

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Estomatología



VNIVERSITATIS VALENTINAE

**“Obtención y caracterización de
células madre de pulpa dental
humanas e interacción con β -fosfato
tricálcico”**

Escrita y presentada por:

José Viña Almunia

Dirigida por:

Doña Consuelo Borrás Blasco

Don Miguel Peñarrocha Diago

Don José Viña Ribes

Valencia, 2013

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Estomatología

Universidad de Valencia



VNIVERSITATIS · VALENTINAE

Dña. Consuelo Borrás Blasco, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de Universidad de Valencia.

D. Miguel Peñarrocha Diago, Catedrático de Cirugía Bucal de la Facultad de Medicina y Odontología de Universidad de Valencia.

D. José Viña Ribes, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Certificamos que D. José Viña Almunia, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado **“Obtención y caracterización de células madre de pulpa dental humanas e interacción con β -fosfato tricálcico”**, el cual reúne, a nuestro juicio, las condiciones exigibles para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmamos la presente en Valencia a..... de 2013.

Prof. Dra. Consuelo Borrás Blasco

Prof. Dr. Miguel Peñarrocha Diago

Prof. Dr. José Viña Ribes

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a un **Proyecto de Investigación Fundamental Orientada a la Transmisión de Conocimiento a la Empresa (TRACE)**.

Agradecimientos

A la Profesora Consuelo Borrás Blasco, por la dirección de este trabajo, por enseñarme cómo funciona un laboratorio de investigación, y por su apoyo desde el primer día.

Al Profesor Miguel Peñarrocha Diago, por la dirección de este trabajo y por ser, desde hace ya muchos años, mi maestro en el campo de la cirugía e implantología bucal.

A mi padre, por la dirección de este trabajo, por inculcarme, con sus consejos y sus actos, tantos valores, y ayudarme siempre a tomar la decisión correcta.

A Juan Gambini, por su cercanía, amistad y ejemplo, y por ayudarme en tantísimos aspectos todos estos años.

A Marya El Alamy, por la realización de la parte básica de esta Tesis. Por su forma de ser tan perfeccionista y meticulosa, que ha facilitado tanto la ejecución de estos trabajos.

A todos mis compañeros de la Unidad de Cirugía Bucal: Celia, Bárbara, Sonnica, Minerva, Tony, Teresa, Sandra, Cris, Jose, Cris Palma, Javi, Pepe, Amparo, Juan, Pablo, Hilario, Javi Romero, David y Eugenia por su amistad y sobre todo, por tantos buenos momentos que pasamos juntos. Y especialmente a Laura Maestre, por su amistad, por todo lo que me aporta y todo lo que he aprendido de ella.

A los profesores del Máster de Cirugía e Implantología Bucal de la Facultad de Medicina y Odontología de Valencia, especialmente

a Luis Martorell, Pepe Balaguer y Berta García, por todos los conocimientos que me han transmitido, y por su ayuda desinteresada en el desarrollo de la clínica.

A todos los compañeros del Departamento de Fisiología la Universidad de Valencia, por el trato que siempre han tenido conmigo.

A Charo Velarde, M^a José Barrachina, Carmina Estellés, Esther Grau e Inma de la Clínica de Cirugía Bucal por ayuda y apoyo.

A Dña. Delfina Gimenez Abad, por su orientación en las tareas burocráticas.

A todos mis amigos, por lo importante de su amistad, especialmente a aquellos con los que estudié la carrera, Nacho Gamarra, Javi Peláez, Jose Riquelme y Carlos Valdivieso, por compartir profesión y porque desde hace ya mucho tiempo siguen ahí.

A mis padres, Pepe y Pilar, a quienes debo todo; por todo lo que han hecho por mí. A mis hermanos, Tomás y Aurora, por todo lo que me aportan.

A mis tíos, Juan, Teresa, Jose Luis y Paloma. A mis primos, Carlos, Isabel y Jose Luis.

A mis abuelos, Mari, Tomás, Ela y especialmente esta Tesis está dedicada a Elo, más que a nadie a él le hubiera gustado estar presente.

Índices

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	21
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Embriología y características de la pulpa dental.....	29
2.2	¿Qué son las células madre?	33
2.3	Células madre según su potencialidad.....	33
2.4	Células madre según su origen	34
2.5	Células madre mesenquimales	35
2.6	Localización.....	36
2.7	Diferenciación	37
2.8	Células madre mesenquimales de origen dental	37
2.8.1	Células madre de pulpa dental (CMPD)	37
2.8.2	Células madre de otros tejidos dentales	41
2.9	Caracterización de CMPD	44
2.10	Estudios <i>in vitro</i> sobre células madre y biomateriales de regeneración ósea	48
2.11	Estudios <i>in vivo</i> sobre células madre en regeneración ósea	50
2.11.1	Regeneración ósea alveolar	51
2.11.2	Elevación de seno maxilar.....	53
2.11.3	Regeneración ósea periimplantaria	55
2.11.4	Distracción alveolar.....	56

2.12	¿Existen otros factores o proteínas útiles para aumentar la regeneración ósea?	62
2.12.1	Proteínas morfo genéticas óseas.....	62
2.12.2	Plasma rico en plaquetas	64
3	JUSTIFICACIÓN	67
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
4.1	HIPÓTESIS	73
4.2	OBJETIVOS	75
5	MATERIAL Y MÉTODOS	77
5.1	Material	78
5.1.1	Material clínico	79
5.1.1.1	Anestesia	79
5.1.1.2	Exodoncia simple.....	79
5.1.1.3	Exodoncia quirúrgica	79
5.1.1.4	Extracción de la pulpa dental	79
5.1.2	Aparatos	80
5.1.2.1	Para cultivo celular	80
5.1.2.2	Para caracterización	81
5.1.2.3	Para interacción de CMPD y biomateriales	81
5.1.3	Reactivos y medios de cultivo.....	81
5.1.3.1	Enzimas y reactivos	82
5.1.3.2	Medios de cultivo.....	82
5.1.4	Biomateriales de regeneración ósea	82
5.2	Métodos	83
5.2.1	Diseño del estudio	83
5.2.1.1	Criterios de inclusión	84
5.2.1.2	Criterios de exclusión	84

5.2.1.3	Recogida de datos	84
5.2.2	Exodoncia.....	85
5.2.2.1	Anestesia.....	85
5.2.2.2	Exodoncia simple.....	85
5.2.2.3	Exodoncia quirúrgica	85
5.2.2.4	Extracción de la pulpa dental	86
5.2.2.5	Almacenamiento y transporte	87
5.2.3	Obtención de CMPD por método publicado por Gandía y cols. (Gandia C y cols. 2008) (Método A).....	88
5.2.3.1	Rendimiento para la obtención de CMPD	88
5.2.3.2	Tiempo mínimo requerido para el aislamiento de CMPD.....	89
5.2.4	Optimización del método de obtención de CMPD.....	90
5.2.4.1	Método B: Obtención de CMPD realizando la disgregación de la pulpa con EDTA.....	90
5.2.4.2	Método C: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con EDTA y colagenasa tipo I	91
5.2.4.3	Método D: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 1 mg/ml de colagenasa durante 13 horas.....	91
5.2.4.4	Método E: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con EDTA y colagenasa/dispara	91
5.2.4.5	Método F: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con EDTA y colagenasa/dispara y sonicación	91
5.2.4.6	Método G: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con EDTA, colagenasa/dispara, termolisina y sonicación.	92
5.2.4.7	Método H: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con termolisina	92
5.2.4.8	Método I: Obtención de CMPD realizando fragmentación mecánica	92
5.2.5	Caracterización de las células madre mesenquimales mediante la inmunofluorescencia por microscopía confocal.....	93

5.2.6	Cultivo de CMPD a distintas presiones de oxígeno y realización de curva de crecimiento.....	95
5.2.7	Adhesión y crecimiento de CMPD a β - fosfato tricálcico.....	96
5.2.7.1	Adhesión de CMPD a β - fosfato tricálcico	96
5.2.7.2	Crecimiento de las CMPD sobre el biomaterial β - fosfato tricálcico	96
5.2.8	Análisis estadístico de los resultados	99
5.3	Documentos anexos.....	100
6	RESULTADOS	107
6.1	Obtención de CMPD por método publicado por Gandía y cols. (Gandia C y cols. 2008) (Método A)	109
6.1.1	Rendimiento para la obtención de CMPD.....	109
6.1.2	Tiempo mínimo requerido para el aislamiento de CMPD.....	110
6.2	Optimización del método de obtención de CMPD.....	113
6.2.1	Método B: Obtención de CMPD realizando la disgregación de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA.....	114
6.2.2	Método C: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA y 2 mg/ml de colagenasa tipo I.....	116
6.2.3	Método D: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 1 mg/ml de colagenasa durante 13 horas.....	118
6.2.4	Método E: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (2mg/ml)/dispasa (4mg/ml)	121
6.2.5	Método F: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml) y sonicación	123

6.2.6	Método G: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA, colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml), 13ng/ml de termolisina y sonicación	125
6.2.7	Método H: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 13ng/ml de termolisina	127
6.2.8	Método I: Obtención de CMPD realizando fragmentación mecánica	129
6.3	Caracterización de CMPD	132
6.3.1	Caracterización mediante marcador de superficie CD-133.....	133
6.3.2	Caracterización mediante marcador de superficie Oct4.....	134
6.3.3	Caracterización mediante marcador de superficie Nestin.....	135
6.3.4	Caracterización mediante marcador de superficie Stro-1.....	136
6.3.5	Caracterización mediante marcador de superficie CD-34.....	137
6.3.6	Caracterización mediante marcador de superficie CD-45.....	138
6.4	Cultivo de CMPD a distintas presiones de oxígeno	138
6.5	Adhesión y crecimiento de CMPD sobre β-fosfato tricálcico	140
6.5.1	Adhesión de CMPD sobre β -fosfato tricálcico	140
6.5.2	Crecimiento de CMPD sobre β -fosfato tricálcico	141
7	DISCUSIÓN	145
7.1	Obtención de CMPD	147
7.1.1	Extracción de pulpa dental	147
7.1.2	Almacenamiento y transporte.....	148

7.1.3	Aislamiento y cultivo de CMPD	149
7.1.4	Criopreservación	152
7.2	Optimización del método de obtención CMPD.....	154
7.3	Crecimiento de CMPD a distintas concentraciones de O₂	156
7.4	Caracterización de CMPD.....	158
7.5	Adhesión y crecimiento de CMPD a β-fosfato tricálcico.....	160
7.6	Limitaciones del estudio.....	163
7.7	Proyecciones del estudio.....	165
8	CONCLUSIONES.....	167
9	BIBLIOGRAFÍA.....	171

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Imagen esquemática de la anatomía dental. Las células madre mesenquimales se encuentran en la zona perivascular.....	24
Figura 2.1. Distintas etapas de la odontogénesis. A: Se observa el estadio de brote. B: casquete, y C: y campana. Existe una interacción de células mesenquimales (flecha roja) y el ectodermo (flecha verde).	29
Figura 2.2 A: Corte longitudinal de un diente donde se observa la cavidad pulpar. B: Representación gráfica de la pulpa dental en la cavidad pulpar.	30
Figura 2.3. Imagen de pulpa dental donde se pueden diferenciar las 4 zonas celulares.....	32
Figura 2.4. Representación esquemática del origen histológico y la diferenciación de CMPD.....	40
Figura 2.5 A: Pulpa dental de un canino temporal superior derecho. B: Ligamento periodontal obtenido con una cureta tras la exodoncia.	41
Figura 2.6. A: Imagen de papila apical de un tercer molar en periodo de desarrollo. B: Este tejido se desprende fácilmente con la ayuda de una cureta.	42
Figura 2.7. Imagen de un tercer molar tras su extracción con su folículo dental.....	43
Figura 5.1. Campana de cultivo.	78
Figura 5.2. Extracción de la pulpa dental. A: Odontosección a nivel de la línea amelocementaria con fresa diamantada. B: Una vez expuesta la cámara pulpar, C: se despegó la pulpa con una sonda, y D: se extrajo con unas pinzas. E y F: La pulpa se conservó y transportó en tubos con medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle® con suplemento bajo de glucosa (1mg/ml) y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml).	87
Figura 5.3. A y B: Estufa de cultivo celular. Condiciones: 37°C, 5% de CO ₂ y 3% de O ₂	89

Figura 5.4. A y B: Centrifuga para precipitar los fragmentos pulpares digeridos.....	90
Figura 6.1. A y B: Imágenes al microscopio electrónico de CMPD correspondiente a un hombre de 17 años realizando la digestión de la pulpa con 2mg/mL de colagenasa I durante 90 minutos.....	110
Figura 6.2. Obtención de CMPD realizando la digestión con 2mg/mL de colagenasa durante 90 minutos. Imágenes a microscopía óptica a 400x aumentos de un cultivo de una pulpa correspondiente a un hombre de 35 años. Las figuras muestran diferentes tiempos de cultivo: A: Cultivo a los 7 días. Se observan fragmentos pulpares en suspensión (flecha roja). B: Cultivo a los 14 días. De los fragmentos pulpares, se desprenden CMPD adheridas a la placa (flecha verde). C: Cultivo a los 18 días. La placa de cultivo está confluyente.	112
Figura 6.3. Imágenes representativas de microscopía óptica a 400x y 200x aumentos respectivamente de CMPD aisladas realizando la disgregación con 2 mg/ml de EDTA. Estas células corresponden a un hombre de 35 años. Imágenes correspondientes a distintos momentos del cultivo: A: Imagen a los 7 días de cultivo. B: A las 3 semanas del cultivo.....	116
Figura 6.4. Imagen de cultivo a los 7 días de aislamiento realizando la digestión con 2 mg/ml de EDTA y 2 mg/ml de colagenasa tipo I. Microscopía óptica a 100x aumentos.....	117
Figura 6.5. Imágenes de microscopio óptico de la obtención de CMPD realizando la digestión con 1 mg/ml de colagenasa durante 13 horas. A: Imagen a 400x aumentos de la pulpa después de la digestión. B: Imagen a 400x aumentos de CMPD a las 24 horas tras el aislamiento. C: Imagen a 200x aumentos de CMPD a las 48 horas tras el aislamiento. D: Imagen a 400x aumento a los 17 días de cultivo.	120
Figura 6.6. Imagen a los 4 días de cultivo de CMPD realizando la digestión con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (2mg/ml)/dispasa (4mg/ml). Imagen mediante microscopio óptico a 200x aumentos.	122
Figura 6.7. Imagen a las 13 horas tras el aislamiento al microscopio óptico a 400x aumentos de CMPD correspondiente a una mujer de 37	

años. La digestión se realizó con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml) y sonicación.....	124
Figura 6.8. Imagen al microscopio óptico de un cultivo donde se realizó la digestión de la pulpa de un hombre de 30 años con 2 mg/ml de EDTA, colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml), 13ng/ml de termolisina y sonicación. Imagen a las 40 horas desde el aislamiento.	127
Figura 6.9. Imagen al sexto día de cultivo de CMPD correspondientes a una mujer de 19 años, aisladas con el presente método (digestión con 13ng/ml de termolisina).....	129
Figura 6.10. Imagen de microscopía confocal mediante láser de argón y otro de neón-helio con una longitud de onda de 543 nm de excitación y 555-621 nm de emisión (color rojo). Imágenes A: 400x aumentos y B: 600x aumentos del marcador positivo CD-133.	133
Figura 6.11. Imagen de microscopía confocal mediante láser de argón y otro de neón-helio con una longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión (color verde). Imágenes A: 400x aumentos y B: 600x aumentos del marcador positivo Oct4....	134
Figura 6.12. Imagen de microscopía confocal con láser argón y otro de neón-helio (longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión color verde); (longitud de onda de 543 nm de excitación y 555-621 nm de emisión: color rojo). Imágenes A: 400x aumentos y B: 600x aumentos para el marcador positivo Nestin. ...	135
Figura 6.13. Imagen de microscopía confocal mediante láser de argón y otro de neón-helio con una longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión (color verde). Imágenes A: 400x aumentos y B: 600x aumentos del marcador positivo Stro-1.	136
Figura 6.14. Imagen de microscopía confocal mediante láser de argón y otro de neón-helio con una longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión (color verde). Imagen a 400x aumentos.....	137
Figura 6.15. Se observa el número de células contadas en cada tiempo de cultivo. El número de células para cada momento es la media de 4 cultivos distintos. El eje vertical indica el número de células y el eje	

horizontal el tiempo. Los valores de los resultados de la curva de CMPD al 3 y al 21% de O₂ están representados como la media ± SEM. La significancia estadística se expresa como * p<0'05; **p<0'01; ***p<0'001..... 139

Figura 6.16. Imágenes con microscopía óptica a distintos aumentos (40-400x) de CMPD (flecha verde) adheridas a β-fosfato tricálcico (flecha roja). **A:** A los 7. **B:** 13. **C:** 18 y **D:** 23 días de cultivo..... 141

Figura 6.17. Relación entre el número de células y la concentración de DNA. 142

Figura 6.18. Gráfica donde se observa la correspondencia entre la concentración de DNA (en ng/μL) y el número de células. Las mediciones de DNA se realizaron los días 7, 13, 18 y 23. Se observó un incremento en la cantidad de células a lo largo del intervalo de tiempo..... 143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Marcadores de células madre de pulpa dental.....	47
Tabla 2.2. Resumen de los resultados sobre la aplicación de células madre en regeneración ósea en implantología.	61
Tabla 6.1. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2mg/mL de colagenasa I durante 90 minutos.....	109
Tabla 6.2. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó disgregación con 2 mg/ml de EDTA.....	115
Tabla 6.3. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2 mg/ml de EDTA y 2 mg/ml de colagenasa tipo I.....	117
Tabla 6.4. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 1 mg/ml de colagenasa durante 13 horas.	119
Tabla 6.5. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (2mg/ml)/dispasa (4mg/ml).....	122
Tabla 6.6. Datos descriptivos de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml) y sonicación.....	124
Tabla 6.7. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2 mg/ml de EDTA, colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml), 13ng/ml de termolisina y sonicación..	126

Tabla 6.8. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 13ng/ml de termolisina. 128

Tabla 6.9. Método utilizado, número de pulpas, tiempo de digestión y obtención y porcentaje de obtención de todas las pulpas cultivadas en los objetivos 1 (**Método A**) y 2 (**Métodos B-I**). **Método A:** 2mg/ml colagenasa tipo I, 90 min. **Método B:** 2mg/mL EDTA, 30 min. **Método C:** 2mg/ml EDTA, 10 min + 2mg/ml colagenasa tipo I, 90 min. **Método D:** 1mg/ml colagenasa tipo I, 13 horas. **Método E:** 2mg/ml EDTA 10 min + 2mg/ml colagenasa tipo I + 4mg/ml dispasa tipo II, 90 min. **Método F:** 2mg/ml EDTA, 10 min + 4mg/ml colagenasa tipo I + 4mg/ml dispasa tipo II, 40 min + sonicar, 1 min. **Método G:** 2mg/ml EDTA, 10 min + 4mg/ml colagenasa tipo I + 4mg/ml dispasa tipo II + 13ng/mL termolisina 40 min + sonicar, 1min. **Método H:** Termolisina 13ng/ml 40 min. 131

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 5.1. Informe del comité de ética de la Universidad de Valencia.	100
Anexo 5.2. Modelo de hoja de información al paciente.	101
Anexo 5.3. Modelo de consentimiento informado.....	102
Anexo 5.4. Tabla de recogida de datos referentes a la edad y sexo de los pacientes, método de aislamiento utilizado y tiempo requerido para la obtención de CMPD.	106

Abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
CMM	Células madre mesenquimales
CMPD	Células madre de pulpa dental
hTERT	Telomerasa humana
FBN	Fibronectina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Al₂O₃	Óxido de aluminio
PRP	Plasma rico en plaquetas
HA	Hidroxiapatita
BMPs*	proteínas morfogenéticas óseas
rhBMP-2*	proteínas morfogenéticas óseas recombinantes humanas
PDGF*	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PTH	Parathormona
EDTA	Etilen diamino tetraacético (quelante de metales incluyendo Ca ²⁺)
DMEM*	Medio modificado Eagle de Dulbecco
PBS*	Tampón fosfato sódico
SBF	Suero bovino fetal
BSA	Albumina de suero Bovino
RNA	Ácido ribonucleico
DEPC	Dietilpirocarbonato
α-MEM	Medio modificado Eagle-α

1 INTRODUCCIÓN

Las células madre son células con capacidad clonogénica y autorenovadora y que se pueden diferenciar en múltiples linajes celulares (Weissman IL 2000). Las células madre mesenquimales (CMM) son aquellas capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico (Caplan AI 1991) (dentina, hueso, ligamento periodontal, etc.), aunque recientemente se ha observado que se pueden transdiferenciar, es decir, se les puede inducir pluripotencialidad (Song L y Tuan RS 2004). Estas células se identifican por su capacidad de formar colonias morfológicamente parecidas a fibroblastos, cuando se cultivan en presencia de factores de crecimiento mitogénico o suero (Friedenstein AJ y cols. 1978).

El mayor reservorio de CMM se encuentra en el estroma de médula ósea. También existen CMM en la pulpa dental, concretamente se encuentran en la zona celular, alrededor de la zona central (Tecles O y cols. 2005) (**Figura 1.1**). *In vitro*, se ha demostrado que en presencia de una cavidad dentinaria profunda, estas células proliferan y acuden a la zona de la lesión para sustituir los odontoblastos necrosados (Tecles O y cols. 2005).

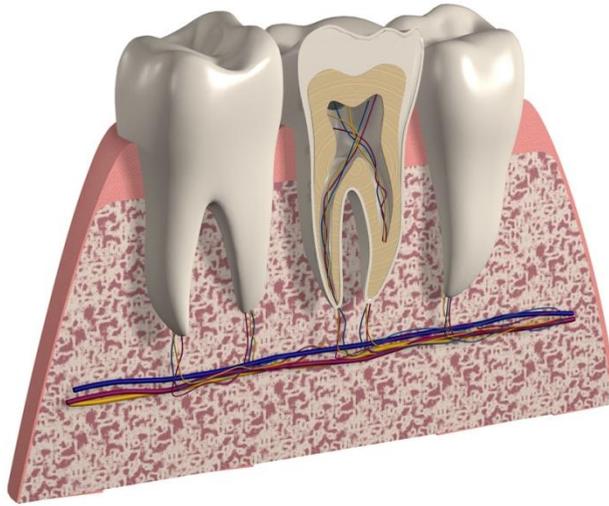


Figura 1.1. Imagen esquemática de la anatomía dental. Las células madre mesenquimales se encuentran en la zona perivascular.

Gronthos y cols. (Gronthos S y cols. 2000) fueron en el año 2000, los primeros en aislar células madre de pulpa dental (CMPD). La metodología que utilizaron fue digerir la pulpa, fragmentada previamente, con 3 mg/mL de colagenasa tipo I y 4 mg/mL de dispasa durante 90 minutos a 37°C. Este protocolo ha sido utilizado por muchos autores (Takeda T y cols. 2008), (Liu H y cols. 2005). Otros métodos de aislamiento válidos, fueron aislar la pulpa realizando la digestión con colagenasa tipo I y tipo II con termolisina (una proteasa termoestable producida por bacterias Gram-positivas) durante 40 minutos (Perry BC y cols. 2008), con 3 mg/mL de colagenasa tipo I (Zhang W y cols. 2008), o sin realizar digestión de la pulpa (Pierdomenico L y cols. 2005). En la mayoría de los estudios encontrados en la literatura (Zhang W y cols. 2008), (Gandia C y cols.

2008), (Graziano A y cols. 2008) se obtuvieron pulpas de dientes extraídos, los cuales fueron seccionados para acceder a la cavidad pulpar; normalmente estos dientes fueron terceros molares. Huang y cols. (Huang AH y cols. 2008) cultivaron y caracterizaron CMPD de un mesiodens. En un estudio reciente (Huang AH y cols. 2009) se obtuvo la pulpa dental mediante una lima de endodoncia a un diente no extraído que requería tratamiento de conductos y cuya pulpa no presentaba inflamación o infección.

No existe un marcador que caracterice exclusivamente las CMPD. Estas células son positivas para c-kit, STRO- y CD34 (Laino G y cols. 2006). A su vez, son negativas para CD44, CD45 y CD14 (Papaccio G y cols. 2006). Kerkis y cols. (Kerkis I y cols. 2006), cultivaron células madre de dientes deciduos positivas para marcadores de células madre embrionarias como OCT-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, implicando la pluripotencialidad de estas células.

