinas proinflamatorias entre otros (64, 82, 83, 84). Las DPSC-S y las DPSC-I bajo las condiciones de cultivo de diferenciación descritas en esta tesis mostraron cambios morfológicos evidentes; ambos cultivos celulares adquirieron una forma de estrella característica de los osteoblastos, ya que la tinción de Von Kossa por precipitación de nitrato de plata detecta depósitos de calcio citoplásmico (85). Las células estimuladas para la diferenciación adipogénica mostraron cambios morfológicos más evidentes en el grupo de DPSC-S que en el de las DPSC-I, debido a que las gotas de lípidos en las vacuolas se tiñeron con un color rojo; el colorante rojo oleoso detectó inclusiones de lípidos citoplásmicos por solubilidad celular; sin embargo, en las

DPSC-I, se observó un menor potencial de diferenciación adipogénica, lo que concuerda con varias publicaciones anteriores (85, 86). Las muestras de DPSC-S y DPSC-I estimuladas para diferenciación condrogénica, mostraron cambios morfológicos característicos de una masa celular agrupada que en conjunto generó una matriz que se tiñó de color violeta rojizo característico de los proteoglicanos teñidos con Safranin O (85, 86). (Figura 3). Estas diferencias podrían explicarse en relación al origen celular de la pulpa, es decir, como la pulpa dental forma parte del complejo pulpo-dentinario y su origen es en el tejido ectomesenquimal derivado de la cresta neural, las células de la pulpa influyen en la diferenciación de los tejidos de origen ectodérmico (odontogénico, condrogénico, entre otros), pero, no así del tejido adiposo cuyo origen es distinto (mesodermo) lo que podría explicar lo dificultoso de la diferenciación de las DPSCs a adipocitos (87, 88). El conjunto de resultados de diferenciación trilineal para las DPSC-S y las DPSC-I concordaron con los descritos anteriormente por otros autores y con los criterios establecidos por el ISCT (7) (Figura 5). En los ensayos de proliferación de UFC, se observó que las DPSC-S y DPSC-I tuvieron un comportamiento muy similar entre sí en relación a los % de EUFC. Estos valores no fueron estadísticamente significativos entre ambos grupos celulares, pero, concuerdan con los informados previamente (54). Así mismo, las MSC derivadas de ligamento periodontal muestran valores de % EUFC entre 15% y 35% similares a los de nuestro estudio (89) (Figura 8).

Los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación WST-1 revelaron que las DPSC-S y las DPSC-I poseen capacidades proliferativas muy similares entre las 24 y 72 horas de cultivo. Sin embargo, a partir de las 96 horas, las DPSC-S mostraron una mayor proliferación, y las DPSC-I proliferaron menos después de 96 horas en cultivo, pero, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figuras 6 y 7). El estado inflamatorio

que existe en la pulpa dental con pulpitis irreversible podría explicar estas diferencias, ya que en un estado de inflamación, la pulpa pudo haber activado a las células madre mesenquimales para que se diferencien a otros tipos de células, como odontoblastos o fibroblastos, para reparar los tejidos dañados y por ende proliferarían menos que en un estado sano.

Los estudios histológicos realizados en los explantes pulpares normales e inflamados, permitieron un análisis morfológico cualitativo y cuantitativo, mediante el uso de tinciones como Hematoxilina- Eosina (H-E) (Figura 9) y el Tricrómico de Masson (Figura 10). Las principales diferencias morfológicas entre los explantes de la pulpa dental sana e inflamado están en relación con la desintegración de la matriz de colágeno, la pérdida de la arquitectura y la presencia de restos de dentina que se destaca en el tejido inflamado. Sin embargo, el porcentaje de colágeno en ambos explantes no arrojó diferencias significativas. Los procesos inflamatorios descritos para la pulpitis irreversible generan un daño causado por el aumento del volumen y la compresión dentro de la corona, junto con la presencia de vasos sanguíneos más pequeños que desencadenaron la aparición de amplios lúmenes de vasos sanguíneos o linfáticos, estos últimos se identificaron en los cortes histológicos (2, 48, 90). La osteocalcina cumple la función de aumentar los factores de reparación de la pulpa y estimular la diferenciación de DPSCs a odontoblastos que generan dentina, siendo esta la probable estructura calcificada que observamos en las muestras de pulpa con diagnóstico de pulpitis irreversible en los cortes teñidos con T-M. Las MSCs derivadas de ambos tejidos no presentan diferencias en su morfología ya que en ambos cultivos se observan células fibroblastoides y con núcleo definido. Se destaca que en las DPSC-I se observa una tendencia de un mayor número de núcleos en comparación a las DPSC-S y

además se observan células multinucleadas. Resultados similares se han descrito en MSC aisladas de pulpa dental de ratones (96) (Figuras 10, 11 y 12).

Con respecto a las propiedades inmunomoduladoras de las MSC se ha descrito como un tema muy importante en regeneración tisular, ya que se ha visto que esta capacidad regularía la proliferación de los LT y que el efecto inmunosupresor de estas células generaría un resultado antiinflamatorio lo cual disminuiría el daño (23, 99). En el caso de una regeneración dental, el efecto inmunosupresor de las MSC produciría un efecto antiinflamatorio en la pulpa y en el tejido gingival como resultado de la respuesta inmune local mediada principalmente por linfocitos (30). Un estudio clínico ha confirmado el potencial uso de las células madre derivadas de tejidos dentales en la reparación de un defecto óseo mandibular (33). En el presente estudio se evaluó la capacidad inmunomoduladora de MSCs derivadas de encía y de pulpas sana e inflamada. Nuestros resultados de inmunomodulación *in vitro* en la proporción correspondiente a 1:10, muestran que las GMSC y las DPSC-S tienden a inmunosuprimen la proliferación de LT, sin embargo no son diferencias significativas y concuerdan con los publicados previamente (27, 31,32) (Figura 14). Otros autores han comparado las propiedades inmunomoduladoras en dosis distintas, por ejemplo en proporción 1:100 donde los resultados son dosis dependiente, es decir a razones 1:10 inmunosuprimen y a razón 1:100 tienden a inmunoestimular la proliferación de los LT (27, 31, 32). El efecto inhibitorio o estimulador de la proliferación de los linfocitos T CD3 depende de la proporción utilizada, lo que concuerda con nuestros resultados que evidenciaron que en la proporción 1/10 (DPSC-S/TCD3), las DPSC-S tienden a disminuir la proliferación de los linfocitos T CD3, pero estos datos no mostraron diferencias significativas. Hasta la fecha se ha establecido que las DPSCs inhiben la proliferación de linfocitos T estimulados con PHA, siendo este

efecto incluso mayor que el efecto inmunomodulador de BMSC (100). Las diferencias encontradas a las descritas en la literatura, podrían atribuirse a que los donantes de pulpas corresponden a un grupo distinto de los dadores de linfocitos. Con respecto a este punto, se sugiere recoger la mayor cantidad de información clínica al momento de incluir y seleccionar las muestras, considerando variables tales como edad, sexo y enfermedades asociadas.