Existen indicios de que una población heterogénea de CMPD reside en la pulpa dental (Gronthos S y cols. 2000), (Shi S y Gronthos S 2003). Recientemente Waddington y cols. (Waddington RJ y cols. 2009) aislaron 2 estirpes diferentes de CMPD de ratas. Cultivaron células madre, derivadas de cresta neural y positivas para STRO 1, CD31, LANGFR, CD105 y Notch 2. Por otra parte, cultivaron solo positivas para STRO 1 y CD31 y fibronectina. Por tanto, parece que se pueden diferenciar dos tipos de células madre en la pulpa dental.

Introducción

Las CMM expresan genes como la proteína morfogenética ósea y el factor de transformación de crecimiento- β (Aonuma H y cols. 2012). Durante la regeneración ósea, existe una migración de células madre al lugar de la lesión, que posteriormente se diferencian hacia osteoblastos (Lock J y cols. 2012).

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Embriología y características de la pulpa dental

Los dientes tienen su origen en dos de las tres capas blastodérmicas primitivas, el ectodermo y el mesodermo, donde desarrolla un importante papel el ectomesénquima, o mesénquima migrado a la mandíbula o maxilar desde las crestas neurales (Lumsden AG 1988). En los primeros estadios de la odontogénesis se produce una interacción entre las células epiteliales del ectodermo y las células mesenquimales (Lumsden AG 1988), (Ruch JV 1985), (Thesleff I y Sharpe P 1997). La porción ectodérmica dará lugar al esmalte, mientras que las células mesenquimales darán lugar a los tejidos mesodérmicos: dentina, pulpa y cemento (Bergenholtz G y cols. 1985). En la **Figura 2.1** (obtenida de un estudio de Li y cols. (Li L y cols. 2011) sobre la odontogénesis en ratas) se observa los distintos pasos de la odontogénesis y la interacción del mesodermo y el ectodermo.

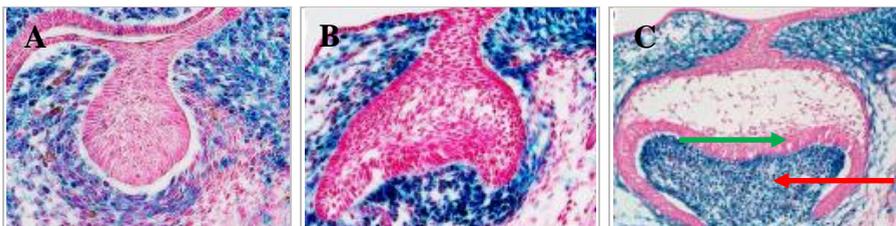


Figura 2.1. Distintas etapas de la odontogénesis. **A:** Se observa el estadio de brote. **B:** casquete, y **C:** y campana. Existe una interacción de células mesenquimales (flecha roja) y el ectodermo (flecha verde).

Revisión bibliográfica

En el inicio de la odontogénesis aparecen unos brotes de la lámina dental (estadio de brote) (**Figura 2.1A**). Cuando el brote prolifera determina una concavidad que adquiere el aspecto de casquete (**Figura 2.1B**). Su cavidad central encierra una serie de células ectomesenquimales; la futura papila dentaria, que dará lugar al complejo dentinopulpar. En el estadio de campana (**Figura 2.1C**), las células de la periferia de la papila darán lugar a los odontoblastos, y las del centro de la papila a la pulpa dental (Bergenholtz G y cols. 1985).

La pulpa es un tejido conjuntivo laxo compuesto de células, fibras colágenas y reticulares, sustancia fundamental, vasos sanguíneos y nervios (**Figura 2.2**). Es la forma madura de la papila dentaria y el único tejido blando del diente (Bergenholtz G y cols. 1985).

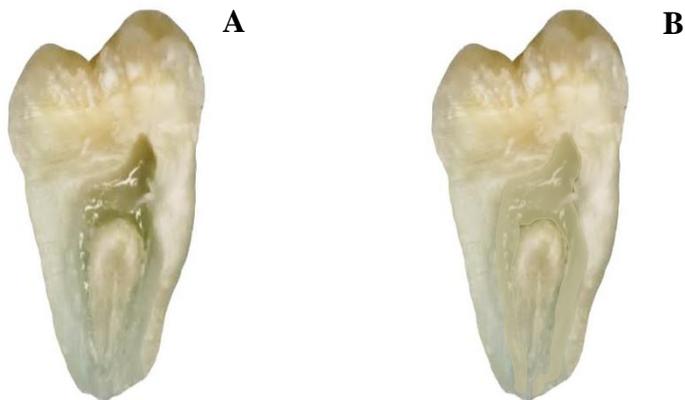


Figura 2.2 A: Corte longitudinal de un diente donde se observa la cavidad pulpar.
B: Representación gráfica de la pulpa dental en la cavidad pulpar.

Mientras que las células periféricas se diferencian hacia odontoblastos, el resto se diferencian hacia fibroblastos, lo que supone un grado de diferenciación mucho menor. Muchas de las células mesenquimales permanecen indiferenciadas una vez finalizada la odontogénesis, conservando su potencial de diferenciación (Bergenholtz G y cols. 1985).

Se pueden diferenciar 4 zonas en la pulpa dental (**Figura 2.3**):

- **Zona odontoblástica en la periferia.** Justo debajo de los odontoblastos se encuentran las células de Höhl, que son preodontoblastos (Sinanan AC y cols. 2004).
- **Zona acelular o zona de Weil** por debajo de los odontoblastos. Esta zona es pobre en células y rica en colágeno.
- **Zona muy rica en células** adyacente a la capa anterior.
- **Zona central,** donde están presentes los nervios y vasos (Bergenholtz G y cols. 1985).

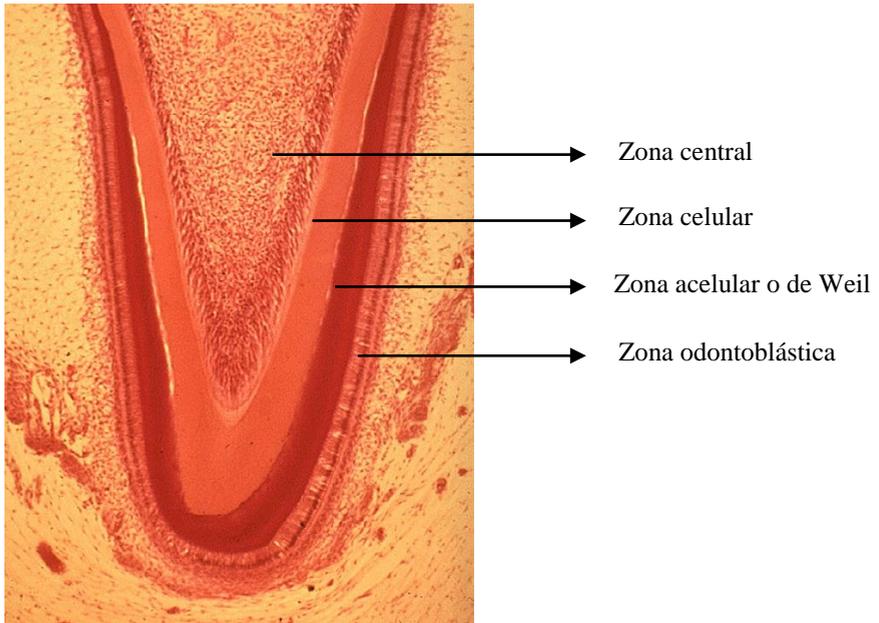


Figura 2.3. Imagen de pulpa dental donde se pueden diferenciar las 4 zonas celulares.

Después de la erupción dental, la dentina reparativa se forma por odontoblastos en respuesta a erosión mecánica o a degradación causada por bacterias (Kitamura C y cols. 1999; Smith AJ y Lesot H 2001). Estos odontoblastos surgen de la proliferación y diferenciación de células precursoras que residen concretamente en la zona celular de la pulpa dental, alrededor de la zona perivascular (Ruch JV 1998; Tecles O y cols. 2005).

2.2 ¿Qué son las células madre?

Las células madre poseen capacidad clonogénica y autorenovadora y pueden diferenciarse en múltiples linajes celulares (Weissman IL 2000). Las propiedades clonogénica y autorenovadora denotan la capacidad de reproducirse siendo las células hijas una réplica exacta precisa de las anteriores. Estas células pueden replicarse muchas generaciones sin perder sus características originales (Caplan AI 1991). Las células madre mantienen la integridad estructural y funcional de los tejidos reemplazando las células dañadas (Tirino V y cols. 2011).

Las células madre se pueden clasificar según su potencialidad y según su origen.

2.3 Células madre según su potencialidad

- **Totipotentes:** capaces de formar células de todos los linajes del organismo. En los mamíferos solamente son el cigoto y las obtenidas a partir de los primeros blastómeros.
- **Pluripotentes:** aquellas de las que pueden derivar células de todos los linajes del cuerpo, pero no de los tejidos necesarios para el desarrollo del trofoblasto. Son las del embrión de más de 16 células hasta las de la masa granulosa del blastocisto (Evans MJ y Kaufman MH 1981). A estas células, se les denomina células madre embrionarias.

- **Multipotentes:** son aquellas capaces de generar células de distintos tipos de un mismo tejido (Pittenger MF y cols. 1999), como especialmente son las hematopoyéticas.
- **Unipotentes:** son las células madre adultas que producen células de un solo linaje, como las espermatogonias (Jaenisch R y Young R 2008).

2.4 Células madre según su origen

Por otro lado, según su origen, pueden ser células madre embrionarias o adultas. La fuente de células madre embrionarias son los embriones. Estos se pueden obtener a partir de los sobrantes de fecundación *in vitro* o generados por transferencia nuclear somática. Las células madre adultas se pueden obtener de diferentes tejidos adultos, del cordón umbilical, de la placenta, de teratocarcinomas o carcinomas, especialmente los testiculares.

Las células madre embrionarias derivan del blastocisto (Thomson JA y cols. 1998) y son pluripotentes, ya que pueden dar lugar a todos los linajes celulares del cuerpo (endodermo, mesodermo y ectodermo) (Korbling M y Estrov Z 2003). Sin embargo, dados los problemas éticos y legales que plantean la utilización de este tipo de células, nos centramos en las células madre adultas, que son multipotentes, y por tanto capaces de diferenciarse en al menos dos tipos de células diferentes de un mismo tejido (Korbling M y Estrov Z

2003). Dentro de las células madre adultas encontramos las células madre mesenquimales (CMM).

2.5 Células madre mesenquimales

Las CMM son aquellas capaces de dar origen a células de origen mesodérmico (Caplan AI 1991) (dentina, hueso, ligamento periodontal, etc.). Friedenstein y cols. (Friedenstein AJ y cols. 1978) en 1978, fueron los primeros en aislar con éxito CMM y fueron llamadas células fibroblásticas formadoras de colonias. Los grupos de Caplan (Caplan AI 1991) y Pittenger (Pittenger MF y cols. 1999) por su parte, demostraron en la década de los noventa, que las CMM tenían propiedades osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas. Las células de una línea celular inmortal se pueden replicar muchas generaciones pero no pueden diferenciarse hacia distintos linajes celulares. Con lo cual, las líneas celulares no son células madre. Por ejemplo, los preosteoblastos se pueden diferenciar hacia osteoblastos, pero son incapaces de diferenciarse hacia otra línea mesenquimal como condrocitos o adipocitos (Tirino V y cols. 2011). Las CMM están presentes en todos los tejidos maduros del cuerpo humano y residen en áreas específicas de dichos tejidos, donde permanecen inactivas sin dividirse, hasta que se activan por enfermedad o lesión tisular (Tirino V y cols. 2011).

2.6 Localización

En la actualidad se sabe que el mayor reservorio de CMM se encuentra en el estroma de médula ósea. Estas células se identifican por su capacidad de formar colonias, morfológicamente parecidas a fibroblastos cuando se cultivan en presencia de factores de crecimiento mitogénico o suero (Friedenstein AJ y cols. 1978). También se pueden aislar de: pulpa dental (Gronthos S y cols. 2000), ligamento periodontal, (Gronthos S y cols. 2000) dientes deciduos (Miura M y cols. 2003), periostio (Nakahara H y cols. 1991), membrana sinovial (De Bari C y cols. 2001), músculo (Bosch P y cols. 2000), grasa (Zuk PA y cols. 2002), dermis (Young HE y cols. 2001), y hueso trabecular (Tuli R y cols. 2003). Estas células se pueden caracterizar mediante marcadores moleculares de superficie como SH2 (CD105), SH3, SH4 (Haynesworth SE y cols. 1992), CD44 (Conget PA y Minguell JJ 1999) y Stro-1 (Gronthos S y Simmons PJ 1995); aunque ninguno de estos marcadores es específico de CMM, ya que también han sido detectados en células mesenquimales diferenciadas, endoteliales y epiteliales. Hasta la fecha no se ha identificado un único marcador que caracterice definitivamente este tipo de células (Shanti RM y cols. 2007).

2.7 Diferenciación

Las CMM son capaces de dar lugar a células de origen mesodérmico como condrocitos (Pittenger MF y cols. 1999), osteoblastos (Pittenger MF y cols. 1999), (Rodríguez-Lozano FJ y cols. 2012), adipocitos (Pittenger MF y cols. 1999), mioblastos (Wakitani S y cols. 1995), células de tendón (Altman GH y cols. 2002), odontoblastos (Gronthos S y cols. 2000), (Miura M y cols. 2003) y cementoblastos (Kemoun P y cols. 2007). Se pensaba que las células madre adultas se podían diferenciar hacia un linaje celular en concreto, pero se ha observado que se pueden transdiferenciar, es decir, se les puede inducir pluripotencialidad (Song L y Tuan RS 2004). De esta manera, CMM pueden dar lugar a células con propiedades biológicas y morfológicas de células ectodérmicas derivadas de tejido neuronal (Azizi SA y cols. 1998), (Kopen GC y cols. 1999) o células ameloblásticas (Hu B y cols. 2006).

2.8 Células madre mesenquimales de origen dental

2.8.1 Células madre de pulpa dental (CMPD)

El primer tipo de células madre dentales fueron aisladas de la pulpa por Gronthos y cols. (Gronthos S y cols. 2000) en el año 2000. Fueron extraídas de terceros molares humanos y además de demostrar

Revisión bibliográfica

capacidad clonogénica, fueron capaces de diferenciarlas hacia odontoblastos, y de formar el complejo dentinopulpar cuando fueron implantadas subcutáneamente en ratas inmunocomprometidas. Se observó que estas células presentaban un mayor porcentaje de proliferación que las células madre mesenquimales de médula ósea (Shi S y cols. 2001). También se han aislado células madre de pulpa dental (CMPD) de ratones (Mina M y Braut A 2004), ratas (Zhang W y cols. 2005) o perros (Iohara K y cols. 2004). Las CMPD no solo se pueden obtener de dientes sanos, sino también de dientes con pulpitis irreversible (Wang Z y cols. 2010). Estas CMPD de pulpas con patología muestran menor formación de colonias y proliferación, pero similar expresión del marcador STRO-1 e inducción odontogénica *ex vivo*. Los autores concluyeron que las pulpas dentales clínicamente comprometidas deben contener células putativas con propiedades de células madre. Alongi y cols. (Alongi DJ y cols. 2010) también estudiaron células madre procedentes de pulpas inflamadas. Éstas expresaron mayores niveles de los marcadores STRO-1, CD-90, CD-105 y CD-146 que las células de pulpas normales. Las células de ambos tipos de pulpas fueron positivas para CD-146, antígeno específico embrionario fase 4 (SSEA-4) y CD-166. La capacidad de duplicación y la capacidad osteo/dentinogénica fueron mayores en las células de las pulpas normales. Sin embargo las células de ambos tipos de pulpa fueron capaces de formar el complejo dentino-pulpar de forma similar *in vivo*.

Murray y cols. (Murray PE y cols. 2002) en 2002 publicaron un estudio para evaluar los cambios en la densidad de las células pulpares (odontoblastos y subodontoblastos) en lo que denominaron la zona inmadura de la pulpa (apical) respecto a la madura (coronal). Encontraron menor densidad de odontoblastos y subodontoblastos en ambas regiones en las ratas más viejas. Esta reducción de los odontoblastos fue mayor en la zona inmadura.

Las CMPD, además de hacia odontoblastos (Gronthos S y cols. 2000; Zhang W y cols. 2006), se han podido diferenciar hacia adipocitos (Zhang W y cols. 2006), (Gronthos S y cols. 2002), neuronas (Zhang W y cols. 2006), (Gronthos S y cols. 2002), hueso (Laino G y cols. 2006), (Zhang W y cols. 2006), músculo (Laino G y cols. 2006), (Papaccio G y cols. 2006), (Zhang W y cols. 2006) o condrocitos (Zhang W y cols. 2006). Yu y cols. (Yu J y cols. 2010) observaron que las CMPD STRO-1 positivas se diferenciaron hacia odontoblastos, osteoblastos y adipocitos, pero las mismas células después de 9 pases solo pudieron hacerlo hacia osteoblastos. Recientemente se ha demostrado que la presencia de osteoblastos, diferencia las CMPD hacia linaje osteogénico. Además, las CMPD cultivadas con osteoblastos, presentaban una proliferación mayor que las cultivadas en ausencia de estos (Wang Y y cols. 2012).

En la **Figura 2.4** se representa esquemáticamente el origen y la diferenciación de CMPD.

También se han realizado estudios para evaluar la influencia de la presión de O₂ en la proliferación del cultivo de CMPD. Sakdee y

Revisión bibliográfica

cols. (Sakdee JB y cols. 2009) compararon la proliferación de células pulpares a distintas presiones de O₂. Demostraron que las células proliferaban más al 3% que al 20%. El marcador CD133 decrecía al 3% de O₂ mientras que el STRO-1 aumentaba.

Li y cols. (Li L y cols. 2011) evaluaron la viabilidad y la capacidad de las células pulpares de formar tejido mineralizado. Observaron mejores resultados al 5% que al 21%. Wang y cols. (Wang J y cols. 2010) observaron que las CMPD proliferaban menos en condiciones de isquemia (2% de O₂) a las 24 y 48 horas.

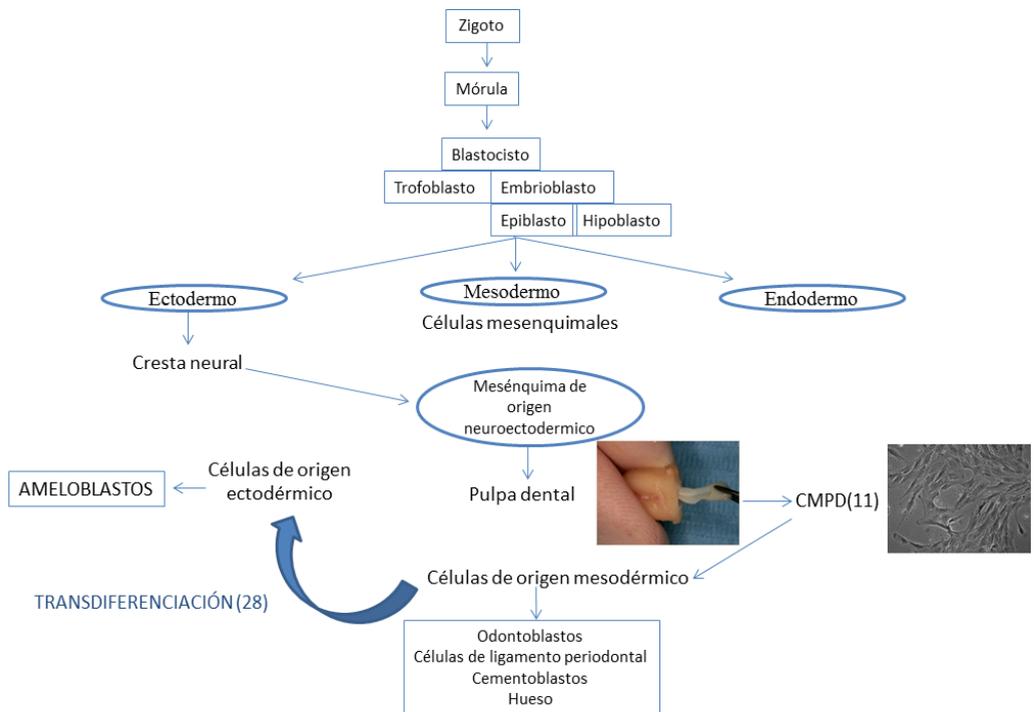


Figura 2.4. Representación esquemática del origen histológico y la diferenciación de CMPD.

2.8.2 Células madre de otros tejidos dentales

Además de las CMPD, se han aislado células madre de otros tejidos dentales humanos como el ligamento periodontal (Gronthos S y cols. 2000) (**Figura 2.5A**), o CMM obtenidas a partir de dientes deciduos (Miura M y cols. 2003) (**Figura 2.5B**).



Figura 2.5 A: Pulpa dental de un canino temporal superior derecho. **B:** Ligamento periodontal obtenido con una cureta tras la exodoncia.

Estas células madre de dientes deciduos son capaces de formar dentina *in vivo* al ser trasplantadas subcutáneamente en ratas (Cordeiro MM y cols. 2008). Recientemente se ha demostrado la presencia de CMM en la papila apical (Sonoyama W y cols. 2008), tejido derivado del ectomesénquima, que inducido por la lámina dental, tiene como función el desarrollo de las raíces durante la odontogénesis (**Figura 2.6**).

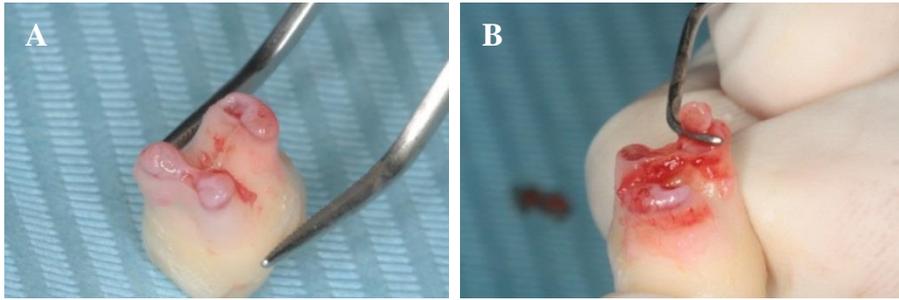


Figura 2.6. A: Imagen de papila apical de un tercer molar en periodo de desarrollo. **B:** Este tejido se desprende fácilmente con la ayuda de una cureta.

Estas CMM de la papila apical también han demostrado potencial dentinogénico, adipogénico, y neurogénico cuando son tratadas con los respectivos estímulos (Sonoyama W y cols. 2006). Al comparar las propiedades de las células madre de la papila apical con CMPD, se observó que las células madre de la papila apical, obtenidas del mismo diente y cultivadas con las mismas condiciones, mostraron mayor tasa de proliferación, mayor capacidad de regeneración tisular y mayor número de células STRO-1 positivas, es decir, mayor capacidad clonogénica. Además, las células madre de la papila apical expresan un nivel más alto de supervivencia, pues tienen una tasa de apoptosis menor y son positivas para telomerasa (hTERT), lo cual significa que tienen una tasa de duplicación mayor. Sin embargo, las CMM no presentan estas características (Sonoyama W y cols. 2008). En 2005, Morszeck y cols. (Morszeck C y cols. 2005) aislaron células madre del folículo dental (**Figura 2.7**). Estas células tienen un potencial alto de proliferación, y se diferencian hacia odontoblastos y cementoblastos.



Figura 2.7. Imagen de un tercer molar tras su extracción con su folículo dental.

Recientemente se han aislado CMM de tejido inflamatorio periapical procedente de infecciones odontógenas. Estas células fueron positivas para los marcadores de CMM STRO-1, CD90 y CD146. Tras el segundo pase, las células mostraron niveles bajos de STRO-1 y CD146 y moderados de CD90, CD73 y CD105. Además, mostraron capacidad osteogénica pero no adipogénica. *In vivo*, estas células formaron tejido mineralizado en ratas inmunocomprometidas (Liao J y cols. 2011).

Se ha conseguido reprogramar CMM obtenidas a partir de pulpa dental, dientes deciduos y papila apical. Así, estas células adquieren pluripotencialidad y son capaces de dar lugar a cuerpos de naturaleza embrionaria y teratomas *in vivo* con las 3 capas embrionarias (Yan X y cols. 2009).

2.9 Caracterización de CMPD

No existe un marcador que caracterice exclusivamente las CMPD. Estas células son positivas para c-kit (receptor de membrana tirosina-kinasa que interacciona con el factor de célula madre. Se expresa en células derivadas de cresta neural), STRO-1 (marcador de célula madre de estroma, que reconoce el antígeno de células perivasculares, y que en la médula ósea contiene precursores osteogénicos) y CD34 (marcador de célula madre pluripotente tanto de estroma como hematopoyético) (Laino G y cols. 2006). A su vez son negativas para CD44 (detecta células de origen mesenquimal diferenciadas adheridas), CD45 (células hematopoyéticas) y CD14 (marcador monocítico) (Papaccio G y cols. 2006). Kerkis y cols. (Kerkis I y cols. 2006) cultivaron células madre de dientes deciduos positivas para marcadores de células madre embrionarias como OCT-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, implicando la pluripotencialidad de estas células. Atari y cols. (Atari M y cols. 2011; Atari M y cols. 2012) también demostraron la pluripotencialidad de las CMPD al observar que estas células eran positivas para marcadores de células madre embrionarias: SSEA-4, Oct4, Nanog, FLK-1, HNF3beta, Nestin, Sox2, Lin28, c-Myc, CD-13, CD-105, CD 90 (bajo), CD-29, CD-73 (bajo), STRO-1 (bajo); y negativas para: CD-3, CD-45 y CD-146.

Existen indicios de que una población heterogénea de CMPD reside en la pulpa dental (Gronthos S y cols. 2000; Shi S y Gronthos S

2003). Recientemente Waddington y cols. (Waddington RJ y cols. 2009) aislaron 2 estirpes diferentes de CMPD de ratas mediante distintos protocolos de cultivo. Cultivaron células madre, derivadas de cresta neural y positivas para STRO 1, CD31 (células madre adultas), LANGFR (células derivadas de cresta neural), CD105 y Notch 2 (marcadores de superficie de células endoteliales). Por otra parte, cultivaron células madre derivadas de médula ósea, y solo positivas para STRO 1 y CD31, FBN (fibronectina). Por tanto parece que se pueden diferenciar dos tipos de células madre en la pulpa dental.

Las CMPD al diferenciarse a osteoblastos siguen siendo positivas para STRO 1, pero negativas para CD34 y c-kit. También son positivas para ALP, calcein, osteonectina, CD54 CD44 y RUNX-2 (Papaccio G y cols. 2006). Además se demostró que las CMPD también reconocen estos marcadores tras dos años de criopreservación (Papaccio G y cols. 2006). En la **Tabla 2.1** se resume estos marcadores y sus características.

Revisión bibliográfica

Marcador	Origen de las células	Caracterización	Características
c-kit	CMPD de humanos	+ (Laino G y cols. 2006)	Receptor de membrana tirosina-kinasa. Interacciona con factor de célula madre. Se expresa en células de cresta neural
STRO-1	CMPD de humanos	+ (Laino G y cols. 2006)	Marcador de célula madre de estroma, que reconoce el antígeno de células perivasculares, y que en la médula ósea contiene precursores osteogénicos
CD34	CMPD de humanos	+ (Laino G y cols. 2006)	Marcador de célula madre pluripotente tanto de estroma como hematopoyético
CD44	CMPD de humanos	- (Papaccio G y cols. 2006)	Detecta células de origen mesenquimal diferenciadas adheridas
CD45	CMPD de humanos	- (Papaccio G y cols. 2006)	Marcador de células hematopoyéticas
CD14	CMPD de humanos	- (Papaccio G y cols. 2006)	Marcador monocítico
OCT-4 Nanog	CMDD de humanos	+ (Kerkis I y cols. 2006)	Marcadores de células madre embrionarias

SSEA-3			
SSEA-4			
TRA-1-60			
TRA-1-81			
LANGFR	CMPD de ratas	+ (Waddington RJ y cols. 2009)	Células derivadas de cresta neural
NESTIN	CMPD de humanos	+ (Atari M y cols. 2011)	Proteína de función desconocida que se expresa en CM neuroectodérmicas
CD31	CMPD de ratas	+ (Waddington RJ y cols. 2009)	Células madre adultas
CD 105 Notch 2	CMPD de ratas y humanos	+ (Waddington RJ y cols. 2009)	Marcadores de superficie de células endoteliales que se expresan en CMM

Tabla 2.1. Marcadores de células madre de pulpa dental.

2.10 Estudios *in vitro* sobre células madre y biomateriales de regeneración ósea

Distintos estudios *in vitro* han evaluado la interacción de CMM de médula ósea sobre biomateriales de regeneración ósea, como titanio o membranas de regeneración tisular. Herten y cols. (Herten M y cols. 2009) estudiaron la viabilidad de CMM de médula ósea sobre distintos biomateriales de regeneración ósea a las 2 horas, y a los 3, 6, 10, y 14 días. Observaron crecimiento celular sobre los siguientes biomateriales: hidroxiapatita con colágeno residual (Tutodent®), β -fosfato tricálcico (Cerasorb®) y hidroxiapatita enriquecida con péptido p-15 (PepGen P-15®). La viabilidad fue menor sobre α -fosfato tricálcico (BioBase®) y no se observó viabilidad sobre hueso bovino desproteinizado (Bio-Oss®) e hidroxiapatita nanocristalina (Ostim®). Lock y cols. (Lock J y cols. 2012) observaron que CMM se adherían sobre hidroxiapatita láctido co-glicolado y se produjo una diferenciación osteogénica de estas células tanto en presencia como en ausencia de factores osteogénicos en el medio de cultivo. Mrozik y cols. (Mrozik KM y cols. 2011) cultivaron células madre de médula ósea sobre hidroxiapatita y una proteína de matriz de esmalte. No encontraron una gran evidencia de formación ósea ectópica al implantar subcutáneamente en una rata el biomaterial con las células madre. Liu y cols. (Liu Q y cols. 2011) cultivaron células madre de médula ósea sobre membranas de colágeno. Observaron a los 4 días, mejor proliferación sobre las membranas que sobre placa de cultivo. A los 7 días de cultivo mediante microscopía electrónica, observaron una gran proliferación celular sobre las membranas. Catledge y cols. (Catledge SA

y cols. 2004) cultivaron CMM de médula ósea sobre películas de partículas depositadas de cerámica metálica nanoestructurada y discos de titanio de plasma nitrados cubiertos en medio sin suero durante una hora (grupo estudio) y sin cubrir previamente con suero bovino fetal (grupo control). Observaron que en el grupo estudio, las células madre se extendieron sobre ambos biomateriales.

Se han utilizado distintas metodologías para evaluar la interacción de estas células sobre biomateriales. Roldán y cols. (Roldan JC y cols. 2010) evaluaron la polarización y migración de CMM sobre xenoinjerto, fosfato tricálcico y fosfato cálcico mediante microscopía confocal. Observaron que las células polarizadas migraban hacia el biomaterial. También se ha observado la proliferación celular contando el DNA (Oliveira JM y cols. 2006). Hasegawa y cols. (Hasegawa T y cols. 2010) cultivaron CMM de médula ósea sobre β -fosfato tricálcico; evaluaron la proliferación celular mediante 4 formas distintas de cultivo: mojando el biomaterial, a baja presión, pipeteando o con sistema de jeringas. Observaron que el mayor número de células contenidas sobre el biomaterial se obtuvo con jeringas. Además, mediante este sistema, después de 2 semanas, se observó el mayor potencial de osteoinducción *in vitro*, y a las 8 semanas, también *in vivo*.

También se ha estudiado la proliferación de células madre procedentes de otros tejidos sobre biomateriales. De Girolamo y cols. (De Girolamo L y cols. 2008) observaron que células madre de tejido adiposo se adherían a hidroxiapatita, fragmentos óseos humanos hueso bovino desproteinizado y titanio. Heo y cols. (Heo YY y cols. 2010) cultivaron

células madre de ligamento periodontal sobre discos de titanio liso maquinado, chorreado con partículas de Al_2O_3 . Observaron mayor proliferación y expresión de osteocalcina sobre titanio con superficie rugosa. Tete y cols. (Tete S y cols. 2007) estudiaron, mediante microscopía electrónica, la interacción de células madre de folículo dental sobre hueso bovino desproteinizado (Bio-Oss®) a la semana y a las 3-6 semanas (una vez diferenciadas a osteoblastos). Observaron que las células del cultivo primario tenían una morfología similar a CMM de médula ósea. Además, una vez diferenciadas presentaron un fenotipo típico de osteoblastos y una organización tridimensional y deposición de matriz extracelular en contacto con el biomaterial.

2.11 Estudios *in vivo* sobre células madre en regeneración ósea

La ingeniería tisular es un campo emergente interdisciplinar, que aplica los principios de las ciencias biológicas y de ingeniería para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren la función de tejidos dañados y/o perdidos (Langer R y Vacanti JP 1993). En ingeniería de tisular, las matrices son necesarias para dar soporte a células u otras estructuras. Las matrices están hechas de material biodegradable, que es un producto biocompatible que es reabsorbido gradualmente una vez implantado en el cuerpo, generalmente debido a degradación enzimática (Fuchs JR y cols. 2005). En los siguientes apartados se revisan los estudios más relevantes en animales y humanos sobre regeneración

ósea y CMM. Todos los estudios mencionados aplican los principios de ingeniería tisular con células madre. Con lo cual, se usan distintas matrices como xenoinjertos (Jafarian M y cols. 2008), fluorhidroxiapatita (Pieri F y cols. 2009) o fibrina (Ito K y cols. 2006). En diferentes estudios (Yamada Y y cols. 2004b), (Yamada Y y cols. 2004a), el PRP se utiliza a modo de matriz como vehículo para las células madre, pero también, como material de injerto para evaluar su potencial de regeneración.

2.11.1 Regeneración ósea alveolar

- Estudios en animales

Diferentes estudios han comparado la regeneración ósea utilizando CMM y PRP. Yamada y cols. (Yamada Y y cols. 2004b) en defectos mandibulares de 10 mm, 8 semanas después de injertar, mostraron que las CMM y PRP fueron tan eficaces como el hueso particulado autólogo (67% y 61% de hueso regenerado respectivamente); el PRP produjo un 29% de formación ósea y los casos no regenerados un 18%. Sobre crestas edéntulas en minicerdos, Pieri y cols. (Pieri F y cols. 2009) observaron mayor formación ósea con hueso autógeno (47%) o CMM, PRP y fluorhidroxiapatita (45%) que con el PRP y fluorhidroxiapatita (38%). Yoshimi y cols. (Yoshimi R y cols. 2009) demostraron efectos similares en perros. Además, Yamada y cols. (Yamada Y y cols. 2010) evaluaron la regeneración ósea en defectos mandibulares con CMM de médula, CMPD, y células madre de dientes deciduos de sus cachorros; observaron formación de hueso con los 3 grupos en comparación con los controles

Revisión bibliográfica

(vacío o PRP). Concluyeron que las CMM de dientes deciduos pueden tener el potencial de generar un injerto entre padres e hijos.

Mylonas y cols. (Mylonas D y cols. 2007) aplicaron CMM en defectos de 5 mm con una morfología de 3 paredes y realizaron el análisis histomorfométrico en dos momentos diferentes. Cuatro semanas después del injerto, la regeneración ósea fue mayor en el grupo de CMM (58%) que en los controles (43%). Después de 3 semanas más, los resultados histomorfométricos fueron similares en ambos grupos (63% y 60% respectivamente). Estos resultados mostraron que, aunque la regeneración ósea se produce cuando las condiciones necesarias estuvieron presentes, las CMM aceleran el proceso.

Otros estudios revelaron que las CMM también pueden acelerar la formación ósea en alveolos (De Kok IJ y cols. 2005), (Marei MK y cols. 2005), defectos mandibulares de 10 mm (Jafarian M y cols. 2008), o defectos mayores (2x2 cm) (Abukawa H y cols. 2004).

- Estudios clínicos humanos

Meijer y cols. (Meijer GJ y cols. 2008) implantaron CMM para regenerar defectos de hueso alveolar en 6 pacientes. Cuatro meses después, se observó regeneración ósea en 3 de ellos. Los autores especificaron que sólo en un caso, la regeneración se llevó a cabo por las CMM, ya que la formación de hueso se produjo a más de 7 mm separado de las paredes óseas. Fracásó un implante de los 11 colocados en 5 pacientes. d'Aquino y cols. (d'Aquino R y cols. 2009) realizaron un ensayo

clínico para evaluar la regeneración ósea de CMPD en alvéolos postextracción de terceros molares impactados. Colocaron una esponja de colágeno con CMPD y compararon la regeneración con aquellos alveolos no injertados. El análisis radiográfico y la profundidad de sondaje mostraron mejores resultados en el grupo estudio. Tres meses después de la cirugía, el análisis histológico mostró hueso bien vascularizado con arquitectura laminar en el grupo estudio, mientras que los alveolos control estaban inmaduros, con hueso fibroso.

2.11.2 Elevación de seno maxilar

- Estudios en animales

Se han realizado estudios controlados en animales usando CMM para aumentar la regeneración ósea en elevaciones de seno maxilar. Pieri y cols. (Pieri F y cols. 2008) en un estudio a boca partida, realizaron 16 elevaciones de seno maxilar en 8 minicerdos. Colocaron CMM, PRP y fluorhidroxiapatita en un lado, y fluorhidroxiapatita en el otro. Doce semanas más tarde, observaron un 42% de hueso regenerado en los injertos con CMM y un 19% en los controles. Sauebier y cols. (Sauerbier S y cols. 2010) en un estudio en ovejas demostraron que las CMM aceleran la regeneración ósea en comparación con xenoinjerto solo. En otros estudios (Ohya M y cols. 2005), (Gutwald R y cols. 2009), 8 semanas después de la intervención, la regeneración ósea fue similar injertando CMM o autoinjerto particulado.

Revisión bibliográfica

- Estudios clínicos en humanos

Se han realizado estudios de series de casos utilizando CMM con diferentes biomateriales. Shayesteh y cols. (Shayesteh YS y cols. 2008) realizaron un estudio clínico 6 pacientes, donde utilizaron CMM y beta-fosfato tricálcico e hidroxiapatita como material de injerto en elevaciones de seno maxilar con menos de 3 mm de hueso residual. Tres meses después, el estudio histomorfométrico mostró un 41% de hueso regenerado. Se colocaron en 30 implantes en las áreas injertadas de los cuales 2 fracasaron.

Otros autores (Smiler D y cols. 2007), realizaron elevación de seno maxilar e injertos *onlay* con CMM y xenoinjerto o aloinjerto en 5 pacientes. Observaron regeneración ósea en las zonas injertadas mediante el análisis histológico y histomorfométrico. McAllister y cols. (McAllister BS y cols. 2009) realizaron elevaciones de seno directas a 5 pacientes con CMM y aloinjerto y vieron un 33% de hueso vital a los 4 meses. No se detalló la supervivencia de los implantes.

Gonshor y cols. (Gonshor A y cols. 2011) en un estudio controlado, compararon la regeneración ósea injertando aloinjerto y CMM o aloinjerto solo; observaron 3,7 meses después, un 32,5% de hueso vital en el grupo celular en comparación con el 18,3% del control.

Recientemente, se llevó a cabo el único ensayo clínico en el que se evaluó el potencial de las CMM en elevación de seno maxilar. Rickert y cols. (Rickert D y cols. 2010) diseñaron un estudio a boca partida en 12

pacientes, en los cuales injertaron aleatoriamente un seno maxilar con xenoinjerto y CMM y otro con xenoinjerto (70%) y hueso autólogo (30%). Quince semanas después, el análisis hitomorfométrico mostró significativamente más formación ósea en el grupo de CMM (18%) que en el control (12%).

2.11.3 Regeneración ósea periimplantaria

- Estudios en animales

Estudios en animales han evaluado las CMM combinadas con PRP con el fin de mejorar la regeneración ósea periimplantaria. Yamada y cols. (Yamada Y y cols. 2004a) regeneraron dehiscencias óseas creadas artificialmente con CMM y PRP, solo PRP, autoinjerto o controles no regenerados. Dos meses después, los implantes se colocaron en las zonas regeneradas, y después de 2 meses más, se realizó el estudio histomorfométrico. En los casos regenerados con CMM y PRP o con autoinjerto, la altura ósea se mantuvo constante. Sin embargo, en los casos regenerados con PRP solo o no regenerados (controles), se produjo la exposición de las espiras del implante. Ito y cols. (Ito K y cols. 2006) realizaron un estudio similar en el que colocaron los implantes en hueso con defectos regenerados con los siguientes materiales de injerto: CMM con PRP y fibrina, CMM con fibrina, fibrina o no regenerado. La mejor regeneración ósea periimplantaria y el mayor contacto hueso-implante se produjo cuando se utilizó CMM con PRP y fibrina.

Revisión bibliográfica

Diferentes estudios han evaluado el potencial de regeneración de CMM obtenidas de diferentes tejidos. Ito y cols. (Ito K y cols. 2011) compararon la osteointegración de implantes en hueso regenerado mediante CMPD, CMM de médula ósea y células de periostio. Crearon defectos mandibulares que fueron rellenados con células de una de estos tres tejidos utilizando PRP como matriz. Ocho semanas después, se colocaron los implantes, y tras otras 8 semanas, se evaluó el porcentaje de unión hueso-implante. Los resultados mostraron un 67%, 62% and 39 % de contacto hueso-implante para las CMPD, CMM de médula ósea y células de periostio respectivamente. En los grupos de células madre observaron hueso vital mientras que en el de células del periostio y el grupo no regenerado encontraron tejido fibroso. Kim y cols. (Kim SH y cols. 2009) observaron mayor regeneración ósea periimplantaria al injertar los defectos con CMM de médula ósea que con CMM de ligamento periodontal (35 y 32% de hueso regenerado respectivamente).

2.11.4 Distracción alveolar

- Estudios en animales

Qi y cols. (Qi M y cols. 2006) analizaron el efecto las CMM en la regeneración ósea en 40 ratas; una vez finalizada la distracción, el hueco se infiltró con CMM o con solución salina fisiológica. En ambos grupos se observó formación ósea, pero, a los 27 y 55 días tras el inicio de la distracción, se observó mayor radiodensidad y formación ósea en el grupo de CMM. Kinoshita y cols. (Kinoshita K y cols. 2008) estudiaron el efecto

de las CMM y PRP sobre la formación ósea en distracciones alveolares realizadas a 12 conejos. El estudio radiológico y morfométrico se realizó 2, 3 y 4 semanas tras la distracción. Se obtuvieron mejores resultados cuando el hueso se infiltró con CMM y PRP que con solución salina fisiológica o PRP sólo.

En la **Tabla 2.2** se detallan los resultados de los estudios.

Tipo de cirugía	Tipo de estudio	Autores y año publicación	Estudio histológico/ porcentaje de hueso regenerado	Comentarios
Regeneración ósea alveolar	Estudios controlados en animales	(Yamada Y y cols. 2004b)	CMM y PRP: 67%; Autógeno: 61%; PRP: 29% No regenerado: 18%	Defectos 10 mm. Diferencias significativas entre CMM/PRP, autoinjerto y controles
		(Pieri F y cols. 2009)	CMM+PRP+fluorohidroxiapatita(FHA): 45%; Autógeno: 47%; PRP + FHA: 38%; FHA: 1	Defectos de 3.5x8 mm. Resultados similares injertando CMM que autoinjerto.
		(Yoshimi R y cols. 2009)	PuraMatrix+CMM+PRP: 58% PuraMatrix+CMM: 50% PuraMatrix+PRP: 28% PuraMatrix: 25% No regenerado: 12% (8 semanas)	Los grupos con CMM obtuvieron mejores resultados que control, PuraMatrix®, o PuraMatrix + PRP
		(Yamada Y y cols. 2010)	Control: 19.0%; PRP: 19.7%; CMM+PRP: 52.8% CMPD+PRP: 61.6%; CMM dientes deciduos cachorros+PRP: 54.7%	CMM de dientes deciduos tienen el potencial de crear un injerto entre padre e hijos.
		(Mylonas D y cols. 2007)	Control: 43% (4 semanas) 60% (7 semanas) Estudio: 58% (4 semanas) 63% (7 semanas)	Defectos de 5mm con morfología de 3 paredes. Las CMM aceleran el proceso de regeneración ósea.
		(De Kok IJ y cols. 2005)	HA/fosfato tricálcico+CMM: 34%; HA/fosfato tricálcico:25%; Controles: 35%	La implantación de CMM no produjo inflamación.
		(Marei MK y cols. 2005)	Estudio histomorfométrico a los 4 meses	Regeneración y preservación del alveolo

		(Jafarian M y cols. 2008)	Kasios® + MSC: 65%; Kasios®: 44% Bio-Oss®+ MSC: 50%; Bio-Oss®:36% (6 semanas)	Defectos mandibulares de 10 mm. Los biomateriales óseos tienen efecto en la regeneración ósea con CMM.
		(Abukawa H y cols. 2000)	Matriz sola: Formación ósea periférica No regenerado: Fino puente óseo Matriz y células madre: defecto completamente regenerado	Defectos de 2x2 cm.
	Serie de casos en humanos	(Meijer GJ y cols. 2008)	Seis pacientes. 4 meses después de la cirugía: Hueso regenerado por CMM en un caso	Se cultivaron y expandieron CMM sobre un biomaterial óseo durante 7 días.
	Estudio prospectivo controlado humanos	(d'Aquino R y cols. 2000)	Grupo estudio: hueso vascularizado con arquitectura laminar Grupo control: inmaduros, con hueso fibroso.	CMPD en alveolos postextracción de terceros molares
Elevación de seno maxilar	Estudios controlados en animales	(Pieri F y cols. 2008)	CMM+PRP+fluorohidroxiapatita: 42% (semanas) Fluorohidroxiapatita: 19% (12 semanas)	Estudio a boca partida (16 elevaciones de seno maxilares)
		(Sauerbier S y cols. 2011)	Formación ósea significativamente (p = 0,027) más rápida en el grupo estudio	Estudio histológico a las 8 y 16 semanas. La terapia con CMM permitió la colocación más temprana de implantes.
		(Ohya M y cols. 2005)	CMM+PRP: 29, 24 y 21% (2, 4 and 8 semanas)	Estudio a boca partida en 18 conejos japoneses

Revisión bibliográfica

			Autoinjerto+PRP: 35, 28 and 21% (2, 4 y 8 semanas)		
		(Gutwald R y cols. 2009)	CMM: 19% (8 semanas), 29% (16 semanas) Autoinjerto: 20% (8 semanas), 16% (16 semanas)	CMM combinadas con xenoinjerto tienen la capacidad de formar hueso	
	Serie de casos en humanos	(Shayesteh YS y cols. 2008)		41% de hueso regenerado (3 meses)	Menos de 3 mm de hueso residual. Seis pacientes.
		(Smiler D y cols. 2007)		CMM con xenoinjerto o injerto aloplástico	5 pacientes. Medula ósea aspirada de cresta iliaca.
		(McAllister BS y cols. 2009)		CMM con aloinjerto: 33% (4 meses)	5 pacientes.
	Estudio prospectivo controlado humanos	(Gonshor A y cols. 2011)		CMM con aloinjerto: 32.5%; Aloinjerto solo: 18.3%	Colocación más temprana de implantes cuando se utiliza injerto celular
Ensayo clínico	(Rickert D y cols. 2010)		Xenoinjerto con CMM: 18% (15 semanas) Xenoinjerto con autoinjerto: 12% (semanas)	Estudio a boca partida en 12 pacientes.	
Regeneración ósea periimplantaria	Estudios controlados	(Yamada Y y cols. 2004)	CMM+ PRP: 79%; Autoinjerto: 70% PRP: 68%; No regenerado: 63%	Defectos artificiales regenerados previo a la colocación de implantes	
		(Ito K y cols. 2006)		Formación ósea mayor a las 2, 4 y 8 semanas cuando se utilizaron CMM	Mejor porcentaje contacto hueso-implante CMM+PRP+fibrina (comparado con controles)

	en animales	(Ito K y cols.) 2011	CMPD+PRP y autoinjerto+CMM+PRP: Hueso Células periostales+PRP: Tejido fibroso	Hueso formado con CMPD mostró mayor contacto hueso-implante que hueso formado con CMM de médula ósea
		(Kim SH y cols. 2009)	CMM de medula ósea: 35% CMM de ligamento periodontal: 32%	CMM de ligamento periodontal y de médula ósea.
Distracción alveolar	Estudios controlados en animales	(Qi M y cols. 2006)	Mayor regeneración con CMM que con suero fisiológico en hueso de distracción	Las CMM aceleran la formación ósea comparado controles
		(Kinoshita K y cols. 2006)	Mayor regeneración con CMM que con suero fisiológico en hueso de distracción	Las CMM con PRP aceleran la formación ósea comparado con controles

Tabla 2.2. Resumen de los resultados sobre la aplicación de células madre en regeneración ósea en implantología.