Al buscar en la literatura no se encontraron estudios similares en cuanto a la inmunosupresión de MSCs provenientes de pulpa dental inflamada. Sin embargo se encontraron algunos estudios que incorporaron MSC provenientes de otros sitios de la cavidad oral que podrían correlacionarse con nuestros resultados. En un estudio se evaluó a las PDLSCs, sus resultados demuestran que estas células presentan características similares en el inmunofenotipo y tridiferenciación a las BMSCs y las DPSCs. Las BMSCs, DPSCs, PDLSCs y los fibroblastos gingivales (GFs) inhibieron la proliferación de MSP estimulados con un mitógeno, por lo que se sugiere que las PDLSCs, BMSCs, DPSCs y GFs poseen propiedades inmunosupresoras mediadas por factores solubles producidos por los MSP activados (101). En otra investigación *in vitro* se determinaron las propiedades inmunomoduladoras de las SCAP de porcinos, demostrando que estas MSCs inhibían la proliferación de los linfocitos T autólogos estimulados con PHA y además suprimían la proliferación de linfocitos T alogénicos, en dosis dependiente. Los autores concluyeron que las SCAP serían débilmente inmunogénicas suprimiendo la proliferación de linfocitos T *in vitro* mediante mecanismos independientes de la apoptosis celular (102).

Otros investigadores evaluaron la capacidad inmunomoduladora de las PDLSCs diferenciadas a células osteogénicas, y demostraron que estas MSCs no estimulaban la proliferación de linfocitos T alogénicos ni tampoco suprimían la proliferación de

linfocitaria estimulada con PHA, debido a que al incorporar indometacina (inhibidor de la prostaglandina E2 (PGE2)) se restauraba la inhibición de la proliferación de los linfocitos T por parte de las células osteogénicas diferenciadas provenientes de las PDLSCs. Por lo tanto, concluyen que estas células tienen baja inmunogenicidad, sin embargo suprimen la proliferación de linfocitos T *in vitro* mediante la secreción de PGE2 (102).

En esta investigación, la capacidad inmunomoduladora de las DPSCs en la proporción de 1/100 (DPSC-S o DPSC-I /TCD3) demostró un aumento en la proliferación de los linfocitos TCD3. En el único grupo que se obtuvo una diferencia significativa fue en el grupo de las DPSC-I comparadas con el grupo basal. En la literatura no encontramos estudios similares al nuestro que mencionen que en una relación 1/100 (DPSCs/TCD3) las DPSCs derivadas de pulpa fueran capaces de inmunoestimular la proliferación de linfocitos (Figuras 15 y 16). Los resultados encontrados si bien no mostraron diferencias significativas, nos permiten concluir que existe una tendencia de las DPSS-S a inmunosuprimir a los linfocitos TCD3, y de las DPSC-I a inmunoestimular a los linfocitos TCD3. Este hallazgo fue independiente de la proporción utilizada, lo que sugiere que las DPSC-I que provienen de un pulpa en una condición inflamatoria intermedia entre la inmunidad innata y adquirida se vería favorecería la proliferación de los linfocitos, lo cual generaría una respuesta proinflamatoria. Si lográramos entender los mecanismos involucrados en la respuesta tanto antiinflamatoria como proinflamatoria tendríamos una nueva herramienta en base a MSCs para poder tratar diversas enfermedades tanto locales como sistémicas. Los mecanismos celulares y moleculares por los cuales las MSCs ejercen su efecto inmunomodulador sobre los linfocitos aún están siendo estudiados (103). Las DPSC-S presentan un potencial inmunomodulador en cuanto a su capacidad de detectar y controlar la inflamación local en tejidos lesionados mediante la expresión de diversas

citoquinas y quimioquinas (104). El mecanismo de inmunosupresión depende de la acción de la enzima indoleamina-2,3 dioxigenasa (IDO) el cual se induce en presencia de IFN- γ sin la adición concomitante de otras moléculas inmunosupresoras (97,98). La IDO es una enzima que cataliza la degradación del triptófano en la ruta metabólica a quineurina. La inmunosupresión se cree que ocurre por la depresión del triptófano, que es un aminoácido esencial, y la acumulación local de metabolitos, pero estos mecanismos no están completamente dilucidados. La enzima IDO es requerida para la inhibición de células Th1 productoras de IFN- γ y junto a la PGE2 bloquea la actividad de las células NK (97,98). Por lo tanto nuestros resultados de medición de la actividad de la IDO, confirma el efecto inmunosupresor de las DPSC-S que mostraron una mayor actividad IDO en comparación a las DPSC-I ($p=0,034$) (Figuras 17 y 18). A partir de este resultado proyectamos medir otros factores tales como TSG-6, IL-6, PEG2 entre otros que participan en la inmunosupresión (97).

En los experimentos de funcionalidad de las MSC de esta tesis, tales como, proliferación, UFC, tridiferenciación, inmunofenotipo e inmunomodulación se utilizaron células madres mesenquimales derivadas de encía, pulpa sana y de pulpas con diagnóstico de pulpitis irreversible provenientes de un banco celular, el cual mantenía congeladas a las células. Lo que demuestra que el congelamiento y descongelamiento no afectó las propiedades de éstas. Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura, en la cual se utilizaron MSCs provenientes de la papila apical (SCAP) y la pulpa dental (DPSCs), demostrando que no existen diferencias en las características ni en las propiedades funcionales de estas cuando son sometidas a un proceso de crio preservación (100-105).