2.12 ¿Existen otros factores o proteínas útiles para aumentar la regeneración ósea?

Una serie de sustancias se han utilizado con el objetivo de aumentar la regeneración ósea, como la hormona del crecimiento (Gomez-Moreno G y cols. 2009), la hormona paratiroidea (Valderrama P y cols. 2010), o la melatonina (Calvo-Guirado JL y cols. 2010), pero hay dos en particular, las proteínas morfogenéticas óseas (cuyas siglas en inglés son BMP) y el PRP, que requieren atención debido a la cantidad de los estudios que se han realizado.

2.12.1 Proteínas morfogenéticas óseas

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), una subfamilia del factor de crecimiento transformante-beta, fueron descubiertas basándose en su actividad inductiva en la matriz ósea (Urist MR 1965). Un estudio en ratas demostró que esta proteína es indispensable para la iniciación de la cicatrización ósea tras una fractura (Tsuji K y cols. 2006). Una de estas proteínas, la BMP-2 (rhBMP₂) ha demostrado ser segura en humanos (Boyne PJ y cols. 1997), (Howell TH y cols. 1997) e inducir la formación ósea en el esqueleto (Friedlaender GE y cols. 2001).

Una revisión sistemática reciente sobre los factores de crecimiento para el aumento alveolar mostró que rhBMP₂ es más efectiva que la

BMP₇, PDGF y PTH para promover la regeneración ósea (Jung RE y cols. 2008).

Estudios controlados en animales han validado los beneficios de la ingeniería ósea con BMP₂ para la regeneración ósea periimplantaria. Se ha demostrado que la BMP₂ estimula la formación de hueso supra-alveolar en defectos verticales alrededor de implantes (Sigurdsson TJ y cols. 1997), en la regeneración de las lesiones preimplantarias (Hanisch O y cols. 1997b) y en la osteointegración del implante en hueso injertado (Hanisch O y cols. 1997a; Hanisch O y cols. 1997c). Un estudio reciente en perros (Wikesjo UM y cols. 2008) demostró que los implantes recubiertos con BMP₂ inducían la formación de hueso en defectos peri-implantarios supra-alveolares de 5 mm, sin el uso de biomateriales óseos.

También hay estudios en humanos evaluando las ventajas de la BMP₂ para la regeneración ósea. Existe una clara evidencia científica, incluyendo estudios controlados (Boyne PJ y cols. 2005), (Boyne PJ y cols. 1997) de las ventajas del BMP₂ en la elevación de seno maxilar. El hueso inducido con BMP₂ tiene propiedades ultraestructurales muy similares a la de autoinjertos óseos. Numerosos estudios (Howell TH y cols. 1997), (Fiorellini JP y cols. 2005), (Jung RE y cols. 2003) se han realizado en humanos con BMP₂ para la preservación de cresta. Se ha demostrado que la BMP₂ puede estimular la formación de un tipo de hueso muy similar al nativo.

Muchos estudios se han llevado a cabo utilizando diferentes matrices para promover la regeneración ósea. Entre las más destacadas

Revisión bibliográfica

están las xenogénicas (Jung RE y cols. 2009), (Jung RE y cols. 2003), alogénicas (Sigurdsson TJ y cols. 2001), fosfato de calcio (Wikesjo UM y cols. 2002), matriz de glicol de polietileno que contienen hidroxiapatita/fosfato tricálcico (Wikesjo UM y cols. 2002) y la matriz cerámica de colágeno (Yamashita M y cols. 2010). A pesar de todos estos estudios, los investigadores no han llegado a una conclusión clara sobre cual es la mejor matriz y por lo tanto más investigación es necesaria en este campo. Una cuestión fundamental que hay que responder es si los biomateriales de reabsorción lenta o no-reabsorción comprometen la regeneración ósea (Huang YH y cols. 2008).

2.12.2 Plasma rico en plaquetas

El PRP también es un agente muy estudiado en el campo de la regeneración ósea. Se define como una concentración autóloga de plaquetas en un pequeño volumen de plasma. En la actualidad, hay una falta de evidencia científica en la literatura a favor o en contra del uso clínico del PRP para la regeneración ósea. Una revisión sistemática publicada en 2008 (Plachokova AS y cols. 2008) concluyó que hay evidencia de efectos beneficiosos del PRP en el tratamiento de defectos periodontales, pero los beneficios para la elevación de seno parecen ser débiles. Esta revisión confirmó que no se pueden sacar conclusiones sobre otras aplicaciones del PRP en odontología. Los autores también señalaron que muchos estudios sobre este tema no se ajustan a las recomendaciones actuales sobre la calidad de estudio basado en los elementos de evaluación de Montenegro y cols. (Montenegro R y cols. 2002). Boyapati y Wang

(Boyapati L y Wang HL 2006) están de acuerdo en que no hay pruebas suficientes para apoyar el uso de PRP para la elevación de seno y que la mayoría de los estudios realizados tienen diseños inadecuados. Distintos estudios han evaluado la influencia del PRP en la regeneración ósea; mientras que algunos (Yamada Y y cols. 2004b), (Dallari D y cols. 2006), (Aghaloo TL y cols. 2005) no han encontrado mejoras en la formación ósea, otros (Anitua E 1999), (Sammartino G y cols. 2005) mostraron resultados favorables. Un estudio reciente realizado en conejos mostró que el PRP no dio lugar a la remodelación ósea superior que el coágulo durante la cicatrización temprana. Por el contrario, el hueso autógeno solo, demostró, a las 2 semanas, que aceleró la remodelación ósea (Broggini N y cols. 2010).

Cuando se combinan PRP con autoinjerto, algunos autores como Raghoobar y cols. (Raghoobar GM y cols. 2005) no encontraron beneficios al añadir PRP, mientras que otros como Thor y cols. (Thor A y cols. 2005) encontraron grandes beneficios. Consolo y cols. (Consolo U y cols. 2007) no encontraron diferencias estadísticamente significativas. Aimetti y cols. (Aimetti M y cols. 2008) observaron mayor contacto hueso-implante en el autoinjerto con PRP que en el autoinjerto solo. Al combinarlo con xenoinjerto, Froum y cols. (Froum SJ y cols. 2002) no encontraron beneficios. Torres y cols. (Torres J y cols. 2009) observaron mayor formación de hueso. Estas discrepancias en los resultados confirman la ausencia de consenso sobre el uso de PRP para la regeneración ósea.

3 JUSTIFICACIÓN

La finalidad principal de las técnicas de regeneración ósea es conseguir regeneración predecible del defecto para proveer función y estética a largo plazo con riesgo bajo de complicaciones. Otras finalidades secundarias son realizar el mínimo número posible de cirugías con baja morbilidad para el paciente, con el mínimo tiempo de curación. El potencial de regeneración ósea de las CMM ha sido evaluado en defectos óseos en animales (Yamada Y y cols. 2004b; Liu HW y cols. 2007; Lee LT y cols. 2008). Los resultados histomorfométricos de estos estudios mostraron mayor regeneración ósea utilizando CMM sobre matrices que con la matriz sola (Yamada Y y cols. 2004b), (Liu HW y cols. 2007), y resultados similares que con injertos óseos autógenos (Lee LT y cols. 2008). Además, se ha demostrado que las CMM obtenidas de pulpa dental, desde el punto de vista de la regeneración ósea, tienen propiedades similares a las de médula ósea (Yamada Y y cols. 2010). Se han estudiado otras aplicaciones clínicas de las CMPD fuera del ámbito odontológico; se ha conseguido, por ejemplo, regenerar el miocardio tras un infarto con CMPD en animales (Gandia C y cols. 2008).

Dadas las posibles aplicaciones de las CMM en el campo de la regeneración ósea en cirugía bucal, y el fácil acceso de las CMPD, queda justificada la optimización del método de obtención y la caracterización de CMPD. Hasta el momento, su aplicación está algo lejos de la realidad, puesto que para obtener un número apropiado de células, el cultivo debe mantenerse durante semanas. La mejora del protocolo de obtención (fundamentalmente en cuanto al tiempo

Justificación

requerido para obtener suficiente número de células), facilitaría su empleo en la práctica quirúrgica diaria, puesto que el paciente podría en una misma intervención recibir un tratamiento que incluyese la utilización de CMPD. Esto es de relevante importancia, ya que existen impedimentos legales para extraer un tejido del organismo, tratarlo en un laboratorio e implantarlo en un acto quirúrgico distinto. De hecho, Tirino y cols. (Tirino V y cols. 2011) en una revisión reciente sobre estrategias y perspectivas con CMPD, enfatizan en buscar métodos que acorten el tiempo de obtención de estas células. A su vez, queda justificado el estudio de la interacción de estas células con biomateriales de regeneración ósea, ya que éstos son necesarios para actuar como matriz para la correcta aplicación clínica de las células.

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

Mediante la digestión enzimática de la pulpa dental se pueden aislar células madre de este tejido (Gronthos S y cols. 2000). Estas células son positivas para distintos marcadores de membrana de células mesenquimales y negativas para otros marcadores de células madre hematopoyéticas (Papaccio G y cols. 2006). Estudios histomorfométricos *in vivo* han demostrado que las células madre en combinación con biomateriales de regeneración ósea aumentan la formación de hueso (Rickert D y cols. 2010).

Numerosos laboratorios utilizan la misma técnica para el aislamiento de CMPD: obtención del tejido, digestión enzimática con colagenasa/disypasa, detección y selección mediante marcadores selectivos (Tirino V y cols. 2011).

Nos planteamos como hipótesis de trabajo: “Mediante distintos tratamientos enzimáticos o disgregantes de la pulpa dental se puede optimizar el tiempo de obtención de células madre de este tejido. Además, su proliferación debe ser mayor a niveles tisulares de O₂ que a niveles ambientales. Las CMPD deben ser positivas para marcadores de superficie de células madre mesenquimales y negativas para marcadores de células madre hematopoyéticas. Por último, estas células deben ser capaces de adherirse y proliferar sobre biomateriales de regeneración ósea.”

4.2 OBJETIVOS

Objetivo general:

Obtener células madre de pulpa dental, optimizar el método de obtención y de cultivo de estas células, y estudiar su interacción con el biomaterial β -fosfato tricálcico.

Objetivos específicos:

- 1- Obtener células madre de pulpa dental.
- 2- Optimizar el método de obtención de células madre de pulpa dental.
- 3- Caracterizar células madre de pulpa dental usando microscopía confocal.
- 4- Estudiar el crecimiento de células madre de pulpa dental a distintas presiones de O_2 para optimizar su cultivo.
- 5- Estudiar la adhesión y el crecimiento de células madre de pulpa dental sobre el biomaterial β -fosfato tricálcico.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material

Todos los procedimientos de aislamiento, cultivo, caracterización e interacción de células madre con β -fosfato tricálcico se realizaron en condiciones de esterilidad, realizando todas las operaciones en una campana de cultivo TEISTAR® de flujo laminar vertical (**Figura 5.1**).



Figura 5.1. Campana de cultivo.

5.1.1 Material clínico

5.1.1.1 Anestesia

Jeringa, agujas, carpules de anestesia de articaína/epinefrina (1/100000), lidocaína/epinefrina (1/100000), mepivacaína. Ultracain. Normon®.

5.1.1.2 Exodoncia simple

Botador recto, botador “en T” (Winter, Pot), fórceps. Martin Solingen®.

5.1.1.3 Exodoncia quirúrgica

Lo descrito en exodoncia simple y: mango bisturí, hoja bisturí nº 15, periostotomo de Freer, separador de Minnesota, fresa de carburo de tungsteno redonda para pieza de mano, pinzas mosquito curvas, sutura de seda trenzada 3/0 (Lorca Marin®), portaagujas tipo Mayo, pinzas Adson. Martin Solingen®.

5.1.1.4 Extracción de la pulpa dental

Turbina Kavo Supertorque 660C®. Fresa cilíndrica diamantada para turbina Comet®. Sonda de exploración Carl Martin Solingen®. Pinzas Martin Solingen®.

5.1.2 Aparatos

5.1.2.1 Para cultivo celular

- Balanzas
 - Balanza de precisión SARTORIUS®, modelo TECATOR 6110 Aculab, con una sensibilidad de ± 0.0001 g.
- Centrífugas
 - Centrífuga refrigerada marca SORVALL HERAEUS®, modelo MULTIFUGE 3SR+, Thermoscientific o HERMLE Z216MK®.
- Sistema de purificación de agua
 - Marca MILLIPORE®, modelos Milli-Q y Milli-RO.
 - Marca Elga®, purelab flex.
- pHmetro
 - Marca CRISON®, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.
- Autoclave Selecta®, modelo Autester-G.
- Agitador magnético Stuart®, Hotplate stirrer, SB 162-3.
- Estufa termostaticada de cultivos
 - Thermoscientific HERAcell 150i CO₂ Incubator®.
 - BINDER CB150 5 % CO₂, 3% O₂ Incubator®.
- Microscopios
 - Microscopio óptico NIKON SE®. x10 x20 x40.
 - Microscopio óptico invertido ZEISS® Modelo ID03.
- Baño ultrasonidos PSELECTA ULTRASON®.
- Baño seco Stuart, Block heater, SBH 130 D®.

- Congeladores
 - Tanque de nitrógeno ARPEGE 140® Air Liquide -160°C.
 - -80°C marca Revco®, modelo ultima II.
 - -80°C marca Platinum 500®.
 - -20°C marca Liebherr®, modelo Comfort Nofrost.
 - -2°C Nevera Lynx®.
- Baño caliente PSELECTA PRECISTERM®.

5.1.2.2 **Para caracterización**

- Microscopio confocal Leica TCS-SP2 (Leica SA, Mannheim®) con longitud de onda de 543 nm de excitación y 555-621 nm de emisión (color rojo); longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión (color verde).
- Se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON® modelo Uvikon 810 termostatzado.
- Anticuerpos: CD-133, Oct4, Nestin, Stro-1, CD-34, CD-45

5.1.2.3 **Para interacción de CMPD y biomateriales**

Cuantificación de DNA Thermoscientific NanoDrop 2000®.

5.1.3 **Reactivos y medios de cultivo**

Determinación de proteínas: “Protein ASSAY Kit” de Sigma-Aldrich Química®, que contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin.

Material y métodos

5.1.3.1 Enzimas y reactivos

- Colagenasa tipo I SIGMA®.
- Dispasa tipo II SIGMA®.
- Termolisina (Vitacyte ,Indianapolis, IN).
- Tripsina (Invitrogen®).
- EDTA al 0,02% (tampón de Krebs sin Ca^{2+} ni Mg^{2+})

5.1.3.2 Medios de cultivo

- Dulbecco's modified Eagle® (DMEM), GIBCO, con suplemento bajo de glucosa (1mg/mL), Invitrogen®.
- Suero bovino fetal (SBF), GIBCO, Invitrogen®.
- Tampón fosfato (PBS), GIBCO, Invitrogen®.
- Antibióticos: Penicilina/Estreptomicina, GIBCO, Invitrogen®.

5.1.4 Biomateriales de regeneración ósea

β -fosfato tricálcico. Keraos®. Keramat. Santiago de Compostela. España.

5.2 Métodos

5.2.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio prospectivo, *in vitro*, no controlado. Los dientes fueron extraídos por odontólogos de la Unidad de Cirugía de la Clínica Odontológica de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, entre Mayo de 2008 y Marzo de 2012. Todos los pacientes fueron informados de las características del estudio, y aceptaron libremente colaborar con el mismo, aportando el diente extraído, el cual fue siempre exodonciado por motivos ajenos a este estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Valencia (**Anexo 1**). Así pues, los pacientes fueron informados verbalmente del estudio, leyeron una hoja de información al paciente (**Anexo 2**) y firmaron el consentimiento informado (**Anexo 3**). De la historia clínica del paciente se registró la edad y el sexo. Durante todo el estudio se mantuvo el anonimato del paciente y la protección de datos del mismo.

El cultivo de las CMPD y todo lo referente a la parte básica del estudio, se realizó en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia durante las fechas citadas previamente.

Material y métodos

De todas las pulpas recogidas se seleccionaron los siguientes datos: Diente extraído, edad y sexo del paciente, fecha de la exodoncia y del cultivo, y método de cultivo realizado.

5.2.1.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron para el cultivo de CMPD, aquellas pulpas de dientes que no presentasen clínica y/o radiológicamente ningún signo o síntoma de inflamación y/o infección.

5.2.1.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron todas aquellas pulpas de dientes que clínica y/o radiológicamente presentasen alguno de los siguientes cuadros clínicos: Pulpitis, periodontitis apical, enfermedad periodontal, fracturas que afectaran a la pulpa dental y aquellos dientes en los que durante la exodoncia se produjera una fractura del diente o se realizara la odontosección del mismo.

5.2.1.3 Recogida de datos

Durante la realización del estudio se recogieron los siguientes datos:

- Sexo y edad del paciente.
- Fecha de la exodoncia y de la extracción de la pulpa.
- Presencia o ausencia de células tras el cultivo.
- Tiempo necesario para la obtención de células. En el **Anexo 5.4** se detallan estos datos recogidos.

- Número de células cultivadas al 3 y 21% de O₂.
- Resultados correspondientes a la caracterización de CMPD con distintos marcadores.
- Cantidad de DNA en cada una de las mediciones sobre β-fosfato tricálcico.

5.2.2 **Exodoncia**

5.2.2.1 **Anestesia**

Se realizó bloqueo nervioso troncular para la extracción de dientes mandibulares y técnica infiltrativa para exodoncias maxilares con solución anestésica (articaína, lidocaína) y vasoconstrictor (epinefrina) en una relación de 1/80.000 o 1/100.000 o con mepivacaína sin vasoconstrictor.

5.2.2.2 **Exodoncia simple**

Se realizó la luxación con botadores y la extracción con fórceps. Una vez realizada la exodoncia se legó el alveolo y se colocó una gasa estéril.

5.2.2.3 **Exodoncia quirúrgica**

Fue realizada en casos de terceros molares quirúrgicos. Se realizó incisión en bayoneta. Se levantó un colgajo de espesor completo y mínima ostectomía necesaria para poder extraer el cordal. Una vez legrado el alveolo, se suturó con puntos simples. Los puntos se retiraron a la semana. Los pacientes a los cuales se les realizó

Material y métodos

exodoncia quirúrgica siguieron una pauta antibiótica profiláctica (amoxicilina 500 mg. cada 8 horas durante 1 semana o clindamicina 300 mg. cada 8 horas durante 1 semana), antiinflamatoria (ibuprofeno 600 mg. cada 8 horas durante los días que notara dolor y/o inflamación) y enjuagues con clorhexidina al 0,12% 2 veces al día durante un minuto 10 días.

A todos los pacientes se les explicaron medidas postoperatorias, que se les entregó por escrito.

5.2.2.4 Extracción de la pulpa dental

Se realizó la extracción de la pulpa dental cortando el diente a nivel de la línea amelocementaria con una turbina y una fresa diamantada a 200.000 revoluciones por minuto. A continuación se despegó la pulpa de la cámara pulpar y de los conductos radiculares con una sonda. Una vez despegada, se extrajo la pulpa con unas pinzas (**Figura 5.2**).

Entre la exodoncia y la extracción de la pulpa dental hubo un rango de tiempo de entre una hora y cuatro días. Durante este tiempo el diente se guardó en un tubo con medio de cultivo y antibióticos a 4°C.

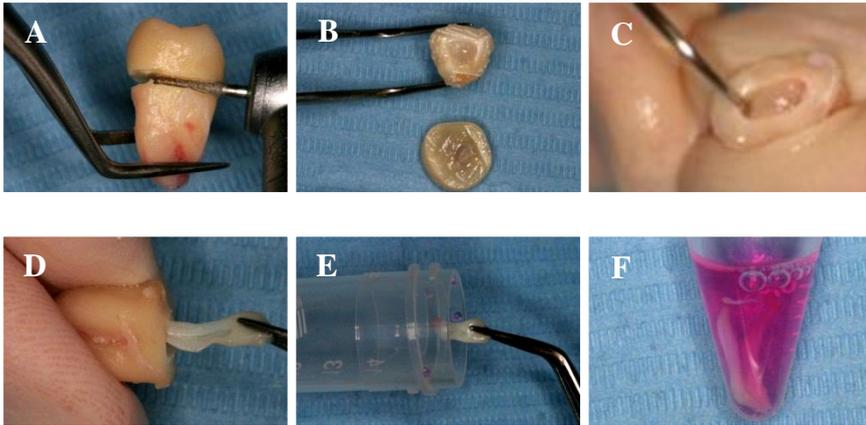


Figura 5.2. Extracción de la pulpa dental. **A:** Odontosección a nivel de la línea amelocementaria con fresa diamantada. **B:** Una vez expuesta la cámara pulpar, **C:** se despegó la pulpa con una sonda, y **D:** se extrajo con unas pinzas. **E y F:** La pulpa se conservó y transportó en tubos con medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle® con suplemento bajo de glucosa (1mg/ml) y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomina 100 µg/ml).

5.2.2.5 Almacenamiento y transporte

Una vez extraída la pulpa dental, se almacenó en tubos de 15 mL estériles con medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle® con suplemento bajo de glucosa (1mg/mL) y antibióticos (Penicilina 100U/ml y Estreptomina 100 µg/ml). La pulpa se transportó a temperatura ambiente en un tubo desde la Clínica Odontológica hasta el Departamento de Fisiología. Entre la extracción de la pulpa y su cultivo hubo un rango de tiempo de entre una y veinticuatro horas. Durante este tiempo se guardó a 4°C.

5.2.3 **Obtención de CMPD por método publicado por Gandía y cols. (Gandia C y cols. 2008) (Método A)**

- 1- Se seccionó la pulpa dental mecánicamente con una hoja de bisturí nº10.
- 2- Se recogieron los fragmentos y se realizó la digestión de estos con 2 mg/mL de colagenasa tipo I durante 90 minutos (**Método A**) en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y 3% O₂ (**Figura 5.3**).
- 3- Se centrifugó a 1000 g durante 2 minutos (**Figura 5.4**), y se recogió el precipitado y cultivó en medio de cultivo completo a 37°C, 5% CO₂ y 3% O₂. La composición del medio de cultivo es la siguiente:

- DMEM con suplemento bajo de glucosa (1mg/mL).....90% (v/v)
- Suero bovino fetal.....10% (v/v)

5.2.3.1 **Rendimiento para la obtención de CMPD**

Se consideró que existían células aisladas cuando de un fragmento pulpar adherido a la placa se desprendían células con morfología de fibroblasto, tal y como Friedstein y cols. (Friedenstein AJ y cols. 1978) describieron las CMM en 1960. Se calculó el porcentaje de obtención de CMPD de aquellas pulpas a las que se le realizó la digestión de estos con 2 mg/mL de colagenasa tipo I durante 90 minutos (**Método A**). Se observó la morfología de un cultivo mediante microscopía electrónica de barrido.

5.2.3.2 Tiempo mínimo requerido para el aislamiento de CMPD

Se calculó el tiempo mínimo requerido para el aislamiento de CMPD observando mediante microscopio óptico el cultivo celular. Se consideró que existían células aisladas cuando de un fragmento pulpar adherido a la placa se desprendían células. Éstas tuvieron una morfología de fibroblasto tal y como Friedstein (Friedenstein AJ y cols. 1978) describieron. Se consideró “tiempo 0” una vez finalizada la disgregación y/o digestión de la pulpa. Se observó desde entonces el cultivo todos los días y se anotó el tiempo exacto de aislamiento de CMPD.



Figura 5.3. A y B: Estufa de cultivo celular. Condiciones: 37°C, 5% de CO₂ y 3% de O₂.

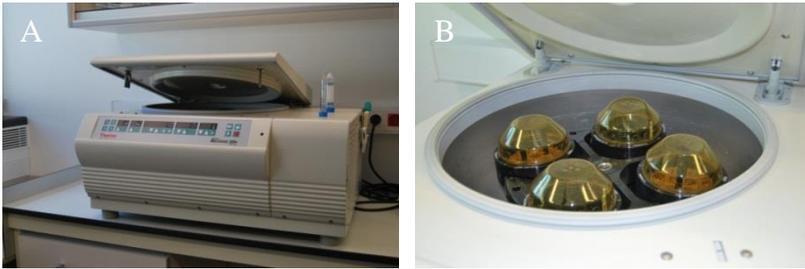


Figura 5.4. A y B: Centrifuga para precipitar los fragmentos pulpaes digeridos.

5.2.4 Optimización del método de obtención de CMPD

Se efectuaron todos los pasos de la manera descrita en el apartado anterior pero el tejido pulpar se trató utilizando distintos agentes digestivos (colagenasa, dispasa, termolisina), disgregantes (EDTA) o mecánicos (fragmentación mecánica, sonicación) de forma aislada o combinando los unos con los otros.

5.2.4.1 Método B: Obtención de CMPD realizando la disgregación de la pulpa con EDTA

Se realizó la disgregación de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA al 0,02% (tampón de Krebs sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) durante 30 minutos. A continuación se centrifugó y cultivó de la forma descrita en el apartado correspondiente a “obtención de CMPD”.

5.2.4.2 Método C: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con EDTA y colagenasa tipo I

Se realizó la digestión de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA durante 10 minutos y 2 mg/ml de colagenasa tipo I durante 90 minutos.

5.2.4.3 Método D: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 1 mg/ml de colagenasa durante 13 horas

Se realizó la digestión de la pulpa con 1 mg/ml de colagenasa tipo I durante 13 horas.

5.2.4.4 Método E: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con EDTA y colagenasa/disposa

Se realizó la digestión de la pulpa con 2mg/ml EDTA durante 10 minutos y 2mg/ml de colagenasa tipo I y 4mg/ml de disposa tipo II durante 40 minutos.

5.2.4.5 Método F: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con EDTA y colagenasa/disposa y sonicación

Se realizó la digestión de la pulpa con 2mg/ml EDTA durante 10 minutos, 4mg/ml de colagenasa tipo I y 4mg/ml de disposa tipo II durante 40 minutos. Una vez realizada la digestión de la pulpa se procedió a realizar la sonicación del cultivo durante un minuto.

Material y métodos

5.2.4.6 Método G: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con EDTA, colagenasa/disypasa, termolisina y sonicación.

Se realizó la digestión de la pulpa con 2mg/ml EDTA durante 10 minutos, 4mg/ml de colagenasa tipo I, 4mg/ml de disypasa tipo II durante 40 minutos y 13ng/ml de termolisina durante 40 minutos. Una vez realizada la digestión de la pulpa se procedió a realizar la sonicación del cultivo durante un minuto.

5.2.4.7 Método H: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con termolisina

Se realizó la digestión de la pulpa con 13ng/ml de termolisina durante 40 minutos.

5.2.4.8 Método I: Obtención de CMPD realizando fragmentación mecánica

Se fragmentó la pulpa con una hoja de bisturí del número 10 sobre una placa con medio de cultivo. No se realizó digestión de la pulpa.

Las CMPD se consideraron aisladas cuando se observaron mediante el microscopio óptico células adheridas a la placa de cultivo, con forma de fibroblastos. El medio de cultivo fue cambiado a los 7 días. Cuando el cultivo primario alcanzó confluencia, es decir, cuando la placa estaba llena de células, se realizó el pase a otra placa más grande.

5.2.5 Caracterización de las células madre mesenquimales mediante la inmunofluorescencia por microscopía confocal

El estudio de microscopía confocal se realizó con una unidad de barrido láser confocal Leica TCS-SP2 (Leica SA, Mannheim®) con un láser de argón y otro de neón-helio unido a un microscopio invertido Leica DM1RB®. Se utilizaron placas Lab-Tek de la empresa Nalge Nunk International, previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma Aldrich Química). Se colocó la poli-L-lisina 24 horas antes manteniendo las placas en estufa a 37°C. Posteriormente se realizó dos lavados con PBS y uno con DMEM previo a la siembra de las células.

Se colocaron 200.000 células por pocillo que se incubaron en 1mL de medio. Los anticuerpos primarios usados para caracterizar las células fueron:

- CD133 (Prominin-1) (Sigma)
- Oct4 (Sigma)
- Nestin (Sigma)
- Stro-1 (MILLIPORE)
- CD34 (Cell Signaling)
- CD45 (Cell Signaling)

Los fluorocromos usados fueron:

- Anti-Rabbit IgG TRITC conjugado (Sigma®)

Material y métodos

- Anti-Mouse IgG FITC conjugado (Sigma®)

Reactivos:

- PBS pH 7.4, (Invitrogen®)
- Formaldehido al 3.7% (Panreac®)
- Glicina 50 mM (Sigma®)
- Triton X-100 al 0.25% (FLUKA Biochemika®)
- Albumina de suero Bovino (BSA) al 3% (Roche®)
- Igepal 0.1% (Sigma®)

Preparación de las muestras:

Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente excepto las incubaciones con los anticuerpos.

- 1- Se lavaron las células con PBS (atemperado a 37°C).
- 2- Se fijaron las células con 3,7% Formaldehido en PBS durante 10 minutos.
- 3- Se lavó durante 10 minutos con PBS, neutralizó 10 minutos con 50mM de Glicina en PBS y permeabilizó con 0.25% Triton X-100 en PBS 10 minutos.
- 4- Se bloqueó con 3% BSA en PBS 10 minutos.
- 5- Se incubó con anticuerpo primario diluido en 3% BSA disuelto en PBS durante 3 horas a 37°C.
- 6- Se lavó con 0.1% Igepal en PBS 3 veces (10 minutos cada lavado).

- 7- Se incubó con anticuerpo secundario diluido en 3% BSA en PBS durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad.
- 8- Se lavó con PBS 3 veces (10 minutos cada lavado).

5.2.6 Cultivo de CMPD a distintas presiones de oxígeno y realización de curva de crecimiento

Se cultivaron CMPD al 3% y al 21% de O₂. Se contaron las células en cada frasco y se determinó la viabilidad celular a las: 6 horas, 1, 2, 3, 5, 7 y 8 días de cultivo. En el momento inicial, se colocaron 250.000 células en la placa de cultivo.

Para contar las células, se procedió de la manera siguiente:

- 1- Se lavó la placa 2 veces con PBS pH 7.4 previamente atemperado a 37°C.
- 2- Se añadió tripsina (aproximadamente 1mL) a la placa de 25cm² para levantar las células.
- 3- Se detuvo el efecto de la tripsina con medio de cultivo completo y se recogieron las células levantadas.
- 4- Se centrifugó a 1500g durante 3 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió el precipitado en medio de cultivo completo DMEM para contar las células usando la cámara de Neubauer.

Se utilizaron 4 cultivos distintos para cada uno de los momentos en los que se realizó el cómputo (6 horas, 1, 2, 3, 5, 7 y 8

Material y métodos

días), con lo que se utilizaron 28 cultivos en total. Para realizar la curva de crecimiento se hizo una media del cómputo de los 4 cultivos para cada momento medido.

5.2.7 Adhesión y crecimiento de CMPD a β - fosfato tricálcico

5.2.7.1 Adhesión de CMPD a β - fosfato tricálcico

Para comprobar la posible interacción de las CMPD con el biomaterial β -fosfato tricálcico, se procedió de la manera siguiente:

- 1- Se usaron CMPD de una línea celular de la pulpa dental con 4 pases realizados.
- 2- Se sembraron 200.000 células sobre el biomaterial β - fosfato tricálcico. Para ello se usó un tubo de 15 mL, donde se colocó el biomaterial sobre el cual se sembraron las CMPD en presencia de medio de cultivo completo DMEM con suplemento bajo de glucosa (1g/L) y SBF al 10 %.
- 3- A los 7, 13, 18 y 23 días de cultivo a 37°C; 5% CO₂; 3% O₂, se comprobó la adhesión de las CMPD sobre el biomaterial usando el microscopio óptico.

5.2.7.2 Crecimiento de las CMPD sobre el biomaterial β - fosfato tricálcico

Para estudiar la proliferación de CMPD sobre el biomaterial, se siguió el mismo protocolo del apartado anterior usando 4 discos sobre los cuales se sembró la misma cantidad de células (200.000/por disco),

y se congelaron a -80°C sucesivamente los días 7, 13, 18 y 23 de cultivo.

Para evaluar el crecimiento de las CMPD sobre el biomaterial, se cuantificó el DNA extraído en cada momento (7, 13, 18 y 23 días de cultivo). Al saber la cantidad de DNA, se estimó el número de células que había en cada momento. Para hacer la correspondencia, se realizó previamente una curva patrón contando el DNA que había en distintas cantidades concretas de células.

Aislamiento de DNA

El aislamiento de DNA se llevó a cabo utilizando un producto registrado llamado Trizol[®], de la casa comercial ROCHE. El método se basa en utilizar las propiedades de solubilidad del DNA en solventes acuosos orgánicos y alcoholes. De este modo podremos separar las proteínas y el RNA, del DNA

Reactivos:

- Tampón de extracción: Trizol[®], Invitrogen.
- Cloroformo (Sigma[®]).
- Isopropanol (Sigma[®]).
- Etanol 70 % (CARLO ERBA Reagents[®]).
- Agua con dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma[®]).

Material y métodos

Procedimiento:

Según las instrucciones proporcionadas por el laboratorio que comercializa el Trizol[®], seguimos los siguientes pasos, para cada una de las muestras:

- 1- Se añadió 1mL de Trizol[®] por cada 4 millones de células.
- 2- Después se incubaron las células con Trizol[®] durante 2-3 minutos se añadieron 200 μ L de cloroformo por cada mililitro de Trizol[®] empleado.
- 4- Se mezclaron durante 15 segundos agitando con la mano y se dejaron incubar durante 2-3 minutos.
- 5- Se centrifugaron las muestras a menos de 1200g durante 10 minutos. En este punto se obtuvo el DNA en la fase orgánica.
- 6- Se recogió el sobrenadante, correspondiente a la fase orgánica en un nuevo tubo y se añadió 300 μ L de etanol al 100%, mezclándolo y dejándolo incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- 7- Se centrifugó a 2000g durante 5 minutos a 4°C.
- 8- Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado de DNA 2 veces con 0.1 M citrato sódico en etanol al 10% (30 minutos cada lavado a temperatura ambiente).
- 9- Se centrifugó a 2000g 5 minutos a 4°C.
- 10- Se resuspendió el precipitado en 1mL etanol al 75%, se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000g a 4°C.

11- Se secó el precipitado del DNA de 5 a 15 minutos y se resuspendió en 300 μ L NaOH 8mM.

12- Se cuantificó el DNA con el Thermoscientific NanoDrop 2000.

5.2.8 Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realizó un análisis de la varianza. La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de aquellos grupos en los cuales F no fue significativa para un valor $p \leq 0.05$. Luego, el grupo de datos para los que F fue significativa fue analizado por el test de la t de Student. La simbología empleada en la presente tesis es la siguiente: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5.3 Documentos anexos

UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA
Vicerrectorat d'Investigació i Política Científica

D. Fernando A. Verdú Pascual, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 18 de octubre de 2010, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

"Utilización de células madre de origen dental para enriquecimiento del biomaterial fosfato tricálcico como matriz para regeneración ósea en cirugía previa a la colocación de implantes dentales",

cuyo investigador principal es D. José Viña Ribes, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a veinte de octubre de dos mil diez .

Firmado digitalmente por
FERNANDO ALEJO|VERDU|
PASCUAL
Motivo: Certifico la precisión e integridad de este documento
Fecha: 2010.10.23 05:49:39 +02'00'

Carrer Blasco Ibañeta, 11
46100 BURJASSOT (València)

Telèfon: (91) 336 41 00
Fax: (91) 336 32 21
e-mail: vicerrectoria@uv.es

Anexo 5.1. Informe del comité de ética de la Universidad de Valencia.

Clínica Odontológica, Unidad de Cirugía

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Le invitamos a participar en el presente estudio sobre la obtención de células madre de pulpa dental que se está llevando a cabo en la Universidad de Valencia. Podrá hablar con el investigador para aclarar sus dudas y si decide no participar en el estudio, esto no afectará de ninguna manera a la calidad de su tratamiento odontológico.

Objetivos del estudio:

- Obtener células madre de pulpa dental.
- Mejorar el método de obtención de estas células.
- Estudiar la interacción de las células con biomateriales de regeneración ósea.

Tratamiento del estudio: Durante el estudio, se registraran datos referentes a su historia médica (edad, sexo), así como a las características clínicas del diente a extraer.

Posibles riesgos: No existen riesgos para el paciente asociados a este estudio.

Participación voluntaria: Puede retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que ofrecer explicación alguna sobre sus razones. El abandono del estudio no condicionara en absoluto los tratamientos odontológicos en el futuro.

Confidencialidad: Todos los datos referentes a su participación en el estudio se almacenarán y analizarán en una base de datos electrónica, sin mención expresa de su nombre.

Anexo 5.2. Modelo de hoja de información al paciente.

Clínica Odontológica, Unidad de Cirugía

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre y Apellidos

Edad

Sexo

He sido informado/a y acepto libremente entregar mi diente, extraído por motivos ajenos a este estudio, para el cultivo y análisis de las células de la pulpa dental.

Fecha:

Firma:

Anexo 5.3. Modelo de consentimiento informado.

Método de disgregación	Pulpas	Fecha de cultivo	Aparición de CMPD	Edad (años)	Sexo
Colagenasa 2mg/mL 90 min	T1	8-05-08	NO	22	Mujer
	T2	19-05-08	NO	15	Mujer
	T3	9-05-08	14	25	Mujer
	T4	19-05-08	14	27	Mujer
	T5	20-05-08	13	21	Mujer
	T6	27-05-08	10	23	Mujer
	T7	28-05-08	11	42	Mujer
	T8	28-05-08	12	48	Mujer
	1	29-05-08	11	54	Mujer
	2	29-05-08	14	25	Mujer
	3	3-06-08	14	24	Mujer
	4	05-06-08	14	19	Mujer
	5	05-06-08	13	42	Mujer
	6	05-06-08	13	33	Mujer
	7	09-06-08	11	29	Hombre
	8	09-06-08	8	27	Hombre
	9	09-06-08	10	33	Mujer
	10	17-06-08	11	30	Hombre
	11	23-06-08	9	37	Mujer
	12	25-06-08	11	22	Hombre
	13	25-06-08	NO	32	Mujer
	14	4-02-09	7	21	Mujer
	15	7-05-09	9	21	Mujer
16	20/10/2009	NO	30	Hombre	
17	20/10/2009	NO	38	Mujer	
18	20/10/2009	14 días	14	Mujer	
19a	23/10/2009	14 días	24	Mujer	
20	26/10/2009	14 días	31	Mujer	
22	30/10/2009	14 días	30	Mujer	
23	02/11/2009	NO	22	Mujer	

Material y métodos

	24	05/11/2009	NO	32	Mujer
	25	05/11/2009	10 días	22	Mujer
	26	12/11/2009	7 días	30	Mujer
	SI2	20/11/2009	NO	42	Hombre
Cortadas mecánicamente	28	13/11/2009	NO	26	Hombre
	29 ^a	13/11/2009	NO	24	Mujer
	29b	13/11/2009	NO	24	Mujer
	*1	3-12-2009	NO	12	Mujer
	*2	12-12-2009	NO	21	Mujer
	*3	15-12-2009	NO	20	Hombre
EDTA 2mg/mL 30 min	EDTA 1	15-5-2009	7 días	27	Hombre
	EDTA 2	1-6-2009	7 días	35	Hombre
	EDTA 3	9-6-2009	NO	35	Mujer
	EDTA 4	12-6-2009	NO	43	Mujer
Colagenasa 1mg/mL 13h	41	26/01/2010	NO	23	Mujer
	42	26/01/2010	NO	34	Hombre
	44 ^a	02/02/2010	SI 5 días	20	Mujer
	45 ^a	02/02/2010	SI 5 días	24	Mujer
	43	02/02/2010	SI 10 días	24	Hombre
	44b	02/02/2010	SI 10 días	20	Mujer
	45b	02/02/2010	SI 10 días	24	Mujer
	64b	31/05/2010	SI 36 h	30	Mujer
	65 ^a	31/05/2010	SI 36 h	25	Mujer
	67 ^a	08/06/2010	SI 48h	17	Mujer
	67b	08/06/2010	SI 48h	17	Mujer
	68	08/06/2010	SI 48h	25	Mujer
Ns	08/06/2010	SI 24h	28	Hombre	
EDTA 2mg/mL+colagenasa 2mg/mL 90 min	31	20/11/2009	SI 5 días	16	Hombre
	SI1	20/11/2009	SI 5 días	18	Mujer
	SI3	20/11/2009	SI 5 días	20	Mujer
	30	20/11/2009	SI 7 días	26	Hombre
	SI4	20/11/2009	SI en 7 días	21	Hombre

	33a	27/11/2009	SI 5 días	24	Mujer
	33b	27/11/2009	SI 5 días	19	Mujer
<p>EDTA 2mg/mL 10min+</p> <p>Colagenasa 2mg/mL+</p> <p>Dispasa 4mg/mL 40min</p>	46a	24/02/2010	NO	38	Mujer
	46b	24/02/2010	NO	38	Mujer
	47	24/02/2010	NO	18	Hombre
	60	19/05/2010	SI 7 días	17	Hombre
	61	25/05/2010	SI 5 días	25	Mujer
	62	25/05/2010	SI 6 días	32	Mujer
	63	25/05/2010	SI 3 días	29	Hombre
	71a	14/07/2010	SI 2 días	26	Hombre
	71b	14/07/2010	SI 2 días	30	Hombre
	72	14/07/2010	SI 2 días	23	Mujer
	73	14/07/2010	SI 2 días	17	Hombre
	74	14/07/2010	SI 2 días	27	Mujer
	75	14/07/2010	SI 2 días	25	Mujer
	<p>EDTA 2mg/mL 10min+</p> <p>Colagenasa 2mg/mL+</p> <p>Dispasa 4mg/mL+</p> <p>Sonicar 1 min 37°C</p>	76a	08/09/2010	SI 24h	22
76b		08/09/2010	SI 24h	22	Mujer
77		27/09/2010	SI 36h	32	Hombre
78		28/09/2010	SI 24h	48	Mujer
79		30/09/2010	SI 17 h	19	Hombre
80		30/09/2010	SI 17 h	29	Mujer
81		01/10/2010	SI 3 días	30	Mujer
83		04/10/2010	SI 3 días	18	Mujer
84		04/10/2010	SI 20h	29	Mujer
85		05/10/2010	SI 2 días	40	Hombre
86		05/10/2010	SI 3 días	38	Mujer
87a		13/10/2010	SI 36 h	25	Mujer
87b		13/10/2010	SI 7 días	25	Mujer
88a		14/10/2010	SI 13 h	17	Mujer
88b		14/10/2010	SI 13 h	17	Mujer
89		19/10/2010	SI 2 días	24	Hombre
90	26/10/2010	SI 2 días	32	Hombre	
91a	26/10/2010	SI 2 días	19	Mujer	

Material y métodos

	91b	26/10/2010	SI 2 días	19	Mujer
	92a	27/10/2010	SI 2 días	19	Mujer
	92b	27/10/2010	SI 5 días	19	Mujer
	93a	28/10/2010	SI 4 días	35	Mujer
	93b	28/10/2010	SI 4 días	37	Hombre
	94	08/10/2010	SI 14h	18	Hombre
EDTA 2mg/mL 10 min + Colagenasa 4mg/mL + Dispasa 4mg/mL 40 min+ Termolisina 30 µL Sonicar 1min baño 37°C	95a	10/11/2010	SI 14h	29	Mujer
	95b	10/11/2010	SI 14h		Mujer
	99	23/11/2010	SI 14h	19	Mujer
	100	24/11/2010	SI 15h	23	Mujer
	101	24/11/2010	SI 15h	21	Mujer
	102	24/11/2010	SI 23h	21	Mujer
	103	29/11/2010	SI 17h	38	Mujer
	104	30/11/2010	SI 10h	37	Hombre
	105	30/11/2010	SI 10h	53	Mujer
	106	30/11/2010	SI 10h	21	Mujer
	107	30/11/2010	SI 10h	54	Mujer
	108	01/12/2010	SI 12h	24	Hombre
	109	15/12/2010	SI 8h	24	Mujer
	110	15/12/2010	SI 8h	32	Hombre
Termolisina 30 µL	111	20/12/2010	SI 11h	41	Hombre
	112	20/12/2010	SI 15h	67	Hombre
	96	22/11/2010	NO	24	Mujer
	97	22/11/2010	NO	22	Hombre
	98	22/11/2010	SI 20h	19	Mujer

Anexo 5.4. Tabla de recogida de datos referentes a la edad y sexo de los pacientes, método de aislamiento utilizado y tiempo requerido para la obtención de CMPD.

6 RESULTADOS

6.1 Obtención de CMPD por método publicado por Gandía y cols. (Gandia C y cols. 2008) (Método A)

El primer objetivo fue obtener células madre de pulpa dental. Para ello se siguió una metodología ya descrita en la literatura (Gandia C y cols. 2008) que consistió en realizar la digestión de la pulpa con 2mg/mL de colagenasa I durante 90 minutos (*Método A*).

6.1.1 Rendimiento para la obtención de CMPD

Se emplearon 34 pulpas, correspondientes a 34 pacientes, 6 hombres y 28 mujeres de 14 a 54 años. Se aislaron las células con esta metodología y se observó crecimiento en 26 casos. En 7 casos no se observó crecimiento, y en uno se infectó el cultivo (**Tabla 6.1**). El porcentaje de eficacia de obtención de CMPD fue del 76,4 %.

Sexo (de las pulpas)	Edad (años)	Tiempo aislamiento	Porcentaje de obtención
6 hombres	14 a 54	7 a 14 días	76.4 %
28 mujeres			

Tabla 6.1. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2mg/mL de colagenasa I durante 90 minutos.

Resultados

La **Figura 6.1** muestra una fotografía de un cultivo de CMPD, hecha con microscopio electrónico a los 12 días de cultivo. Viendo la densidad de células podemos observar un crecimiento óptimo (**Figura 6.1A**). En la **Figura 6.1B** vemos la forma característica de fibroblasto que adquieren las CMM.

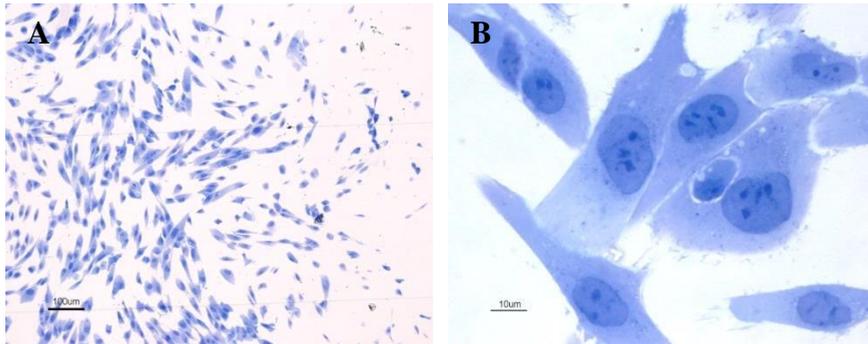


Figura 6.1. A y B: Imágenes al microscopio electrónico de CMPD correspondiente a un hombre de 17 años realizando la digestión de la pulpa con 2mg/mL de colagenasa I durante 90 minutos.

6.1.2 Tiempo mínimo requerido para el aislamiento de CMPD

En los 26 casos donde se obtuvieron CMPD, éstas se observaron en la placa de cultivo entre el séptimo y el decimocuarto día de cultivo (**Tabla 6.1**). La **Figura 6.2** muestra, mediante microscopía óptica, la evolución de un cultivo correspondiente a una pulpa dental a la cual se le realizó la digestión con 2mg/mL de colagenasa I durante 90 minutos. Se pudo observar:

- Una imagen de microscopio óptico donde existen fragmentos pulpaes en suspensión (flecha roja). La imagen corresponde a el séptimo día de cultivo (**Figura 6.2A**). No se observan células adheridas a la placa.
- En la imagen a los 14 días de cultivo (**Figura 6.2B**), existen fragmentos pulpaes adheridos a la placa (flecha roja), de los cuales se desprenden células con morfología de fibroblasto correspondientes a CMPD (flecha verde). Friedenstein y cols. (Friedenstein AJ y cols. 1978) describieron hace décadas esta morfología característica de las CMM.
- A los 18 días se observa la placa confluyente de CMPD. Se puede observar como las células están en contacto entre sí (**Figura 6.2C**). Llegado este momento se realizó en todos los cultivos un pase de las células a una placa mayor.