Otro gran objetivo de este estudio, se relacionaba con la regeneración tisular. En esta tesis doctoral se desarrolló un modelo de bloque de dentina con DPSCs en un andamiaje de

fibrina-agarosa para su potencial uso en la regeneración de la pulpa dental. La fibrina-agarosa al 0,25% p/v fue un hidrogel de fácil manipulación, con una consistencia adecuada que permitió el análisis en cultivo y la caracterización *in vitro*. De acuerdo a reportes anteriores, la viabilidad celular es un factor determinante para la funcionalidad de un tejido artificial; por esa razón, los ensayos de proliferación son pruebas críticas para la viabilidad de las células madre (36, 106-108). En nuestro estudio, diseñamos un andamiaje de fibrina-agarosa con células madre derivadas de diferentes tejidos dentales. Usamos la agarosa porque hay algunos reportes previos que probaron este biomaterial para construir sustitutos biológicos basados en agarosa y fibrina, por lo que la combinación de ambos componentes biológicos formó un biomaterial con aplicación en tejidos artificiales. En este contexto, en los últimos años los andamiajes de fibrina y agarosa se utilizaron con éxito en ingeniería de tejidos para la generación de córnea funcional (109), piel (110), paladar (111), cartílago (112) y nervios periféricos (113,114), demostrando un alto nivel de biocompatibilidad y regeneración tisular. Actualmente, los avances obtenidos con este andamiaje en ingeniería tisular culminaron en la aprobación de este biomaterial por parte de la Agencia Española de Alimentos y Productos Sanitarios según la legislación europea, y actualmente hay dos ensayos en marcha, para la regeneración de la córnea y la piel (115-118).

Todos estos antecedentes previos, hacen pensar que la fibrina-agarosa en combinación con las DPSCs podría ser un modelo adecuado para la regeneración de la pulpa dental. Un hidrogel similar fue bien caracterizado de acuerdo a sus propiedades reológicas (119-120). Debido a que la agarosa es un polisacárido biocompatible adecuado para aplicaciones de ingeniería de tejidos, pero que no contiene factores de crecimiento (121), construimos un andamiaje considerando las propiedades de este gel en combinación con los componentes ricos del PRF, tales como factores de crecimiento como PDGF, TGF- β , IGF, VEGF, factor

de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento de células epiteliales que estimulan el hueso y curación de tejidos blandos (122-123). Nuestros resultados demostraron que el andamiaje de fibrina-agarosa formaba una estructura tridimensional de tal consistencia que permitía una fácil manipulación y consistencia que facilitaba la incorporación de MSCs. El monitoreo por microscopía de las células en cultivo sugirió que las MSC se incorporaron al interior del andamiaje, y se observó que las DPSCs proliferaron de acuerdo al ensayo de WST-1 (Figura 19). El andamiaje de fibrina-agarosa sustentó la proliferación y la supervivencia de las DPSCs. Según otros estudios el ensayo de WST-1, es un método bien descrito para la proliferación celular de las DPSCs (36, 108).

Otros estudios han reportado que el hidrogel Puramatrix™ se ha utilizado con éxito con DPSC (124) y también, Matrigel BD™ con MSCs derivadas de tejido gingival (79). Nuestros resultados describen que la concentración de fibrina-agarosa al 0,25% p/v corresponde a la apropiada que permitió la proliferación celular a lo largo del tiempo. Además, este hidrogel era un biomaterial moldeable que mantenía la viabilidad y proliferación celular, sugiriendo que este modelo de agarosa-fibrina en combinación con DPSCs sería adecuado para la regeneración tisular (Figura 19). Además, demostramos mediante el uso de la tinción fluorescente, que las DPSC-S fueron capaces de sobrevivir y proliferar dentro del andamiaje (Figura 20). Para el desarrollo *in vitro* del modelo de regeneración de la pulpa dental, probamos la compatibilidad del andamiaje de fibrina-agarosa con las DPSC desde un punto de vista pre-clínico. Por esa razón, diseñamos un andamiaje natural enriquecido, de fácil manejo en un modelo de bloque de dentina. Este modelo de bloque podría inyectarse imitando un conducto radicular, mediante el uso de un protocolo de activación de factores de dentina que ha demostrado colaborar en endodoncia regenerativa (125). Propuestas similares anteriores describieron el uso potencial de un

hidrogel comercial PuramatrixTM (124), plasma rico en plaquetas o fibrina rica en plaquetas, colágeno, poliéster, quitosano o hidroxiapatita entre otros (73, 107). Sin embargo, nuestro andamiaje de fibrina-agarosa y DPSCs en el bloque de dentina demostró que las DPSCs proliferan y el biomaterial se adhiere a las paredes de la dentina (Figura 21). Nuestro modelo pre clínico fue diseñado para el futuro uso biológico en la práctica dental incorporando la fibrina-agarosa y el DPSC que se polimerizaría dentro de la cámara pulpar facilitando el éxito de las estrategias regenerativas de endodoncia basadas en MSC. Debemos aceptar que la regeneración dental así como la restauración de un tejido dañado o una nueva matriz de dentina no parece ser una tarea fácil de lograr. En el futuro, se necesitarán otros estudios para analizar la morfología del nuevo tejido dental formado dentro del bloque de dentina para lograr una traslación hacia la clínica.

En conclusión, desarrollamos un andamiaje de fibrina-agarosa que fue fácil de manipular, que permitió la inclusión de DPSCs e incorporó varios factores de crecimiento del PRP que estimularon la proliferación celular, creando así un ambiente adecuado para el uso potencial en la reparación o regeneración de tejidos.

Dentro de las limitaciones de esta investigación, se destaca el bajo número de muestras de donantes analizados, lo que probablemente explica por qué las diferencias entre los resultados no fueron estadísticamente significativas en todas las mediciones. Además, creemos que nuestros resultados podrían complementarse si realizamos análisis inmunohistoquímico de los componentes celulares de los tejidos pulpares, para encontrar patrones específicos o biomarcadores diferenciadores de ambos estados de la pulpa. Proponemos profundizar el estudio funcional de las DPSC-I en la regeneración tisular *in vivo* en un modelo animal. El fácil acceso a las células madre mesenquimales provenientes de pulpa dentaria y de encía y las mínimas complicaciones para el donante, describen a

estos tejidos como una excelente fuente de obtención de MSC, las cuales se podrían utilizar en terapias regenerativas.

9.0 CONCLUSIONES

1.- Sobre la base de nuestros hallazgos, podemos concluir que no existen diferencias en las características y propiedades (inmunofenotipo, tridiferenciación, UFC y proliferación) de las MSCs derivadas del tejido pulpar normal e inflamado analizadas en estas condiciones del estudio pero sí existen diferencias en la capacidad inmunomoduladora de las MSCs obtenidas a partir de pulpas dentarias humanas con diagnóstico de pulpa normal y de pulpitis irreversible.

2.- A partir del análisis histológico de los tejidos pulpares normales e inflamados, podemos concluir que sí existen diferencias morfológicas, sin embargo, éstas no afectan las características y propiedades funcionales tales como el inmunofenotipo, proliferación y el potencial de diferenciación. El tejido inflamado de la pulpa no debe considerarse un material de desecho biológico, ya que hemos demostrado que es una fuente alternativa de células que poseen propiedades similares a las MSCs.