Resultados

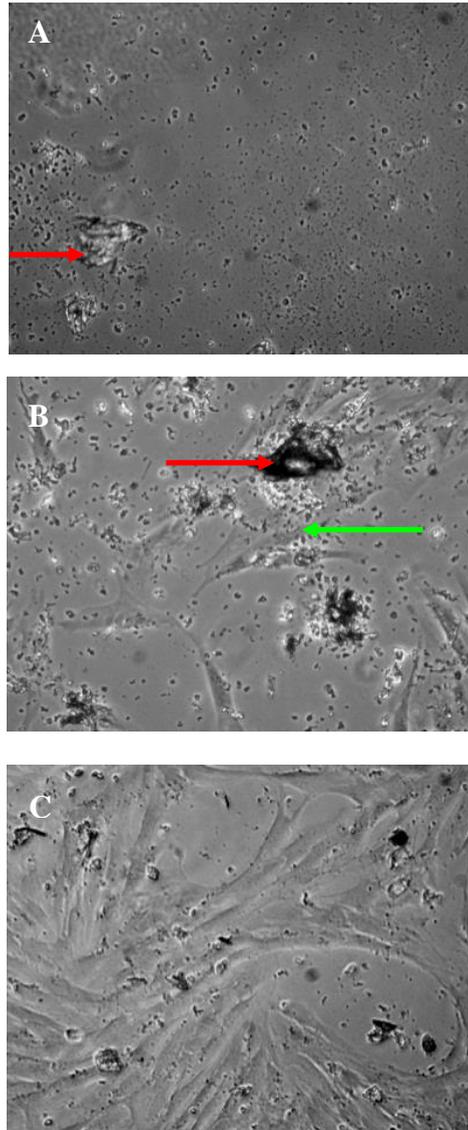


Figura 6.2. Obtención de CMPD realizando la digestión con 2mg/mL de colagenasa durante 90 minutos. Imágenes a microscopía óptica a 400x aumentos de un cultivo de una pulpa correspondiente a un hombre de 35 años. Las figuras muestran diferentes tiempos de cultivo: **A:** Cultivo a los 7 días. Se observan fragmentos pulpares en suspensión (flecha roja). **B:** Cultivo a los 14 días. De los fragmentos pulpares, se desprenden CMPD adheridas a la placa (flecha verde). **C:** Cultivo a los 18 días. La placa de cultivo está confluyente.

6.2 Optimización del método de obtención de CMPD

Para la aplicación clínica de células madre, lo ideal es aislar y autoinjertar las células durante el mismo acto, evitando el aislamiento y la expansión de las células en el laboratorio. Con lo cual, el tiempo de obtención de las células es un factor de gran importancia. Una de las claves para acortar este tiempo, es aumentar el grado de disgregación sin dañar las células. Por ello, el segundo objetivo de la presente tesis fue optimizar el método de obtención, es decir, acortar al máximo el tiempo necesario para obtener las CMPD. Se realizaron para tal fin, una combinación de metodologías originales y otras descritas en la literatura.

En total, en este segundo objetivo, se cultivaron 86 pulpas de 73 pacientes. Veintinueve de esas pulpas correspondieron a hombres y 57 pulpas a mujeres con edades comprendidas entre 14 y 67 años.

Ya que el método utilizado en primer lugar para obtener CMPD (primer objetivo) fue denominado *Método A*, se comienza ahora describiendo los resultados con el *Método B*.

6.2.1 Método B: Obtención de CMPD realizando la disgregación de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA.

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es un quelante de cationes divalentes en tampón fosfato que se emplea para aumentar la disociación celular. El EDTA se ha utilizado para aislar otras células como hepatocitos (Vina J y cols. 1978), pero no para aislar CMPD. La literatura científica utiliza agentes digestivos (colagenasa, dispasa, etc.) para aislar CMPD, pero no existe ningún artículo que utilice el EDTA. Este dato es importante desde el punto de vista de que el EDTA es un quelante del Ca que rompe los desmosomas que unen las células, y no un agente digestivo que digiere la red de proteínas intercelulares.

Se cultivaron 4 pulpas correspondientes a 2 hombres de 27 y 35 años y 2 mujeres de 35 y 43 años, realizando la digestión con 2 mg/ml de EDTA al 0,02% (tampón de Krebs sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Se aislaron CMPD en 2 casos a los 7 días. En los otros 2 cultivos no se observó crecimiento. El porcentaje de obtención de CMPD fue del 50% (**Tabla 6.2**).

Sexo (de los donantes de pulpas)	Edad (años)	Tiempo aislamiento		Porcentaje de obtención
2 hombres	23 a 47	No crecimiento	2 pulpas	50 %
2 mujeres		7 días	2 pulpas	

Tabla 6.2. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó disgregación con 2 mg/ml de EDTA.

En la **Figura 6.3** se muestra un cultivo donde se observó presencia de CMPD y crecimiento de las mismas:

- A los 7 días, se observa un fragmento pulpar (flecha roja) del cual aparecen, adheridas a la placa, CMPD con la morfología típica de fibroblasto (flecha verde) (**Figura 6.3A**).
- A las 3 semanas, la placa de cultivo comienza a estar confluyente (**Figura 6.3B**).

Resultados

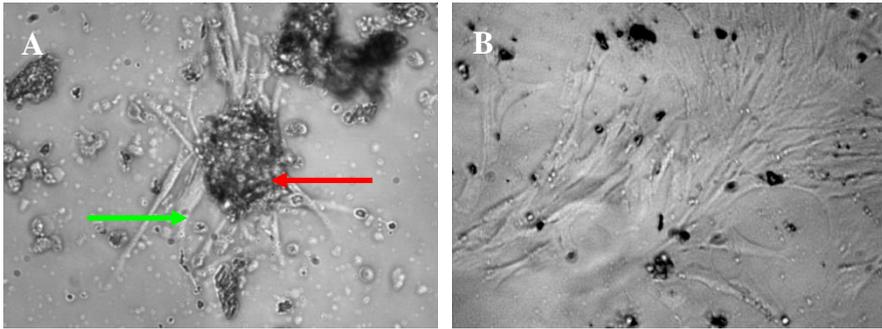


Figura 6.3. Imágenes representativas de microscopía óptica a 400x y 200x aumentos respectivamente de CMPD aisladas realizando la disgregación con 2 mg/ml de EDTA. Estas células corresponden a un hombre de 35 años. Imágenes correspondientes a distintos momentos del cultivo: **A:** Imagen a los 7 días de cultivo. **B:** A las 3 semanas del cultivo.

Aunque la muestra fue muy pequeña, se demostró que con este método en el cual se utiliza un agente quelante y no un agente digestivo, se obtuvieron CMPD. No se consiguió acortar el tiempo de obtención respecto al *Método A*.

6.2.2 **Método C: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA y 2 mg/ml de colagenasa tipo I**

Mediante los 2 métodos anteriores se obtuvieron CMPD. Con la finalidad de acortar el tiempo de aislamiento de las CMPD, se decidió combinar los dos tratamientos anteriores.

Se emplearon 7 pulpas cultivadas de 6 pacientes de edades comprendidas entre 16 y 26 años. Se obtuvieron CMPD en todos los

casos entre el quinto y el séptimo día. El porcentaje de obtención de CMPD fue del 100 % (**Tabla 6.3**).

Sexo (de las pulpas)	Edad (años)	Tiempo aislamiento		Porcentaje de obtención
3 hombres	16 a 26	5 días	5 pulpas	100 %
4 mujeres		7 días	2 pulpas	

Tabla 6.3. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2 mg/ml de EDTA y 2 mg/ml de colagenasa tipo I.

En la **Figura 6.4** se observa un cultivo en el cual se realizó la digestión de la pulpa con este método a los 7 días de aislamiento.

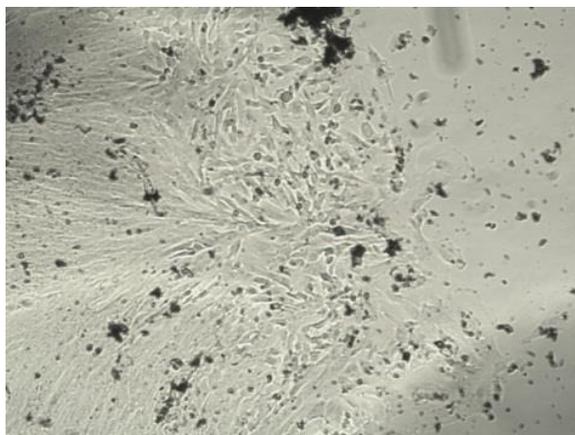


Figura 6.4. Imagen de cultivo a los 7 días de aislamiento realizando la digestión con 2 mg/ml de EDTA y 2 mg/ml de colagenasa tipo I. Microscopía óptica a 100x aumentos.

Resultados

Combinando 2 métodos (disgregación con EDTA y digestión con colagenasa) se consiguió acortar ligeramente el tiempo de obtención y el rendimiento se optimizó alcanzando el 100%.

6.2.3 Método D: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 1 mg/ml de colagenasa durante 13 horas

Se cultivaron 13 pulpas de 10 pacientes con edades comprendidas entre 17 y 34 años. Este método está descrito en la literatura para el aislamiento de células de córnea (Li W y cols. 2007). En este método se pretendió estudiar si aumentando el tiempo de digestión de la pulpa, las células no morían y se obtenían CMPD en menor tiempo. Con este método se observó crecimiento de CMPD en 11 casos (**Tabla 6.4**). El porcentaje de obtención de CMPD fue del 84,6 %. Las primeras células se observaron entre 24 horas y 10 días de cultivo.

Sexo (de pulpas)	Edad (años)	Tiempo aislamiento		Porcentaje de obtención
3 hombres	17 a 34	No crecimiento	2 pulpas	84,6 %
		24 h.	1 pulpa	
10 mujeres		48 h.	3 pulpas	
		36 h.	2 pulpas	
		5 días	2 pulpas	
		10 días	3 pulpas	

Tabla 6.4. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 1 mg/ml de colagenasa durante 13 horas.

En la **Figura 6.5** se describe mediante imágenes, la evolución de un cultivo en el cual se obtuvieron las primeras células a las 24 horas tras el aislamiento. Se observó:

- Inmediatamente tras las 13 horas de digestión, la pulpa está más disgregada (flechas rojas) que con las otras metodologías ya descritas (**Figura 6.5A**).
- A las 24 horas de cultivo, ya se observan CMPD (flecha verde) adheridas a la placa (**Figura 6.5B**).
- A las 48 horas el número de CMPD es abundante en algunas zonas del cultivo (flecha verde) (**Figura 6.5C**).
- A los 17 días la placa está confluyente (**Figura 6.5D**).

Resultados

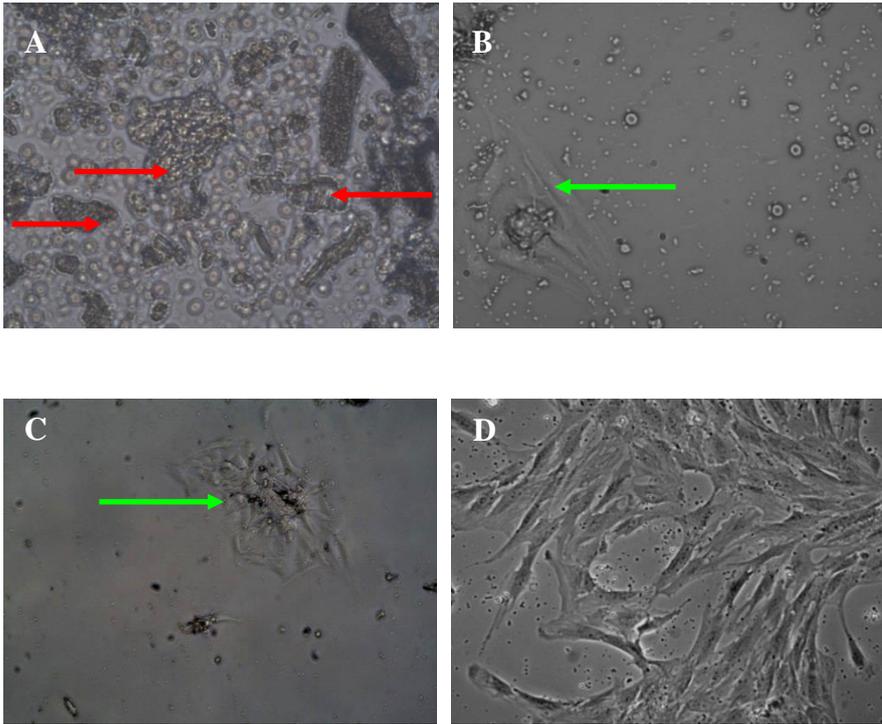


Figura 6.5. Imágenes de microscopio óptico de la obtención de CMPD realizando la digestión con 1 mg/ml de colagenasa durante 13 horas. **A:** Imagen a 400x aumentos de la pulpa después de la digestión. **B:** Imagen a 400x aumentos de CMPD a las 24 horas tras el aislamiento. **C:** Imagen a 200x aumentos de CMPD a las 48 horas tras el aislamiento. **D:** Imagen a 400x aumento a los 17 días de cultivo.

Con este método se obtuvieron CMPD y, aunque el tiempo de aislamiento aumenta considerablemente, se consiguió acortar mucho el tiempo de obtención. Mientras que con los otros 2 métodos descritos anteriormente se obtuvieron las células a los 7 días, con este se redujo el tiempo de obtención a 24 horas.

6.2.4 Método E: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (2mg/ml)/dispasa (4mg/ml)

La dispasa es una metaloproteinasa neutra derivada del *Bacillus polymyxa* que requiere Ca^{2+} para su actividad. Esta enzima digiere la fibronectina y el colágeno IV que son componentes de la lámina densa y las fibrillas de anclaje de la membrana basal, degrada en menor extensión, pero no el colágeno I, no parte el colágeno V o la laminina.

Trece pulpas de 11 pacientes de 17 a 38 años fueron cultivadas con este método de obtención. Se observó crecimiento en 10 casos entre el segundo y el séptimo día, con lo que el porcentaje de obtención de CMPD fue del 76 % (**Tabla 6.5**).

Resultados

Sexo (de las pulpas)	Edad (años)	Tiempo aislamiento días		Porcentaje de obtención
6 hombres	17 a 38	No crecimiento	3 pulpas	76 %
		2 días	6 pulpas	
3 días		1 pulpa		
5 días		1 pulpa		
6 días		1 pulpa		
7 días		1 pulpa		
7 mujeres				

Tabla 6.5. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (2mg/ml)/dispasa (4mg/ml).

En la **Figura 6.6** se observa un cultivo de CMPD a los 4 días tras el aislamiento.

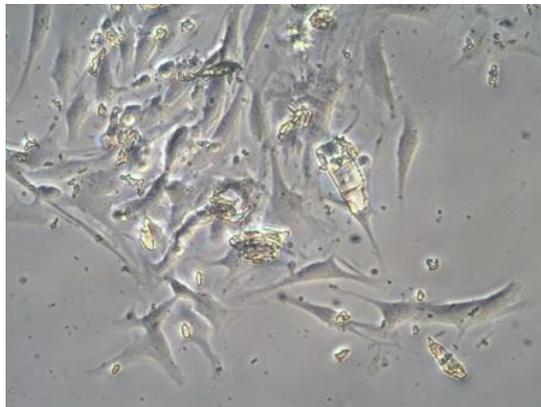


Figura 6.6. Imagen a los 4 días de cultivo de CMPD realizando la digestión con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (2mg/ml)/dispasa (4mg/ml). Imagen mediante microscopio óptico a 200x aumentos.

Así pues, añadiendo dispasa al método anterior se acorta mucho el tiempo de obtención de las células. Aun así el rango es bastante amplio (2 a 7 días), lo que hace que no se puedan extraer conclusiones definitivas.

6.2.5 Método F: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml) y sonicación

En este método, tras la digestión de la pulpa, se sonicó el cultivo para observar si la agitación mecánica acelera el proceso de obtención de CMPD.

Se cultivaron 24 pulpas de 18 pacientes de 17 a 48 años, y se observó crecimiento de CMPD en todos los casos entre las 13 horas y el séptimo día. El porcentaje de obtención de CMPD fue del 100% (**Tabla 6.6**).

Resultados

Sexo (de las pulpas)	Edad (años)	Tiempo aislamiento		Porcentaje de obtención
7 hombres	17 a 48	13 h.	3 pulpas	100 %
		17 h.	2 pulpas	
		20 h.	1 pulpa	
		24 h.	3 pulpas	
		36 h.	2 pulpas	
17 mujeres		2 días	6 pulpas	
		3 días	3 pulpas	
		4 días	2 pulpas	
		5 días	1 pulpa	
		7 días	1 pulpa	

Tabla 6.6. Datos descriptivos de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml) y sonicación.

La **Figura 6.7** muestra una célula adherida a la placa (flecha verde). La imagen corresponde a las 13 horas de aislamiento.

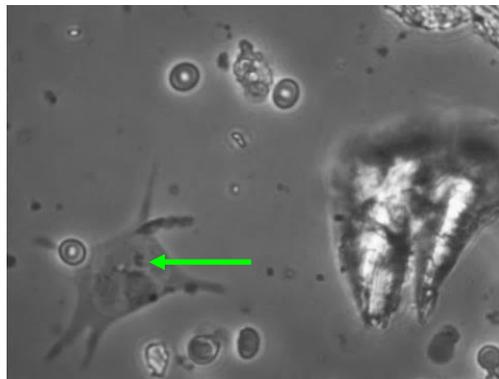


Figura 6.7. Imagen a las 13 horas tras el aislamiento al microscopio óptico a 400x aumentos de CMPD correspondiente a una mujer de 37 años. La digestión se realizó con 2mg/ml de EDTA y colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml) y sonicación.

Con este método en el cual se sonica, se acorta mucho el tiempo de obtención comparado con el *método D*, en el cual se realiza el mismo tipo de digestión pero sin sonicar. Con una muestra relativamente amplia (24 pulpas), se demuestra que el rango de tiempo sigue siendo amplio (13 horas a 7 días).

6.2.6 Método G: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA, colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml), 13ng/ml de termolisina y sonicación

Para observar si se acorta más el tiempo de aislamiento, se realizó la digestión con todos los reactivos de los métodos anteriores y se añadió termolisina. Este reactivo es una metaloproteína extracelular, de peso molecular 34600 Da, aislada de la bacteria gram-positiva *Bacillus thermoproteolyticus*. Contiene un ion de zinc esencial para la actividad catalítica y cuatro iones de calcio necesario para la estabilidad térmica. No existen estudios en los que se utilice la termolisina para aislar CMPD.

Se cultivaron, con este método, 16 pulpas de 15 pacientes de edades comprendidas entre 19 y 67 años. El porcentaje de obtención de CMPD fue del 100 %. La **Tabla 6.7** recoge la información referente a este método.

Resultados

Sexo (de las pulpas)	Edad (años)	Tiempo aislamiento		Porcentaje de obtención
5 hombres	19 a 67	8 h.	2 pulpas	100 %
		10 h.	4 pulpas	
		11 h.	1 pulpa	
		12 h.	1 pulpa	
11 mujeres		14 h.	3 pulpas	
		15 h.	3 pulpas	
		17 h.	1 pulpa	
		23 h.	1 pulpa	

Tabla 6.7. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 2 mg/ml de EDTA, colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml), 13ng/ml de termolisina y sonicación.

Se observó crecimiento de CMPD entre las 8 y las 23 horas **(Figura 6.8)**.

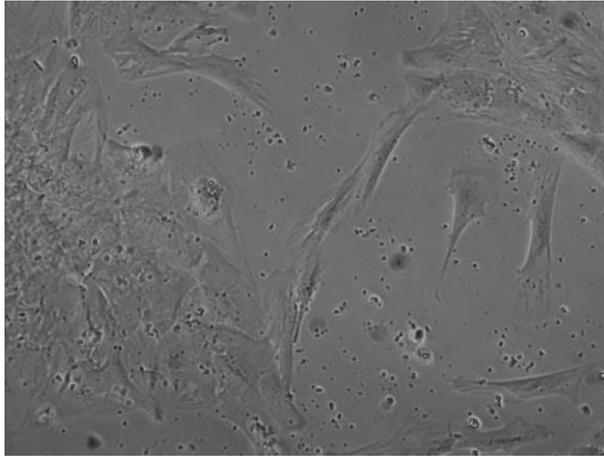


Figura 6.8. Imagen al microscopio óptico de un cultivo donde se realizó la digestión de la pulpa de un hombre de 30 años con 2 mg/ml de EDTA, colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml), 13ng/ml de termolisina y sonicación. Imagen a las 40 horas desde el aislamiento.

Este método demostró, con una muestra amplia, el menor tiempo de obtención de CMPD. Además, el rango, aunque también fue amplio (8 a 23 horas), fue menor que con otros métodos.

6.2.7 Método H: Obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa con 13ng/ml de termolisina

Se realizó este método para observar la capacidad de la termolisina por sí sola (agente no descrito en la literatura para obtener CMPD) para digerir la pulpa dental y obtener así células madre de este tejido.

Resultados

Tres pulpas, correspondientes a un hombre de 22 años y 2 mujeres de 19 y 24, se cultivaron y se observaron CMPD en 1 caso a las 20 horas. El porcentaje de obtención de CMPD fue del 33% (**Tabla 6.8**).

Sexo (de pulpas)	Edad (años)	Tiempo aislamiento		Porcentaje de obtención
1 hombre	19 a 24	No crecimiento	2 pulpas	33 %
2 mujeres		20 horas	Una pulpa	

Tabla 6.8. Datos descriptivos (sexo, edad, tiempo de aislamiento y porcentaje de obtención de CMPD) de los pacientes y las pulpas a las cuales se realizó digestión con 13ng/ml de termolisina.

En la **Figura 6.9** se observa un cultivo donde se observaron CMPD adheridas a los 4 días. La imagen corresponde al 6° día de aislamiento.

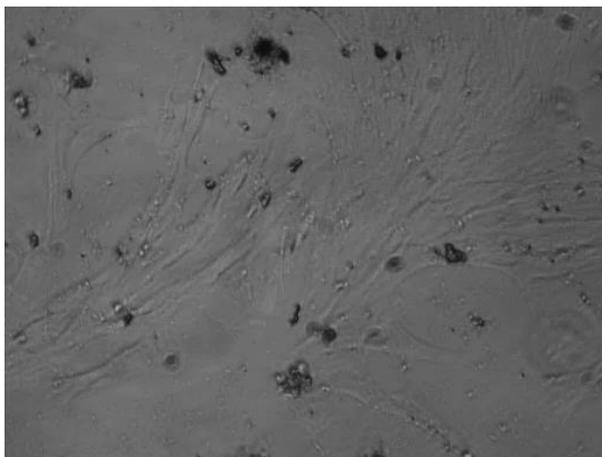


Figura 6.9. Imagen al sexto día de cultivo de CMPD correspondientes a una mujer de 19 años, aisladas con el presente método (digestión con 13ng/ml de termolisina).

Por tanto, el *método H*, en el cual se utiliza únicamente la termolisina como agente digestivo, demostró la capacidad de aislar CMPD. Este agente por sí solo no es capaz de mejorar el tiempo de obtención de CMPD comparado con los métodos donde se combinan distintos agentes.

6.2.8 **Método I: Obtención de CMPD realizando fragmentación mecánica**

Se realizó este método para observar si se podían aislar CMPD sin realizar la digestión enzimática o disgregación de la pulpa. Se cultivaron 6 pulpas (de 2 hombres y 4 mujeres de entre 12 y 36 años) realizando la fragmentación mecánica de éstas. Los cultivos se

Resultados

revisaron cada 3 días durante 3 semanas. En ningún caso se observó crecimiento de células madre.

Con lo cual, la disgregación mecánica sin más, no es suficiente para obtener CMPD.

Los resultados del presente objetivo confirmaron que el tiempo de aislamiento de CMPD difiere en función del tipo de tratamiento al que se someta el tejido pulpar. No se encontraron, al microscopio óptico, diferencias morfológicas en función de los distintos métodos de obtención utilizados.

Se describe a continuación, el número de pulpas cultivadas, tiempo de acción del agente disgregante/digestivo, el tiempo requerido para la obtención y el porcentaje de obtención de CMPD con cada método (**Tabla 6.9**).

Método	Nº de pulpas	Tiempo de digestión de la pulpa (minutos)	Tiempo de obtención de CMPD	Porcentaje de obtención de CMPD
A	34	90	7-14 días	76%
B	4	30	7 días	50%
C	7	100	5-7 días	100%
D	13	780	1-10 días	84%
E	13	100	2-7 días	76%
F	24	50	0,5 días (13h) - 7 días	100%
G	16	50	0,3-0,9 días (8-23h)	100%
H	3	40	0,8 días (20h)	33%
I	6	-	-	0%

Tabla 6.9. Método utilizado, número de pulpas, tiempo de digestión y obtención y porcentaje de obtención de todas las pulpas cultivadas en los objetivos 1 (**Método A**) y 2 (**Métodos B-I**). **Método A:** 2mg/ml colagenasa tipo I, 90 min. **Método B:** 2mg/mL EDTA, 30 min. **Método C:** 2mg/ml EDTA, 10 min + 2mg/ml colagenasa tipo I, 90 min. **Método D:** 1mg/ml colagenasa tipo I, 13 horas. **Método E:** 2mg/ml EDTA 10 min + 2mg/ml colagenasa tipo I + 4mg/ml dispasa tipo II, 90 min. **Método F:** 2mg/ml EDTA, 10 min + 4mg/ml colagenasa tipo I + 4mg/ml dispasa tipo II, 40 min + sonicar, 1 min. **Método G:** 2mg/ml EDTA, 10 min + 4mg/ml colagenasa tipo I + 4mg/ml dispasa tipo II + 13ng/mL termolisina 40 min + sonicar, 1min. **Método H:** Termolisina 13ng/ml 40 min.