3.- En este estudio las DPSC-S y las DPSC-I presentaron distintas capacidades inmunomoduladoras que deben ser consideradas. Este resultado fue inesperado pero con el resultado de la actividad de la enzima IDO se confirma que las DPSC-S son más inmunosupresoras que las DPSC-I.

4.- Para el desarrollo de un modelo de regeneración tisular mediante el uso de DPSC y un biomaterial natural, podemos concluir que el innovador modelo de bloque de dentina preclínico, en el futuro podría ser testeado *in vitro* en animal para su potencial uso en la práctica dental como una nueva estrategia basada en MSC y andamiajes de fibrina agarosa. Sin embargo, planteamos que deberían evaluarse *in vitro* las propiedades inmunomoduladoras de las DPSC-S y DPSC-I dentro del biomaterial de fibrina-agarosa.

10.0 REFERENCIAS

1. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Investig Clínica.*; 58(5):498–511. (2006).
2. McKay, R. Stem cells—hype and hope. *Nature*, 406(6794), 361-364. (2000).
3. Wong M. Regulation of intestinal stem cells. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. p. 224–8 (2004).
4. Blanpain C, Lowry W, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 118(5):635–48 (2004).
5. Agha-Hosseini F, Jahani M-A, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp: Stem cells from dental pulp. *Clin Transplant*. Mar; 24(2):E23–E28. (2010).
6. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci*; 32(1):149–84. (2009).
7. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. ; 8(4):315–7. (2006).
8. Bianco P., Reginacci M. GS. Bone marrow stromal stem cells:nature, biology and potential applications. *Stem Cells*. 19:180–92. (2001).
9. Pineda C, Londoño C. Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. *Ing biomédica*. 3:58–65. (2009).
10. Zuk P, Ph D, Zhu M. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng*. ; 7(2):211–28.(2001).

11. Guerrero DP, Romero JA, Marcela V, Pardo R. Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. *NOVA.*; 5(8):114–26. (2007).
12. Ryan J, Barry F, Murphy M, Mahon B. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation* 2:8. (2005).
13. Croitoru-Lamoury J, Lamoury F, Zaunders J, Veas L, Brew B. Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN-beta, and Copaxone. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 27: 53-64. (2007).
14. Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res.*; 34:3–15. (2003).
15. Blau H, Brazelton T, Weimann J. The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell.* 105(7):829–41. (2001).
16. Herzog E, Li C, Krause D. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 102:3483–93. (2003).
17. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 116(5):639–48. (2004).
18. Friedlander L, Cullinan M, Love R. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J.* 42(11):955–62. (2009).
19. Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.*; 6(2):230–47. (1968).

20. Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C, et al. Angiogenic Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *PLOS ONE*. 7 e; 8(8):e71104. 67. (2013).
21. Niño M, Carlos J, Calixto B, Pilar A del, Bermúdez Olaya C. Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica. *Acta Odontológica Venez.*; 46(3):361-9. (2008).
22. Mata-Miranda M, Vázquez-Zapién GJ, Sánchez-Monroy V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatol Reprod Humana.* ; 27(3):194-9. (2013).
23. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*; 30(1):42-8. (2002).
24. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143–147. (1999).
25. Gao F, Chiu S, Motan D, Zhang Z, Chen L, Ji H, Tse H, Fu Q, Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death and Disease* 7, e2062. (2016).
26. Wang L, Zhao Y, Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration. *J Dent Res*. 91(11):1003–10. (2012).
27. Machado C, Telles P, Nascimento I. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol hemoter*. 35(1):62–7. (2013).

28. Liu Y, Wang S, Shi S. The role of recipient T cells in mesenchymal stem cell-based tissue regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*; 44(11):2044–50. (2012)
29. Alge DL, Zhou D, Adams LL, Wyss BK, Shadday MD, Woods EJ, Gabriel Chu TM, Goebel WS. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med.*; 4(1):73–81. (2011).
30. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med.*; 18(2):128–34. (2012).
31. Maumus M, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. *Biochimie*; 95(12):2229–34. (2013).
32. Yi T & Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch pharm res.*; 35(2):213–21. (2012).
33. Mundra V, Gerling I, Mahato R. Mesenchymal stem cell-based therapy. *Mol Pharm*; 10(1):77–89. (2013).
34. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:13625 - 13630. (2000).
35. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res*. 1; 81(8):531–5. (2002).
36. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Sanchez-Quevedo MC, Campos A, et al. Average cell viability levels of human dental pulp

- stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy*. 2013;15:507e18
37. Rodríguez-Lozano F, Bueno C, Insausti C, Meseguer L, Ramírez M, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleta J. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Inter Endo J*. 44(9):800–6. (2011).
 38. Tomic ;Deasy BM, Li Y, Huard J. Tissue engineering with muscle-derived stem cells. *Curr Opin Biotechnol.*; 15(5):419–23. (2004).
 39. Zuk P, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J, Katz A, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*; 7(2):211–28.
 40. De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, Luyten F. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 44(8):1928–42. (2001).
 41. Zarnett R, Salter R. Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. *Can J Surg*. 32:171–4. (1989).
 42. Wright WE, Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol.*; 20(7):682–8. (2002).
 43. McKay RD. Stem cell biology and neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 29; 359(1445):851–6. (2004).
 44. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Top.*; 28(1):2–23. (2013).
 45. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher L, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS*. 100(10):5807–12. (2003).

46. Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold PM. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet.*; 364:149–55. (2004).
47. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *J Endod.* ; 34(2):166–71. (2008).
48. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. Csete M, editor. *PLoS ONE.* 20; 1(1):e79. (2006).
49. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.*; 24(2):155–65. (2005).
50. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res.*; 56(3):151–65. (2012).
51. Mitrano T, Grob M, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz P, Fierro F, Quintero A, Chaparro A, Sanz A. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J Periodontol* 81(6):1–24. (2010).
52. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD.. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol.* 15; 183(12):7787–98, (2009).
53. Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. *Am J. Reprod Immunol.* 67(1):1–8, (2012).

54. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med.* ; 5(4):617–31. (2010).
55. Pereira L, Rubini M, Silva J, Oliveira D, Silva I, Poças-Fonseca M, et al. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int Endod J.*; 45:1080–90. (2012).
56. FACD, SCMDF, *Vías de la pulpa*. 8a, Elsevier, España, (2002).
57. C. Yu, P.V. Abbott, An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury, *Aust. Dent. J.* 52 (1 Suppl) S4–S16. (2007).
58. K.M. Hargreaves, H.E. Goodis, S. Seltzer (Eds.), *Seltzer and Bender's Dental Pulp*, 1st edition, Quintessence Pub Co, Chicago, 500 p. (2002).
59. Goldberg M, Hirata A. *The Dental Pulp: Composition, Properties and Functions*. *JSM Dent* 5(1): 1079. (2017).
60. Pashley DH, Walton RE, Slavkin HC. *Histology and physiology of the dental pulp*. Ingle JI Bakland LK Herausgeber *Endod Williams Wilkins Baltim.*; 320–54. (1994).
61. P. Barnash Ross, *Atlas de Histología Descriptiva*. Edición: 1. Buenos Aires; Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A., 388 p (2012).
62. Glickman GN. AAE consensus conference on diagnostic terminology: background and perspectives. *J Endod*; 35:12:1619. (2009).
63. Pérez Ruiz, A. O., Roseñada Cepero, R., Grau León, I., & González Ramos, R. M. Interpretación fisiopatológica de los diferentes estadios de una pulpitis. *Revista Cubana de Estomatología*, 42(2), 0-0. (2005).

64. Hahn, C. L., & Liewehr, F. R. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *Journal of endodontics*, 33(3), 213-219. (2007).
65. Trowbridge, H. O. 2. Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries. *Journal of endodontics*, 7(2), 52-60. (1981).
66. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.*; 35(2):213-21. (2012).
67. Maroun-Eid C, Ortega-Hernández A, Abad M, García-Donaire JA, Barbero A, Reinares L, et al. Niveles de células progenitoras endoteliales circulantes en pacientes hipertensos tratados. *Hipertens Riesgo Vasc.* ; 32(4):142-50.(2015).
68. Stivers KB, Beare JE, Chilton PM, Williams SK, Kaufman CL, Hoying JB. Adipose-derived cellular therapies in solid organ and vascularized-composite allotransplantation: *Curr Opin Organ Transplant.*; 22(5):490-8. (2017).
69. Westin CB, Trinca RB, Zuliani C, Coimbra IB, Moraes ÂM. Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan-xanthan scaffolds in the presence of kartogenin. *Mater Sci Eng C.* noviembre de; 80:594-602. (2017).
70. Datta I, Bhadri N, Shahani P, Majumdar D, Sowmithra S, Razdan R, et al. Functional recovery upon human dental pulp stem cell transplantation in a diabetic neuropathy rat model. *Cytherapy* 19(10):1208-1224. (2017).
71. Trope M. Treatment of the Immature Tooth with a Non-Vital Pulp and Apical Periodontitis. *Dent Clin N Am.*, 54: 313–324. (2010).

72. Cordeiro M, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör J. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 34:962-9. (2008).
73. Huang Z1, Newcomb CJ, Bringas P Jr, Stupp SI, Snead ML, Wang S, Nagrath D, Chen PC, Berthiaume F & Yarmush ML. Biological synthesis of tooth enamel instructed by an artificial matrix. *Biomaterials*; 35: 9202–9211. (2010).
74. Wang S, Nagrath D, Chen PC, Berthiaume F, Yarmush ML. Three-dimensional primary hepatocyte culture in synthetic self-assembling peptide hydrogel. *Tissue Eng.*, 14: 227-336. (2010).
75. Awad H, Wickham M, Leddy H, Gimble J & Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 25: 3211–3222 (2004).
76. Garzón I, Miyake J, Gonzales M, Carmona R, Cerda C, Sanchez M, Campos A & Alaninos M. Wharton's Jelly Stem Cells: A Novel Cell Source for Oral Mucosa and Skin Epithelia Regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, 2: 625–632. (2013).
77. Fioravanti C, Frustaci I, Armellin E, Condò R, Arcuri C & Cerroni I. Autologous blood preparations Rich in platelets, fibrin and Growth factors. *Oral and Implantology*, 8:96-113. (2015).
78. Akeda K, An HS, Okuma M, et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*, 1: 1272–1280. (2006).

79. Brizuela C; SaintJean N; Garchitorena N; Rodriguez I, Inostroza C. Matrigel BD, A Biocompatible Scaffold that Improves Gingival Mesenchymal Stem Cells Int. J. Morphol.34(2):692-698. (2016).
80. Wang Z,Pan J,Wright JT, Bencharit S, Zhang S, Everett ET, Teixeira FB, Preisser JS. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. J Endod, 36(5): 820-5. (2010).
81. G.T.-J. Huang, 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, 88(9): 792–806. (2009).
82. Pezelj-Ribaric, S., Anic, I., Brekalo, I., Miletic, I., Hasan, M., & Simunovic-Soskic, M. Detection of tumor necrosis factor α in normal and inflamed human dental pulps. Arch Med Res; 33(5): 482-484. (2002).
83. Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., & Jansen, J. A. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tiss Eng.; 12(10): 2813-2823. (2006).
84. Aksel, H., & Huang, G. T. J. Combined Effects of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein 2 on Odonto/Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro. J Endod; 43(6): 930-935. (2017).
85. Boyle, M., Chun, C., Strojny, C., Narayanan, R., Bartholomew, A., Sundivakkam, P., & Alapati, S. Chronic inflammation and angiogenic signaling axis impairs differentiation of dental-pulp stem cells. PLoS One; 9(11): e113419. (2014).
86. Brizuela C, Galleguillos S; Carrión F; Cabrera C; Luz P, Inostroza C. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. Int. J. Morphol; 31, (2): 739-46. (2013).

87. Kwack, K. H., Lee, J. M., Park, S. H., & Lee, H. W. Human Dental Pulp Stem Cells Suppress Alloantigen-induced Immunity by Stimulating T Cells to Release Transforming Growth Factor Beta. *J Endod*; 43(1): 100-108. (2017).
88. Tsai, A. I., Hong, H. H., Lin, W. R., Fu, J. F., Chang, C. C., Wang, I., & Yen, T. H. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp. *BioMed Res Int*; 2851906. (2017).
89. Jontell, M., Gunraj, M. N., & Bergenholtz, G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res*; 66(6): 1149-1153. (1987).
90. Nagatomo, K., Komaki, M., Sekiya, I., Sakaguchi, Y., Noguchi, K., Oda, S. & Ishikawa, I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal research*, 41(4), 303-310. (2006).
91. Liu Y, Wang S, Shi S. The role of recipient T cells in mesenchymal stem cell-based tissue regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*; 44(11):2044–50, (2012).
92. Abdullah M, Abdullah S, Omar N, Mahmood Z, Fazliah Mohd Noor S, Kannan T, Mokhtar K. Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes. *Cell Biol Int.*, 38(5):582-90, (2014).
93. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*; 18:75-83, (2009).
94. Jacobs SA1, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol.* 91(1):32-9. doi: 10.1038/icb.2012.64. (2013).

95. Alipour R1, Adib M, Masoumi Karimi M, Hashemi-Beni B, Sereshki N. Comparing the immunoregulatory effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 28; 12(4):331-44. (2013).
96. Kermani Sh, Megat Abdul Wahab R, Zarina Zainol Abidin I, Zainal Ariffin Z, Senafi S, Hisham Zainal Ariffin Sh. Differentiation capacity of mouse dental pulp stem cells into osteoblasts and osteoclasts. *Cell J.*; 16(1):31-42. (2014).
97. Liangyu Lin, Liming Du. The role of secreted factors in stem cells-mediated immune regulation *Cellular Immunology* 326 24–32. (2018).
98. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L’huillie A. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*; 27(8):1954-62. (2009).
99. Zhao RC, Liao L, Han Q. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy. *J Lab Clin Med* 19; 143(5):284–91. (2004).
100. Di Nicola M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*; 99(10):3838–43. (2002).
101. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol.* 219(3):667–76. (2009).
102. Tang R, Ding G. Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs.* ; 191(5):357–64. (2010).
103. Nakashima M, Iohara K, Murakami M. Dental pulp stem cells and regeneration. *Endod Top* 23; 28(1):38–50. (2013).

104. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, and Shi S, et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol*; 223(2):415–22. (2010).
105. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang F-C, Byers M a, Chu T-MG, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods*. 14(2):149–56. (2008).
106. Garzón I, Miyake J, Gonzales M, Carmona R, Cerda C, Sanchez M, Campos A & Alaninos M. Wharton's Jelly Stem Cells: A Novel Cell Source for Oral Mucosa and Skin Epithelia Regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*; 2: 625–632. (2013).
107. Bottino C.; Pankajakshan D.; Nör J. Advanced Scaffolds for Dental Pulp and Periodontal Regeneration. *Dental Clinics of North America*; 61: 689-711. (2017).
108. Martín-Piedra M., Garzón I., Oliveira A., Alfonso-Rodriguez C., Carriel V., Scionti G., and Alaminos M. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*; 16: 266-277. (2014).
109. Alaminos M.; Sánchez-Quevedo M.; Muñoz-Ávila J.; Serrano D.; Medialdea S.; Carreras I.; Campos A. Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 47: 3311-3317. (2006).
- 110.V. Carriel, I. Garzon, J.M. Jimenez, A.C. Oliveira, S. Arias-Santiago, A. Campos, M.C. Sanchez-Quevedo, M. Alaminos, Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials, *Cells Tissues Organs*. 196 (2012) 1–12.

111. R. Fernández-Valadés-Gámez, I. Garzón, E. Licerias-Licerias, A. España-López, V. Carriel, M.-Á. Martín-Piedra, M.-Á. Muñoz-Miguelsanz, M.-C. Sánchez-Quevedo, M. Alaminos, R. Fernández-Valadés, Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect, *Biomed. Mater.* 11 (2016) 15015.
112. L. García-Martínez, F. Campos, C. Godoy-Guzmán, M. del Carmen Sánchez-Quevedo, I. Garzón, M. Alaminos, A. Campos, V. Carriel, Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels, *Histochem. Cell Biol.* 147 (2017) 83–95.
113. V. Carriel, J. Garrido-Gómez, P. Hernández-Cortés, I. Garzón, S. García-García, J.A. Sáez-Moreno, M. Del Carmen Sánchez-Quevedo, A. Campos, M. Alaminos, Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration., *J.Neural Eng.* 10 (2013) 26022.
114. V. Carriel, I. Garzón, A. Campos, M. Cornelissen, M. Alaminos, Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J.Tissue Eng. Regen. Med.* (2014).
115. ClinicalTrials.gov, Allogeneic Tissue Engineering (Nanostructured Artificial Human Cornea) in Patients With Corneal Trophic Ulcers in Advanced Stages, Refractory to Conventional (Ophthalmic) Treatment - Full Text View - ClinicalTrials.gov, (2013).
116. M. González-Andrades, R. Mata, M. Del Carmen González-Gallardo, S. Medialdea, S. Arias-Santiago, J. Martínez-Atienza, A. Ruiz-García, L. Pérez-Fajardo, A. Lizana-Moreno, I. Garzón, A. Campos, M. Alaminos, G. Carmona, N. Cuende, A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and

feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment, *BMJ Open*. 7 (2017) 1–10.

117. A. Campos Muñoz, Generation and clinical application of an artificial skin model created by tissue engineering in Granada: a model of translational medicine, *Actual. Medica*. 101 (2016)65–65.

118. Licerias-Licerias E1, Garzón I, España-López A, Oliveira A, García-Gómez M, Martín-Piedra M, Roda O, Alba-Tercedor J, Alaminos M, Fernández-Valadés R. Generation of a bioengineered autologous bone substitute for palate repair: an in vivo study in laboratory animals. *J Tissue Eng Regen* 11: 1907-1914. (2017).

119. Rodríguez IA, López-López MT, Oliveira AC, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M, Durán JD. Rheological characterization of human fibrin and fibrin-agarose oral mucosa substitutes generated by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*; 6:636-44. (2012).

120. Mosesson M. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* ; 3:1894-904. (2005).

121. Mauck RL, Yuan X, Tuan RS. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis Cartilage.* ; 14 2:179-89. (2006).

122. Fioravanti C, Frustaci I, Armellini E, Condò R, Arcuri C & Cerroni I. Autologous blood preparations Rich in platelets, fibrin and Growth factors. *Oral and Implantology*; 8:96-113. (2015).

123. Kaur P. and Puneet V. Platelet-rich plasma: A novel bioengineering concept. *Trends Biomater Artif Organs.* ; 25:86–90. (2011).

124. Cavalcanti B, Zeitlin B & Nör J. A Hydrogel Scaffold That Maintains Viability and Supports Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Dent Mater*; 29: 97–102. (2013).
125. Martin DE, De Almeida JF, Henry M, Khaing Z, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod*. 40:51-55. (2014).

ANEXOS

Código muestra	Género donante	Edad donante	Pieza dental	Diagnóstico	MSC
1	Femenino	23	Tercer molar	Pulpa/encía sana	DPSC-S GMSC
2	Femenino	26	Tercer molar	Pulpa/encía sana	DPSC-S GMSC
3	Masculino	26	Tercer molar	Pulpa/encía sana	DPSC-S GMSC
4	Masculino	35	Tercer molar	Pulpa/encía sana	DPSC-S GMSC
5	Femenino	30	Tercer molar	Pulpa/encía sana	DPSC-S GMSC
6	Masculino	33	2.1	Pulpitis irreversible	DPSC-I
7	Femenino	44	1.5	Pulpitis irreversible	DPSC-I
8	Masculino	38	1.5	Pulpitis irreversible	DPSC-I
9	Femenino	23	1.6	Pulpitis irreversible	DPSC-I
10	Masculino	28	2.1	Pulpitis irreversible	DPSC-I

Tabla 2: Información de los donantes y sus tejidos dentales usados en esta tesis.

Universitat Internacional
de Catalunya

Campus Barcelona
Immaculada, 22
08017 Barcelona, Spain
T. +34 932 541 800
www.uic.es

UIC
barcelona

**ESCUELA DE DOCTORADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMUNICADO RESOLUCIÓN SOLICITUD DE ADMISIÓN**

Barcelona, 3 de marzo de 2016

Apreciada Carolina Inostroza,

Por la presente le comunico que, en relación al Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, desde la dirección de la línea de *investigación básica y aplicada en odontología*, de acuerdo a los criterios de valoración de las solicitudes de admisión (integración en la línea de investigación, CV del candidato, trayectoria académica del solicitante y número de plazas disponibles), ha resuelto ADMITIR su solicitud a los estudios de doctorado para el curso 15-16.


Universitat Internacional
de Catalunya
Escola de Doctorat

UIC
barcelona

Marta Gámez
Secretaría Escuela de Doctorado



Santiago, 7 de Diciembre de 2016

Informe del Comité de Ética Local del Centro de Salud Universidad de los Andes

Bq. MSc. Carolina Inostroza Silva
Profesora Asistente Extraordinaria.
Facultad de Odontología
Presente:

De nuestra consideración.

Junto con saludarle cordialmente, le informamos que en virtud de los antecedentes que Usted entregó, el Comité de Ética Local del Centro de Salud (CESA) ha revisado el proyecto de investigación titulado: "Propiedades Inmunomoduladoras de células madres mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental *in vitro*" y ha decidido aprobarlo.

Este Comité estima que el tema a tratar es de interés científico y se desarrollará en forma original, y que el Consentimiento Informado es adecuado. No se vulneran los derechos de los pacientes. Se especifican los objetivos del estudio, se señala la voluntariedad de la participación, la confidencialidad del manejo de la información, además de especificar la manera de ubicar al investigador responsable en caso de ser necesario. Tomando en cuenta lo anteriormente enunciado, este Comité de Ética Local no presenta reparos éticos en la realización de este proyecto con pacientes del CESA

Sin otro particular, saludan atentamente.

Dr. Francisco Rodriguez
Presidente

Jorge Landeta P.
Secretario

Comité Ética
Centro de Salud
Universidad de los Andes



Universidad de
los Andes



CONSENTIMIENTO INFORMADO

"Donación voluntaria de tejido pulpar para la obtención de células madre con fines de investigación".

Estimado paciente, usted ha sido invitado a donar el tejido pulpar de su pieza dentaria que se origina de una exodoncia o extracción dental en algunos casos de pieza sana por motivos de Ortodoncia y en otros casos por pulpitis irreversibles. En esos procedimientos se extrae la pulpa o nervio para ser estudiado en el laboratorio, en el marco de un proyecto de investigación en ciencias básicas, titulado "**Propiedades inmunomoduladoras de células madre mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental *in vitro***".

El objetivo de la información que a continuación se detalla, es ayudarlo a tomar la decisión de hacer o no efectiva esta donación voluntaria. Por favor, tome el tiempo que crea necesario para leer cuidadosamente este documento. Puede solicitarle a su odontólogo que le explique cada palabra o información que no le quede suficientemente clara. Su participación en este estudio es completamente voluntaria.

El objetivo general de esta donación voluntaria es:

- Contribuir a la investigación en células madres de origen dentario.

¿En qué consiste mi participación?

Su participación consiste en donar una pequeña muestra de pulpa, la cual le será extraída durante su tratamiento dental prescrito.

Procedimiento:

Durante su tratamiento dental usted será sometido a un procedimiento, donde se le extraerá un trozo de pulpa.

Costos:

Este procedimiento no le significara ningún costo.

Beneficios:

Usted no recibirá ningún beneficio asociado a esta donación.

Riesgos:

No existen riesgos asociados a este procedimiento, Sin embargo, podrá experimentar alguna leve molestia las 48 horas siguientes a la intervención asociado al tratamiento dental realizado.

¿Tiene Ud. necesariamente que participar en esta investigación?

Su participación es absolutamente voluntaria y tiene plena libertad de decidir si participa o no en esta investigación. El tratamiento que prescribirá su odontólogo seguirá siendo el mismo, independiente de la opción que usted elija.

Confidencialidad:

Los antecedentes de los pacientes y los resultados de las evaluaciones realizadas en relación con esta investigación, serán cautelados con absoluta confidencialidad. No se entregarán su nombre en posibles publicaciones sobre el resultado del estudio. Tampoco se planea efectuar análisis genéticos de ninguna especie, u otras investigaciones, con las células obtenidas desde su pulpa.

Yo doy fe que se me ha explicado el objetivo de esta donación y los procedimientos a emplear. También se han contestado todas mis preguntas, y he leído este formulario de consentimiento detenidamente y en su totalidad.

Mi firma, a continuación, indica que estoy dispuesto a donar una muestra de pulpa en forma voluntaria.

Fecha: _____

Nombre Paciente: _____

Rut: _____

Firma: _____

“Yo, el odontólogo tratante, he explicado el propósito de esta Donación, los procedimientos del estudio, y he contestado toda pregunta acerca de éste, a mi mejor saber y entender”

Si existiera alguna duda por favor contactar a Dra. Claudia Brizuela Cordero al fono 226181166.

Fecha: _____

Testigo: _____

Tiene derecho de guardar una copia de este documento después de firmarlo usted y su odontólogo.

Firma del paciente

Firma del Odontólogo





Servicio de Salud Metropolitano Oriente
Comité de Ética Científico

PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 14 de Marzo de 2017, el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó el Proyecto de Investigación Clínica, titulado:

“Propiedades inmunomodulatorias de células madres mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental in vitro”.

y que conducirá, como Investigador Principal **MSc Carolina María Inostroza Silva** en la Facultad de Odontología de la Universidad de los Andes, y la colaboración como Co-investigador de la Dra. Claudia Isabel Brizuela Cordero.

Se analizó y aprobó los siguientes documentos del Proyecto:

- Proyecto de Investigación “Propiedades inmunomodulatorias de células madres mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental in vitro”.
- Resumen Ejecutivo.
- Consentimiento Informado para el estudio “Propiedades inmunomodulatorias de células madres mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental in vitro”, fechado por el CEC del S.S.M. Oriente el 28 de Marzo de 2017.

Tomó conocimiento de:

- Evaluación metodológica Universidad de Los Andes.
- Carta de aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Los Andes.
- CV de Dra. Claudia Isabel Brizuela Cordero.
- CV de MSc Carolina María Inostroza Silva.
- Carta de compromiso del Investigador.

- Informe del Comité de Ética de la Universidad de Los Andes.

Envío a usted la nomina de los miembros permanentes del CEC del S.S.M. Oriente al 28 de Marzo de 2017.

Dra. Sara Chernilo S.	Broncopulmonar (Presidente)	Inst. Nacional del Tórax
Dra. M. Esther Meroni L.	Geriatra (Secretaria)	Inst. Nac. de Geriatria
Dr. Ricardo Vacarezza	Asesor en Bioética	No institucional
EU Elena Nuñez M.	Coordinadora	No institucional
Dr. Carlos Rey C.	Cardiólogo	Hospital del Salvador
Dr. Rómulo Melo Monsalve	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugia
Dr. Manuel Sedano Lorca	Gineco-Obstetra	Hospital Dr. Luis Tisné
Dr. Lientur Taha M.	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugia
Dr. Jorge Plasser Troncoso	Cirujano- Oncólogo	Hospital del Salvador
Sra. Angélica Sotomayor	Abogado	No institucional
Sr. Hugo Gutiérrez Guerra	Miembro de la Comunidad	No institucional



Dra. Maria Esther Meroni Lays
Secretaria



Santiago, 28 de Marzo de 2017

Universitat Internacional
de Catalunya

Campus Barcelona
Immaculada, 22
08017 Barcelona, Spain
T. +34 932 541 800
www.uic.es

UIC
barcelona

ESCUELA DE DOCTORADO

Barcelona, 16 de octubre de 2017

Apreciada Carolina Inostroza

Por la presente le comunico que la Comisión Académica de Doctorado en Ciencias de la Salud ha acordado aceptar los cambios solicitados en la dirección de su proyecto.

Título de la tesis: Efecto de la inflamación local del complejo pulpo dentinario en las propiedades inmunomoduladoras de células madres mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental in vitro.

Dirección: CARRION ARRIAGADA, Flavio

Tutor: CASALS FARRÉ, Núria


Universitat Internacional
de Catalunya
Escola de Doctorat

UIC
barcelona

Sònia Soriano
Secretaria Escuela de Doctorado

Universitat Internacional
de Catalunya

Campus Barcelona
Immaculada, 22
08017 Barcelona, Spain
T. +34 932 541 800
www.uic.es

UIC
barcelona

ESCUELA DE DOCTORADO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
EVALUACIÓN CURSO ACADÉMICO 16-17

Barcelona, 2 de febrero de 2018

Apreciada Carolina

Por la presente le comunico que la Comisión Académica del programa de Doctorado en Ciencias de la Salud (CAD) en relación al siguiente proyecto de tesis:

Título: Propiedades inmunomodulatorias de células madres mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental in vitro

Doctorando: INOSTROZA SILVA, Carolina

Director: Dr. CARRION ARRIAGADA, Flavio

Tutor: Dra. CASALS FARRÉ, Núria

Resuelve que el trabajo desarrollado por el doctorando durante el curso académico 16-17 de acuerdo al Documento de Actividades (DAD) presentado, ha sido evaluado FAVORABLEMENTE.


Universitat Internacional
de Catalunya
Escola de Doctorat

UIC
barcelona

Sònia Soriano
Secretaría Escuela de Doctorado



APROVACIÓ PROJECTE PEL CER/ APROBACIÓN PROYECTO POR EL CER

Codi de l'estudi / Código del estudio: CBAS-2018-06
 Versió del protocol / Versión del protocolo: 1.0
 Data de la versió / Fecha de la versión: 10/04/2018
 Títol / Título: Propiedades inmunomoduladoras de células madre mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental in vitro

Sant Cugat del Vallès, 18 d'abril de 2018

Investigadors/es: Carolina Inostroza Silva, Investigador responsable Universidad de Los Andes, Santiago, Chile.
 Flavio Camion Ariagada, Director de Tesis, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.
 Claudia Brizuela Cordero, Coinvestigador Universidad de Los Andes, Santiago, Chile.
 Núria Casals Farré, Tutora de Tesis, Universitat Internacional de Catalunya (UIC)

Títol de l'estudi / Título del estudio: Propiedades inmunomoduladoras de células madre mesenquimales de origen pulpar: estudio experimental in vitro

Benvolgut/da,

Valorat el projecte presentat, el CER de la Universitat Internacional de Catalunya, considera que, el contingut de la investigació, no implica cap inconvenient relacionat amb la dignitat humana, tracte ètic per als animals ni atempta contra el medi ambient, ni té implicacions econòmiques ni conflicte d'interessos, però no s'han valorat els aspectes metodològics del projecte de recerca degut a que tal anàlisi correspon a d'altres instàncies.

Per aquests motius, el Comitè d'Ètica de Recerca, **RESOLT FAVORABLEMENT**, emetre aquest **CERTIFICAT D'APROVACIÓ**, 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 sol·licitat novament a la revisió i aprovació del CER.

Atentament,

Apreciad@,

Valorado el proyecto presentado, el CER de la Universidad Internacional de Catalunya, considera que, el contenido de la investigación, no implica ningún inconveniente relacionado con la dignidad humana, trato ético para los animales, ni atenta contra el medio ambiente, ni tiene implicaciones económicas ni conflicto de intereses, pero no se han valorado aspectos metodológicos del proyecto de investigación debido a que tal análisis corresponde a otras instancias.

Por estos motivos, el Comité d'Ètica de Recerca, RESUELVE FAVORABLEMENTE, emitir este CERTIFICADO DE APROBACIÓN, para que pueda ser presentado a las instancias que así lo requieran.

Me permito recordarle que si el proceso de ejecución se produjera algún cambio significativo en sus planteamientos, debería ser sometido nuevamente a la revisión y aprobación del CER.

Atentamente,


Dr. Josep Argemí
 President CER-UIC