6.3 Caracterización de CMPD

Una vez aisladas las células de la pulpa dental debemos de asegurarnos que efectivamente corresponden a CMM. Por ello, se realizó la caracterización de CMPD correspondientes a 2 cultivos de 2 pulpas distintas escogidas de forma aleatoria. Para dicha caracterización se utilizaron marcadores de proteínas de membrana. Además es importante determinar la presencia de varios marcadores positivos y alguno negativo con el fin de asegurarnos que realmente corresponde a CMM.

A continuación se describen los resultados obtenidos de los marcadores CD-133 (proteína glicosilada que se ha detectado en células repobladoras, progenitoras inmaduras y progenitoras de monocitos/granulocitos), Oct4 (marcador de células madre embrionarias), Nestin (proteína de función desconocida que se expresa en CM neuroectodérmicas), Stro-1 (marcador de célula madre de estroma, que reconoce el antígeno de células perivasculares, y que en la médula ósea contiene precursores osteogénicos), CD34 (marcador de célula madre pluripotente tanto de estroma como hematopoyético) y CD45 (marcador de células hematopoyéticas). Cada marcador se utilizó para caracterizar 2 pulpas distintas. Las células de la pulpa 1 se obtuvieron realizando la digestión con 2mg/ml de colagenasa durante 90 minutos (*Método A*) y la pulpa 2 con 1mg/ml de colagenasa durante 13 horas (*Método C*).

6.3.1 Caracterización mediante marcador de superficie CD-133

Las células de ambas pulpas fueron positivas para el marcador CD-133 tal y como se observa en la **Figura 6.11 A y B**.

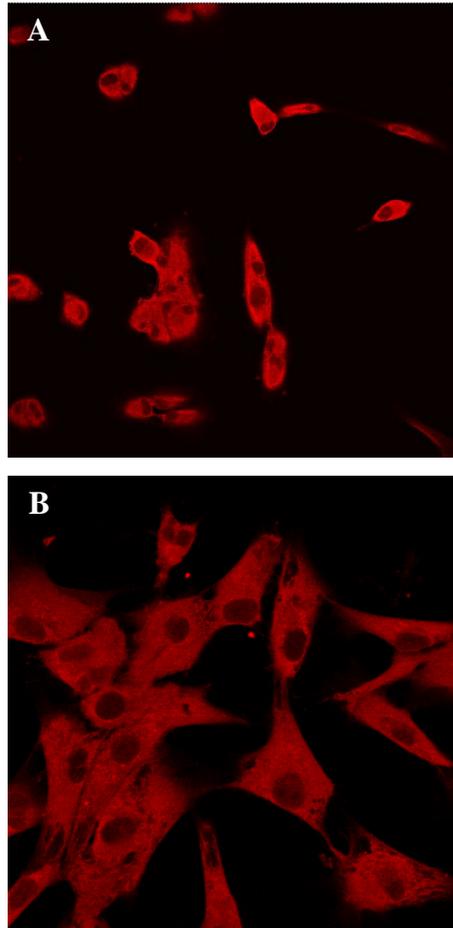


Figura 6.10. Imagen de microscopía confocal mediante láser de argón y otro de neón-helio con una longitud de onda de 543 nm de excitación y 555-621 nm de emisión (color rojo). Imágenes **A**: 400x aumentos y **B**: 600x aumentos del marcador positivo CD-133.

Resultados

6.3.2 Caracterización mediante marcador de superficie Oct4

Utilizando el marcador Oct4, las células obtenidas de las 2 pulpas fueron positivas como se observa en la **Figura 6.12 A y B**.

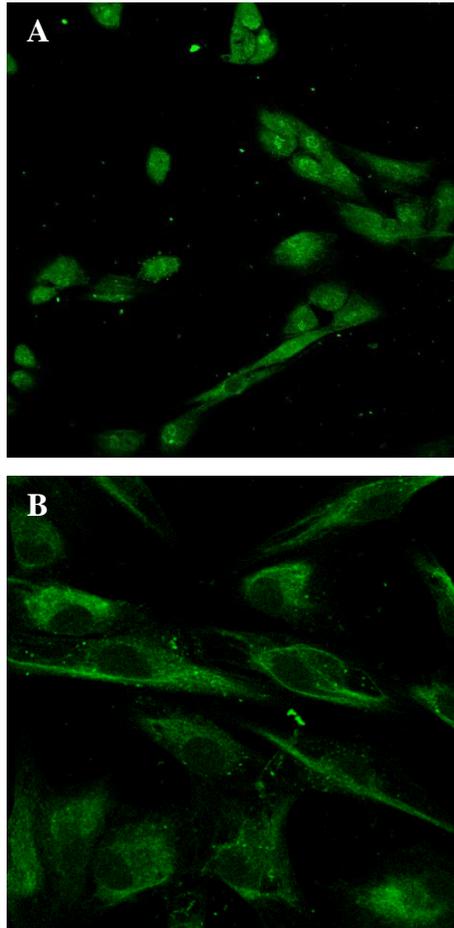


Figura 6.11. Imagen de microscopía confocal mediante láser de argón y otro de neón-helio con una longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión (color verde). Imágenes **A:** 400x aumentos y **B:** 600x aumentos del marcador positivo Oct4.

6.3.3 Caracterización mediante marcador de superficie Nestin

Los resultados de la caracterización con el marcador Nestin fueron positivos (**Figura 6.13 A y B**).

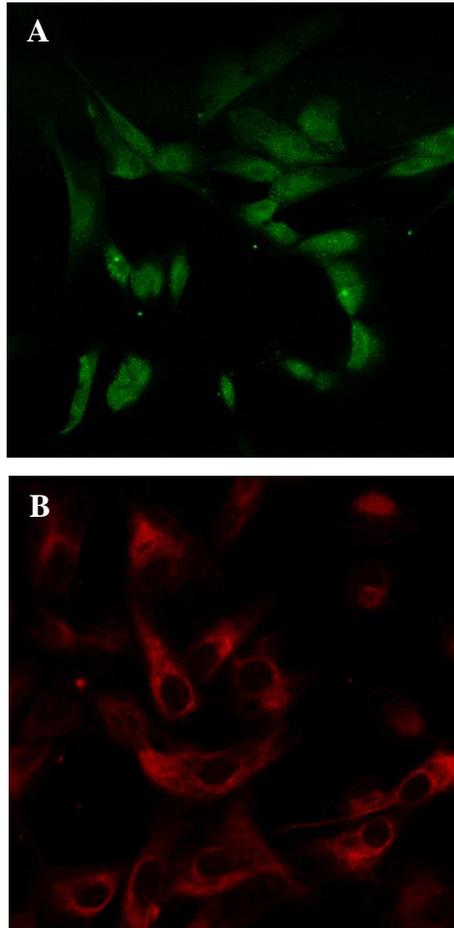


Figura 6.12. Imagen de microscopía confocal con láser argón y otro de neón-helio (longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión color verde); (longitud de onda de 543 nm de excitación y 555-621 nm de emisión: color rojo). Imágenes **A**: 400x aumentos y **B**: 600x aumentos para el marcador positivo Nestin.

Resultados

6.3.4 Caracterización mediante marcador de superficie Stro-1

Las células de ambas pulpas también fueron positivas para el marcador Stro-1 tal y como se observa en la **Figura 6.14 A y B**.

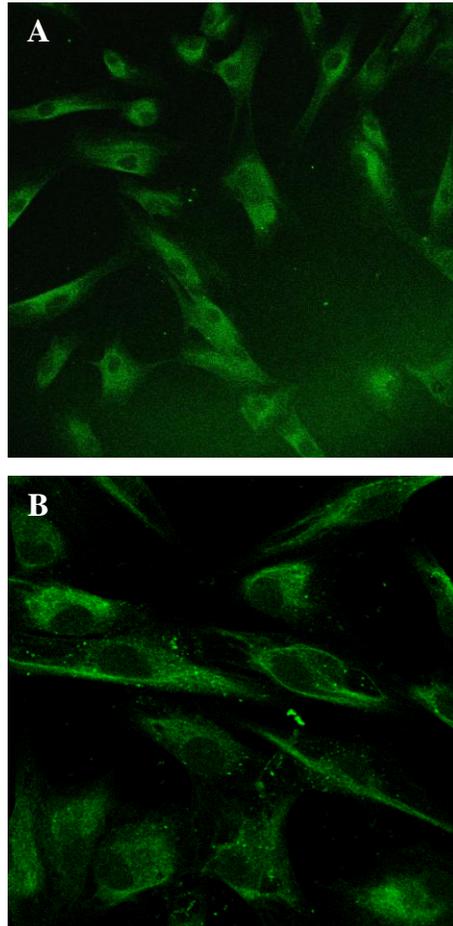


Figura 6.13. Imagen de microscopía confocal mediante láser de argón y otro de neón-helio con una longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión (color verde). Imágenes **A**: 400x aumentos y **B**: 600x aumentos del marcador positivo Stro-1.

6.3.5 Caracterización mediante marcador de superficie CD-34

Las células de la pulpa 1 fueron positivas, tal y como muestra la **Figura 6.15**, para el marcador CD-34, que es un marcador de célula madre pluripotente tanto de estroma como hematopoyético. En cambio las células de la pulpa 2 fueron negativas para este marcador.

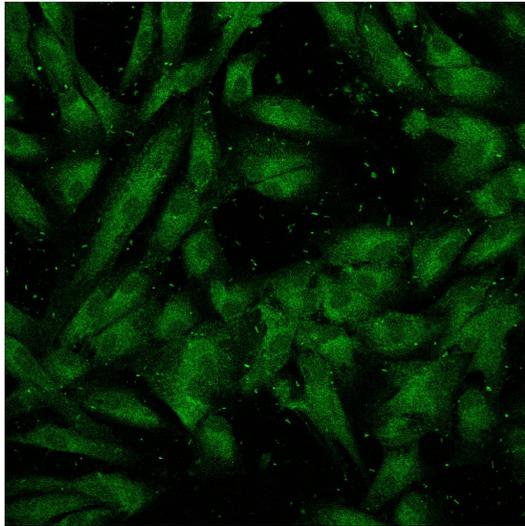


Figura 6.14. Imagen de microscopía confocal mediante láser de argón y otro de neón-helio con una longitud de onda 488 nm de excitación y de 510-585 nm de emisión (color verde). Imagen a 400x aumentos.

6.3.6 Caracterización mediante marcador de superficie CD-45

Las células de ambas pulpas fueron negativas para el marcador CD-45, que es un marcador de células madre hematopoyéticas.

Los resultados de la caracterización confirmaron que las células obtenidas de la pulpa dental correspondían a CMM. Estas células fueron positivas para marcadores de células madre adultas (CD-133, Nestin, Stro-1) y embrionarias (Oct4). Al ser células mesenquimales, fueron negativas para células madre hematopoyéticas (CD-45). Una línea fue positiva para CD-34 y la otra negativa.

6.4 Cultivo de CMPD a distintas presiones de oxígeno

Mediante las distintas metodologías utilizadas en el segundo objetivo (optimización del método de obtención de CMPD), se consiguió acortar el tiempo de aislamiento y obtención de estas células. Cultivando las CMPD a distintas concentraciones de O₂, se pretendió mejorar el rendimiento del crecimiento.

Se realizaron cultivos en unas condiciones de 3% y de 21% de O₂ y se cuantificó el número de células a las 6 horas, un, 2, 3, 5, 7 y 8 días. Se observó una mayor proliferación celular cultivando las células al 3% que al 21% de O₂ en todos los momentos en los que se realizó el

cómputo. En la **Figura 6.10** se observa la cantidad de células contadas en cada tiempo de cultivo. El número de células es la media de 4 cultivos distintos. Se observa cómo al 3% de O₂, hay mayor proliferación celular en todos los tiempos, y que los cultivos proliferan hasta el 5° día, saturándose en ese momento. En los cultivos al 3% de O₂, el cómputo celular a los 2 días fue alrededor de $0,5 \cdot 10^6$ células, a los 3 días, alrededor de $1 \cdot 10^6$ células y a los 5 días de cerca de $2 \cdot 10^6$ células. En todos los momentos descritos, el número de células de los cultivos al 21% de O₂ fue inferior. Las diferencias fueron estadísticamente significativas.

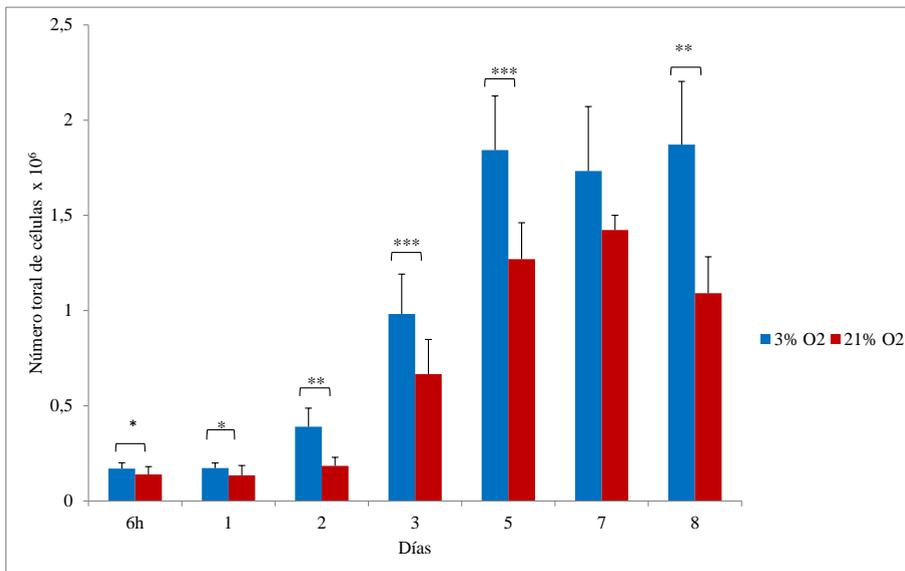


Figura 6.15. Se observa el número de células contadas en cada tiempo de cultivo. El número de células para cada momento es la media de 4 cultivos distintos. El eje vertical indica el número de células y el eje horizontal el tiempo. Los valores de los resultados de la curva de CMPD al 3 y al 21% de O₂ están representados como la media \pm SEM. La significancia estadística se expresa como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

6.5 Adhesión y crecimiento de CMPD sobre β -fosfato tricálcico

Para el uso clínico de células madre, y concretamente en el campo de la regeneración ósea, estas células han de ser aplicadas mediante matrices, y no de forma aislada. Por ello se estudió la interacción de estas células con el biomaterial de regeneración ósea β -fosfato tricálcico.

6.5.1 Adhesión de CMPD sobre β -fosfato tricálcico

La adhesión de las células al β -fosfato tricálcico se determinó mediante microscopía óptica. En la **Figura 6.16 a-d** se puede observar, la adhesión y crecimiento de las CMPD sobre β -fosfato tricálcico en los correspondientes días:

- Día 7: Se observa el biomaterial en color oscuro (flecha roja) y CMPD adheridas a éste (flecha verde) (**Figura 6.16a**).
- Día 13: La imagen es similar a la primera. Siguen observándose células adheridas al biomaterial (**Figura 6.16b**).
- Día 18: Existe un gran incremento de CMPD desde el día 13. Las CMPD (flecha verde) ocupan todos los huecos formados entre las partículas de biomaterial (flecha roja) (**Figura 6.16c**).
- Día 23: Las células siguen ocupando los espacios formados entre las distintas partículas de β -fosfato tricálcico (**Figura 6.16d**).

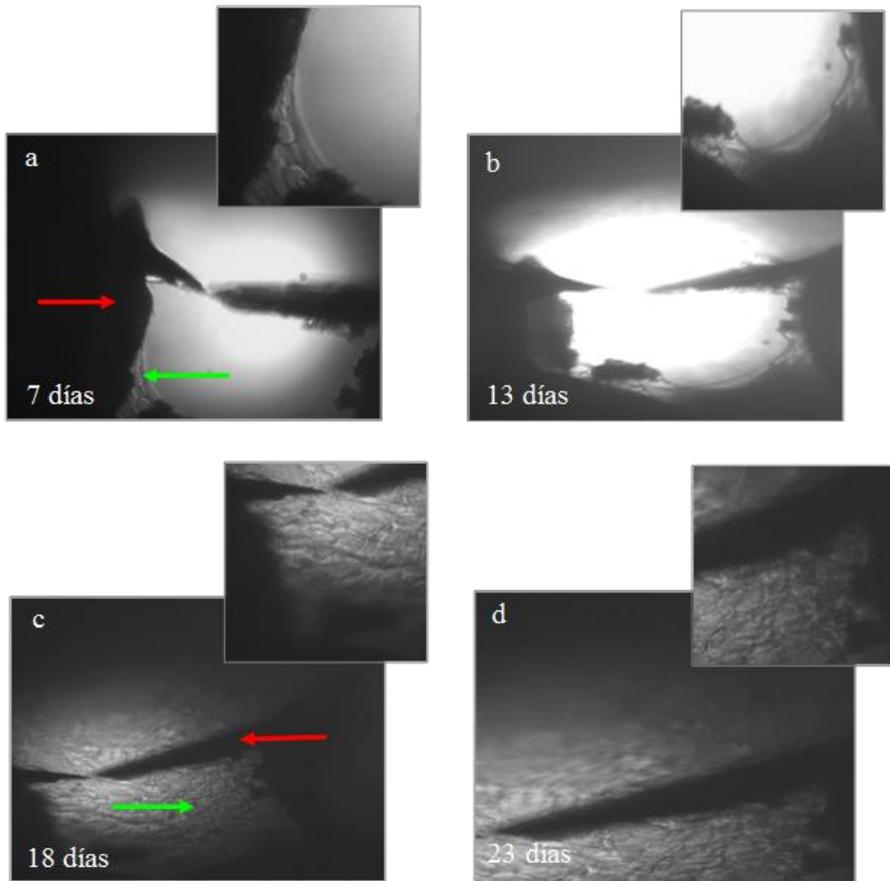


Figura 6.16. Imágenes con microscopía óptica a distintos aumentos (40-400x) de CMPD (flecha verde) adheridas a β -fosfato tricálcico (flecha roja). **A:** A los 7. **B:** 13. **C:** 18 y **D:** 23 días de cultivo.

6.5.2 Crecimiento de CMPD sobre β -fosfato tricálcico

El número de CMPD se determinó realizando la correspondencia con la cantidad de DNA desde el séptimo hasta el vigesimotercer día. En primer lugar se realizó una correspondencia entre un número concreto de células y la cantidad de DNA en esas

Resultados

células. De esta manera se pudo saber cuántas células había en relación a la cantidad de DNA extraído a dichas células. Se observaron los siguientes resultados: con 250000, 500000, un millón y 2 millones de células, se observó una concentración de DNA de 12.8, 18.8, 30 y 64.7 respectivamente (datos expresados en ng/ μ L). Estos datos vienen reflejados en la **Figura 6.17**.

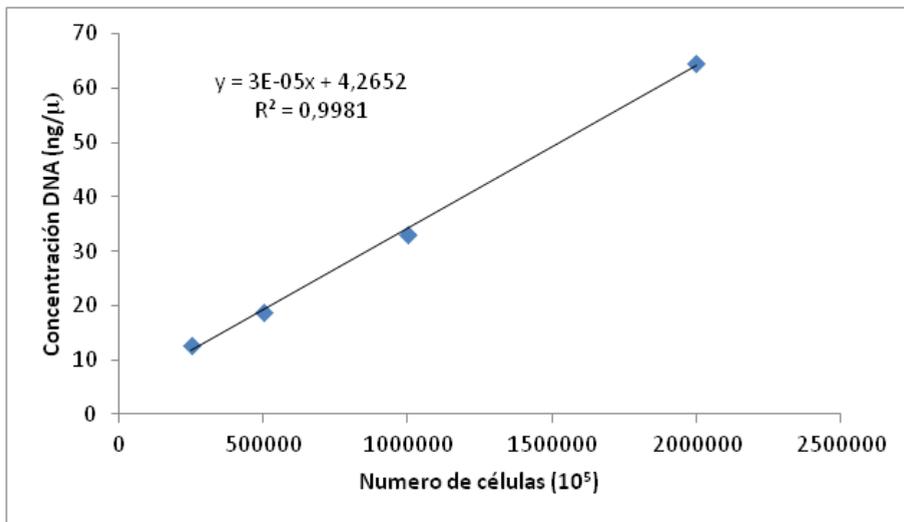


Figura 6.17. Relación entre el número de células y la concentración de DNA.

Una vez realizada la curva patrón, se midió la cantidad de DNA sobre el biomaterial a los 7, 13, 18 y 23 días respectivamente. Se realizó posteriormente la correspondencia entre la cantidad de DNA medida y el número de células. Los resultados fueron: 24500, 411000, 1,42 millones y 12,4 millones de células en cada uno de los citados días respectivamente. En la **Figura 6.18** se observa la correspondencia

entre la concentración de DNA (en $\text{ng}/\mu\text{L}$) y el número de células desde el inicio del cultivo hasta los 23 días.

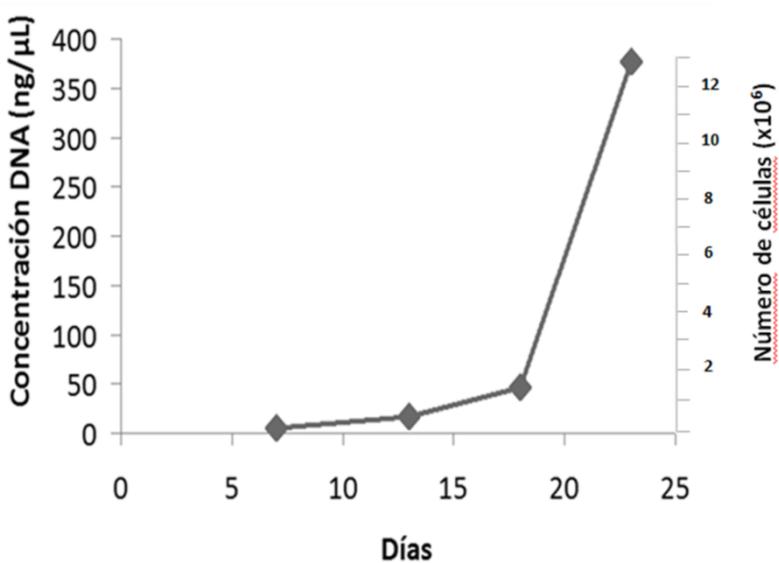


Figura 6.18. Gráfica donde se observa la correspondencia entre la concentración de DNA (en $\text{ng}/\mu\text{L}$) y el número de células. Las mediciones de DNA se realizaron los días 7, 13, 18 y 23. Se observó un incremento en la cantidad de células a lo largo del intervalo de tiempo.

Por lo tanto podemos decir que las CMPD se adhieren al biomaterial y son capaces de crecer sobre el mismo.

7 DISCUSIÓN

7.1 Obtención de CMPD

7.1.1 Extracción de pulpa dental

En la mayoría de los estudios encontrados en la literatura (Zhang W y cols. 2008), (Gandia C y cols. 2008), (Graziano A y cols. 2008) se obtuvieron pulpas de dientes extraídos, los cuales fueron seccionados para acceder a la cavidad pulpar; normalmente estos dientes fueron terceros molares. Huang y cols. (Huang AH y cols. 2008) cultivaron y caracterizaron CMPD de un mesiodens. En un estudio reciente (Huang AH y cols. 2009) se obtuvo la pulpa dental mediante una lima de endodoncia a un diente no extraído que requería tratamiento de conductos y cuya pulpa no presentaba inflamación o infección. Pereira y cols. (Pereira LO y cols. 2012) compararon las células madre de pulpas normales y de pulpas que presentaban inflamación. No encontraron diferencias morfológicas ni de proliferación de las células de ambos tipos de pulpas antes y después de la separación de las células STRO-1 positivas. Los autores concluyeron que el proceso inflamatorio no afectó a las propiedades de las células madre. En la presente tesis se obtuvieron las pulpas de dientes sin signos de inflamación y/o infección, extraídos y seccionados para la obtención del tejido pulpar.

Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008) lavaron los dientes con PBS estéril, a continuación lo sumergieron en una solución de

Discusión

povidoneiodina al 1% durante 2 minutos y en tampón fosfato al 1% durante 1 minuto más para finalizar. En la presente tesis, el diente se sumergió en medio de cultivo tras la exodoncia. De todas las muestras cultivadas, se produjo contaminación bacteriana en un cultivo y ninguna contaminación fúngica, mientras que en el estudio de Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008) se contaminaron por hongos 7 de 40 cultivos. Según estos datos, la contaminación del cultivo no está relacionada con el lavado del diente extraído.

7.1.2 Almacenamiento y transporte

Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008) estudiaron el crecimiento en función del tiempo entre la exodoncia y el cultivo en 54 pulpas. Según este estudio, se pueden obtener CMPD hasta 120 horas tras la exodoncia. Observaron menor crecimiento de células tras 72 horas entre exodoncia y cultivo. También estudiaron el crecimiento en función de la solución en la cual se transportó el diente al laboratorio. Observaron mayor crecimiento celular cuando el diente fue transportado con suero bovino fetal (Sigma Chemical, St. Louis, MO), en los casos en que el cultivo se realizó a la hora o 120 horas tras la exodoncia. Cuando el cultivo se realizó a las 24, 48 ó 72 horas el mayor crecimiento celular se observó cuando los dientes se transportaron en HypoThermosol (HTS; BioLife Solutions, Bothell, WA). En todos los casos se observó menor crecimiento celular al transportar los dientes con medio de cultivo Mesen Cult® (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). La muestra siempre la

transportaron en hielo. En el presente estudio hubo un intervalo de tiempo entre 1 hora y 4 días entre la exodoncia y el aislamiento. Durante este tiempo el diente se conservó a 4°C en medio de cultivo. Aunque este dato no se registró específicamente en cada una de las muestras, se obtuvieron CMPD realizando la digestión hasta 4 días después de la extracción del diente. Respecto a la solución en la cual se transportó la pulpa, siempre fue medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle® con suplemento bajo de glucosa (1mg/ml), antibióticos (penicilina y estreptomina), y a temperatura ambiente.

7.1.3 Aislamiento y cultivo de CMPD

Gronthos y cols. (Gronthos S y cols. 2000) fueron, en el año 2000, los primeros en aislar CMM de pulpa dental en humanos. Para aislar las células, realizaron la digestión de la pulpa con una solución de 3 mg/ml colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa durante 90 minutos a 37°C. Muchos autores (Takeda T y cols. 2008), (Liu H y cols. 2005), (Graziano A y cols. 2008), (Papaccio G y cols. 2006; Sonoyama W y cols. 2008), (Scheller EL y cols. 2008), (Lindroos B y cols. 2008) utilizaron este protocolo para aislar CMPD. Otros autores (Huang AH y cols. 2008), (Huang AH y cols. 2009), (Koyama N y cols. 2009) también utilizaron estos reactivos pero reduciendo el tiempo de digestión a una hora. Waddington y cols. (Waddington RJ y cols. 2009) utilizaron 4 mg/ml de colagenasa/dispasa durante 1 hora. Otro método de aislamiento válido, es aislar la pulpa realizando la digestión con colagenasa tipo I y tipo II y con termolisina proteasa durante 40

Discusión

minutos a 37 C° (Perry BC y cols. 2008). Zang y cols. (Zhang W y cols. 2008) efectuaron la digestión con 3 mg/ml de colagenasa tipo I. Sasaki y cols. (Sasaki R y cols. 2008) cultivaron CMPD de ratas, realizando la digestión con tripsina/EDTA al 0.25 % durante 15 minutos.

Uno de los protocolos realizados en el presente estudio fue digerir la pulpa con 2 mg/ml de colagenasa tipo I durante 90 minutos a 37°C, método utilizado previamente en otros estudios (Gandia C y cols. 2008). También hemos conseguido cultivar CMPD realizando la disgregación de la pulpa con EDTA, metodología que no está descrita en la literatura, o con 1mg/ml de colagenasa durante 13 horas, metodología ya descrita para el aislamiento de células de córnea (Li W y cols. 2007). Los mejores resultados fueron obtenidos al realizar la digestión de la pulpa con 2 mg/ml de EDTA, colagenasa (4mg/ml)/dispasa (4mg/ml), 13ng/ml de termolisina y sonicación, ya que se empezaron a observar las primeras CMPD a las 8 horas del cultivo. Sin embargo, al realizar la disgregación mecánica de la pulpa, no conseguimos cultivar CMPD. Este resultado contrasta con los de otros estudios (Pierdomenico L y cols. 2005), (Karamzadeh R y cols. 2012) donde obtuvieron CMPD fragmentando la pulpa sin ningún tipo de digestión. Karamzadeh y cols. (Karamzadeh R y cols. 2012) estudiaron la obtención de CMPD realizando la digestión de la pulpa o mediante fragmentación mecánica. Obtuvieron células mediante las 2 metodologías; realizando la digestión, aislaron las CMPD a los 3-5 días y fragmentando al 5° día. Las células fueron iguales

morfológicamente con ambos métodos concluyendo los autores que el protocolo utilizado para aislar las células no afecta al tipo celular.

Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008) cultivaron 40 pulpas realizando la digestión con colagenasa tipo I y tipo II y con termolisina proteasa durante 40 minutos a 37 C°. De éstas, observaron crecimiento en 31, contaminación por hongos en 7 y no observaron crecimiento en 2 casos. En esta tesis, se cultivaron 23 pulpas realizando la digestión con 2 mg/ml de colagenasa tipo I durante 90 minutos. Se observó crecimiento de CMPD en 20 casos, en 2 casos no se observó crecimiento, y en 1 caso se observó contaminación bacteriana. No hubo contaminación por hongos en ningún caso, y al contrario que en estudio de Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008) el medio que se utilizó en nuestro trabajo no contenía antifúngicos. Según estos datos, la presencia o ausencia de antifúngicos en el medio de cultivo, no influye en la contaminación de éste. Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008) atribuyen la contaminación fúngica más a causas endógenas del huésped que a una contaminación postexodoncia.

Recientemente, Kanafi y cols. (Kanafi MM y cols. 2013) compararon la proliferación de CMPD utilizando 3 medios de cultivo distintos. Observaron mayor proliferación al cultivar las células con Dulbecco's modified Eagle's médium que con α -MEM o DMEM/F12. Los autores opinan que hay que mejorar las condiciones de cultivo de las CMPD y establecer protocolos para aplicar clínicamente las técnicas que mediante ingeniería tisular se han descrito durante los últimos años. En un estudio reciente se comparó la proliferación de

Discusión

CMPD utilizando 4 tipos distintos de medio de cultivo sin suero. Las células proliferaron más en DMEM con 1% de insulina, transferrina, selenio y 100 mg/mL de factor embriotrófico. Suchanek y cols. (Suchanek J y cols. 2009) cultivaron CMPD en medio de cultivo con 2 ó 10% de suero bovino fetal o con 2% de suero bovino fetal con ITS (medio de suplementos con insulina, transferrina y selenio) Observaron que al añadir ITS en el medio de cultivo, la proliferación celular aumentaba claramente. Además observaron que el diámetro de las células no se alteró en función del medio de cultivo utilizado. Ferro y cols. (Ferro F y cols. 2012) cultivaron CMPD con 1,25% de suero humano en vez de 10% de suero bovino fetal (que es lo que clásicamente se utiliza). Se encontró alta uniformidad y proliferación en el cultivo y propiedades celulares similares (en cuanto a caracterización y diferenciación) a las células cultivadas con 10% de suero bovino fetal. En esta tesis se utilizó siempre el mismo medio de cultivo, Dulbecco's modified Eagle® (DMEM), con suplemento de glucosa (1mg/mL) y suero bovino fetal.

7.1.4 Criopreservación

Aunque no fue uno de los objetivos de esta tesis, se criopreservaron distintos cultivos con el fin de tener CMPD disponibles para realizar distintos experimentos. No se recogieron los datos con protocolos establecidos, pero dado el interés de la literatura científica en este campo, se realizan a continuación algunos comentarios al respecto. Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008)

cultivaron CMPD de 31 casos después de criopreservar las pulpas. Observaron crecimiento en todos los casos. En cambio, al criopreservar los dientes y extraer las pulpas después de descongelarlos, observaron crecimiento de CMPD en 7 de 10 pulpas. No encontraron diferencias en el crecimiento del cultivo, caracterización y diferenciación de CMPD antes y después de criopreservarlas. Papaccio y cols. (Papaccio G y cols. 2006) observaron que las CMPD, las cuales habían sido criopreservadas durante 2 años, eran capaces de diferenciarse hacia osteoblastos sin alteraciones morfológicas, y además expresaban sus respectivos antígenos de superficie. En otro estudio, otros autores (Zhang W y cols. 2006) observaron que CMPD expresan Stro-1 después de ser criopreservadas. Los autores no especifican el tiempo de criopreservación. Lee y cols. (Lee SY y cols. 2010) compararon la viabilidad, morfología y expresión de marcadores de CMPD obtenidas de dientes congelados magnéticamente durante 7 días y de CMPD de dientes no congelados. El porcentaje de obtención de células fue del 73% en dientes congelados y del 100% en el grupo control. Ambos grupos fueron positivos para los marcadores CD-44 y Stro-1 y negativos para CD-34 y la morfología celular no varió entre grupos.

En esta tesis, se criopreservaron 19 cultivos de CMPD a los cuales se les había realizado al menos un pase. Al descongelar uno (mujer de 25 años), se observó que la viabilidad de las CMPD era elevada tras la criopreservación puesto que a la semana de descongelarlas y cultivarlas, la placa estaba subconfluyente. En cambio,

Discusión

en los casos en los cuales el intervalo de tiempo entre la criopreservación y el descongelamiento de las CMPD era superior a los 2 meses, no se encontraba viabilidad celular.

7.2 Optimización del método de obtención CMPD

Como se ha señalado antes, Gronthos y cols. (Gronthos S y cols. 2000) fueron los primeros en aislar CMPD realizando la digestión de la pulpa con una solución de 3 mg/ml colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa durante 90 minutos a 37°C. Existen estudios (Takeda T y cols. 2008), (Liu H y cols. 2005), (Graziano A y cols. 2008), (Papaccio G y cols. 2006), (Sonoyama W y cols. 2008), (Lindroos B y cols. 2008; Scheller EL y cols. 2008) en los cuales se ha utilizado esta metodología y otros (Waddington RJ y cols. 2009), (Perry BC y cols. 2008), (Zhang W y cols. 2008) donde se han utilizado otros reactivos.

Uno de los protocolos realizados en el presente estudio fue digerir la pulpa con 2 mg/ml colagenasa tipo I durante 90 minutos a 37°C, método utilizado previamente en otro estudio (Gandia C y cols. 2008). También se cultivó CMPD realizando la disgregación de la pulpa con agentes que no han sido utilizados según la literatura como EDTA o sonicando el cultivo tras su digestión. Se debe resaltar el hecho de haber aislado CMPD únicamente realizando la disgregación

de la pulpa con EDTA, que es un agente quelante del Ca que rompe los desmosomas que unen las células, y no un agente digestivo (como la colagenasa, dispasa, termolisina, etc.) que digiere la red de proteínas intercelulares. El EDTA se ha utilizado para aislar otras células como hepatocitos (Viña J. y cols. 1978), pero no hemos encontrado ningún estudio en la literatura en el que se aíslen CMPD únicamente con EDTA. Los estudios siempre usan agentes digestivos o fragmentación mecánica sin digestión ni disgregación.

Además, se observó que los mejores resultados se obtuvieron al combinar distintos agentes, tanto disgregantes (EDTA), digestivos (colagenasa, dispasa...), como mecánicos (sonicación). El tiempo mínimo para obtener CMPD fue utilizando 2mg/ml EDTA durante 10 minutos, 4mg/ml de colagenasa tipo I, 4mg/ml de dispasa tipo II durante 40 minutos y 13ng/ml de termolisina durante 40 minutos y sonicando un minuto. Con este método se observaron las primeras CMPD a las 8 horas. El tiempo de aislamiento de este método difiere mucho de los encontrados en la literatura. Al realizar la disgregación mecánica de la pulpa, no conseguimos cultivar CMPD. Este resultado contrasta con los de otro estudio, (Pierdomenico L y cols. 2005) en el cual observaron CMPD con este método.

No existen muchos estudios en la literatura que realicen series largas de cultivos de CMPD. En la mayoría de los trabajos no se detalla el tiempo de aislamiento de estas células, o el método de cultivo realizado. Sólo algunos trabajos como los de Laino y cols. (Laino G y cols. 2006) o Takeda y cols. (Takeda T y cols. 2008)

Discusión

detallan que obtienen CMPD a los 5 días de aislamiento utilizando el protocolo original descrito por Gronthos y cols. (Gronthos S y cols. 2000) (3 mg/ml colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa durante 60 minutos). Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008) obtuvieron CMPD a las 24 horas de aislamiento. La metodología utilizada por estos autores fue realizar la digestión de la pulpa con colagenasa tipo I y II y termolisina durante 40 minutos. Ellos cultivaron 40 pulpas. De éstas, observaron crecimiento en 31, contaminación por hongos en 7 y no observaron crecimiento en 2 casos. En la presente tesis, se obtuvo un porcentaje total de obtención del 80,8%. No hubo contaminación por hongos en ningún caso, y al contrario que en estudio de Perry y cols. (Perry BC y cols. 2008) el medio que se utilizó en nuestro estudio no contenía antifúngicos.

Asimismo tampoco se observaron diferencias importantes en la tasa de crecimiento de las células según la edad del paciente, no obstante es muy probable que las haya, pero las perdiéramos por los diferentes métodos de obtención empleados.

7.3 Crecimiento de CMPD a distintas concentraciones de O₂

Los resultados del segundo objetivo (optimización del método de obtención de CMPD) demostraron que es posible acortar el tiempo necesario para conseguir CMPD (tiempo necesario para que aparezcan

células adheridas a la placa a partir de un fragmento pulpar). Otro de los objetivos planteados fue evaluar el crecimiento de las CMPD a distintas concentraciones de O₂. El aire ambiental tiene una concentración de O₂ del 21%, en cambio, a nivel celular, la concentración de O₂ es del 3% (Chow DC y cols. 2001). Los cultivos celulares se han realizado clásicamente con concentraciones de O₂ ambientales. La hipótesis de este objetivo fue que las CMPD debían proliferar más a niveles tisulares de O₂ (3%) que a niveles ambientales (21%). De esta manera se intentó mejorar las condiciones de cultivo para incrementar la proliferación de las CMPD y así acortar el tiempo en el que se obtiene un gran número de células.

Existen muy pocos estudios publicados sobre la concentración ideal de O₂ para el cultivo de CMPD. Sakdee y cols. (Sakdee JB y cols. 2009) observaron que las células proliferaban más al 3% que al 20% y que el marcador CD133 (marcador de células madre hematopoyéticas, endoteliales y neuronales) decrecía al 3% de O₂ mientras que el Stro-1 aumentaba. Li y cols. (Li L y cols. 2011) evaluaron la viabilidad celular y la capacidad de las células pulpares de formar tejido mineralizado. Observaron mejores resultados al 5% que al 21%. Wang y cols. (Wang J y cols. 2010) compararon la proliferación celular utilizando 3 grupos: un grupo control con condiciones de 21% de O₂, y 2 grupos estudio, uno en el cual el cultivo permanecía 24 horas en condiciones de isquemia (2% de O₂) y otro que permanecía 48 horas en esas condiciones. Observaron, entre el quinto y séptimo día de cultivo, que las CMPD que habían

Discusión

permanecido en isquemia proliferaban menos que las del grupo control.

En el presente estudio se comparó la proliferación con condiciones tisulares de O₂ (3%) y presión ambiental (21% de O₂). Se observó mayor proliferación al 3% que al 21% de O₂ en los distintos tiempos en los cuales se realizaron las mediciones (6 horas, un, 2, 3, 5, 7 y 8 días). Además, las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los momentos medidos. Es decir, se demostró, en la misma línea que los estudios mencionados previamente, que la presión tisulares de O₂ mejora las condiciones de cultivo. Ello es importante si valoramos el posible uso de CMPD en las distintas aplicaciones clínicas, puesto para ello, se requiere un gran número de células en el menor tiempo posible.

7.4 Caracterización de CMPD

En el presente estudio se realizó la caracterización de 2 pulpas distintas. Los resultados fueron positivos para los marcadores de superficie CD-133, Oct4, Nestin, Stro-1. Una pulpa fue positiva para el marcador CD-34, que es un marcador de célula madre pluripotente tanto de estroma como hematopoyético; en cambio, la otra pulpa fue negativa para este mismo marcador. Para el antígeno CD-45, marcador de células madre hematopoyéticas, las células de ambas pulpas fueron negativas. Estos resultados concuerdan con los publicados en la literatura, ya que el marcador de superficie CD-45, al

ser un marcador de células hematopoyéticas, debe ser negativo para células madre de pulpa dental, que corresponde a células madre de origen mesenquimal. La literatura ha estudiado la caracterización de las CMPD con distintos marcadores como el CD44 (marcador mesodérmico y mesenquimal) (Pittenger MF y cols. 1999), anti-nestin (marcador ectodérmico) (Guerette D y cols. 2007), o anticytokerantin (marcador endodérmico) (Michel M y cols. 1996). Las CMPD de pulpa dental son positivas para estos marcadores (Hirata TM y cols. 2010). Además, debido a su origen embrionario son también positivas para el marcador de CD117 que interacciona con el factor de células madre y el precursor de cresta neural (Suchanek J y cols. 2009). Aunque las células madre de pulpa son multipotentes (células madre adultas), se ha demostrado que se les puede inducir pluripotencialidad (Hu B y cols. 2006). Las células madre embrionarias son pluripotentes, y es quizá por esto que obtuvimos resultados positivos para los marcadores de células madre pluripotentes como el Oct-4 y CD-34. Concretamente, para el marcador CD-34, obtuvimos resultados positivos para una pulpa y negativos en la otra. Este resultado se puede llegar a explicar estudiando la literatura científica, ya que para este marcador, existen publicados resultados tanto positivos (Laino G y cols. 2006) como negativos (Suchanek J y cols. 2009; Lee SY y cols. 2010).

7.5 Adhesión y crecimiento de CMPD a β -fosfato tricálcico.

El β -fosfato tricálcico es un biomaterial ampliamente utilizado para la regeneración ósea. La adhesión y el crecimiento de CMPD fue evaluada mediante microscopía óptica y cómputo de DNA. Existen distintos estudios donde se ha estudiado la interacción de CMM sobre distintos biomateriales. Utilizando CMM procedentes de pulpa dental sobre β -fosfato tricálcico únicamente hemos encontrado un trabajo realizado por Khanna- Jain y cols. (Khanna-Jain R y cols. 2013), quienes observaron proliferación celular sobre el biomaterial. Compararon además, la diferenciación osteogénica utilizando dexometasona y vitamina D3; observando con este último más expresión osteogénica.

Se ha evaluado la interacción de CMM de origen dental no pulpares sobre distintos biomateriales; Heo y cols. (Heo YY y cols. 2010) cultivaron células madre de ligamento periodontal sobre discos de titanio liso maquinado chorreado con partículas de Al_2O_3 . Tete y cols. (Tete S y cols. 2007) estudiaron, mediante microscopía electrónica, la interacción de células madre de folículo dental sobre hueso bovino desproteinizado (Bio-Oss®). Observaron que las células tenían la morfología típica de CMM y que eran positivas para los marcadores mesenquimales CD29, CD90, CD146 and CD166. Asimismo, tras la inducción osteogénica, las células adquirieron la morfología de osteoblasto y fueron capaces de depositar matriz

extracelular en contacto con el biomaterial. Soria y cols. (Soria JM y cols.) cultivaron CMPD sobre un polímero. Observaron que en presencia de células de cresta neural, existía una secreción de factores neurotróficos por parte de las células pulpares.

Además, se ha observado crecimiento de CMM de médula ósea sobre distintos materiales de regeneración ósea, membranas o superficies. Así, podemos encontrar estudios con hidroxiapatita (Herten M y cols. 2009; Lock J y cols. 2012), hidroxiapatita con colágeno residual (Tutodent®), β -fosfato tricálcico (Cerasorb®) (Oliveira JM y cols. 2006), hidroxiapatita enriquecida con péptido p-15 (PepGen P-15®), α -fosfato tricálcico (BioBase®) (Herten M y cols. 2009), xenoinjerto, fosfato tricálcico y fosfato cálcico (Catledge SA y cols. 2004), membranas de colágeno (Mrozik KM y cols. 2011), películas de partículas depositadas de cerámica metálica nanoestructurada y discos de titanio de plasma nitrados (Liu Q y cols. 2011). En la presente tesis se estudió, mediante microscopía óptica y cómputo de DNA, la adhesión y crecimiento celular sobre β -fosfato tricálcico. Se observó, a partir del séptimo día de cultivo, un crecimiento de CMPD progresivo hasta el vigesimotercer día.

Se han utilizado distintas metodologías para evaluar la interacción de estas células sobre biomateriales. Roldán y cols. (Roldan JC y cols. 2010) evaluaron la polarización y migración de CMM sobre xenoinjerto, fosfato tricálcico y fosfato cálcico mediante microscopía confocal. Hasegawa y cols. (Hasegawa T y cols. 2010) cultivaron CMM de médula ósea sobre β -fosfato tricálcico; evaluaron

Discusión

la proliferación celular mediante 4 formas distintas de cultivo: mojando el biomaterial, a baja presión, pipeteando o con sistema de jeringas. Observaron que el mayor número de células contenidas sobre el biomaterial se obtuvo utilizando jeringas. Además, mediante este sistema, después de 2 semanas, se observó el mayor potencial de osteoinducción *in vitro*, y a las 8 semanas, también *in vivo*. En esta tesis, se evaluó la cantidad de células sobre el biomaterial cuantificando el DNA. Al determinar la cantidad de DNA, se estimó el número de células que había en cada momento. Para poder hacer la correspondencia, se realizó previamente una curva patrón cuantificando el DNA que había en distintas cantidades concretas de células. De esta manera se pudo cuantificar el número de CMPD sobre β -fosfato tricálcico en cada momento. Esta metodología ha sido utilizada por autores como Oliveira y cols. (Oliveira JM y cols. 2006). Hay que concretar que para contar el DNA se despegaron las células del biomaterial y posteriormente se extrajo el DNA de éstas. Khanna-Jain y cols. utilizaron un reactivo que permite medir el DNA cuando las células están en contacto con biomaterial, evitando así, los problemas que se derivan del aislamiento del DNA que se adhiere al biomaterial por interacciones electroestáticas (DNA tiene carga negativa mientras que el biomaterial positiva) (Khanna-Jain R y cols. 2013).

7.6 Limitaciones del estudio

No se pudo relacionar el porcentaje de obtención y el tiempo de aislamiento de CMPD con la edad y el sexo de los pacientes. Es probable que existan diferencias pero quizá por la cantidad de métodos utilizados y por la heterogeneidad de la muestra (más mujeres que hombres y más jóvenes que viejos) no nos ha sido posible establecer una relación.

De hecho, la edad del donante parece ser importante, aquellos más jóvenes tienden a proporcionar un mayor rendimiento de las células madre en aspirados de médula (D'Ippolito G y cols. 1999; Stolzing A y cols. 2008). Por otra parte, las células de donantes mayores proliferan menos que las de los jóvenes (Stenderup K y cols. 2003). Recientemente se ha visto que CMPD tienen la habilidad de proliferar independientemente de la edad del donante, pero en cultivo con varios pases (8 pases) solo las células de donantes jóvenes (hasta 35 años) proliferaban (Bressan E y cols. 2012). Atari y cols. (Atari M y cols. 2012) observaron en CMPD, que el porcentaje de células SSEA4⁺ aumentaba con la edad, mientras que el número de células OCT3/4⁺ y CD13⁺ disminuía. Además, los mismos autores vieron que los marcadores embrionarios seguían estando expresados en CMPD de pacientes de 58 años.

Se obtuvieron CMPD de pulpas de distintos dientes extraídos que cumplieron los criterios de inclusión para el estudio. No se

Discusión

compararon los resultados de la obtención en función del diente. La mayoría fueron terceros molares y premolares extraídos por motivos ortodóncicos. Por motivos anatómicos, las pulpas de los molares fueron más voluminosas. En algunos dientes, la pulpa se encontraba atrofiada y no se pudo obtener ningún tejido. Esto fue más frecuente en dientes uniradiculares y de pacientes mayores.

Uno de los objetivos fue comparar la proliferación celular a distintas concentraciones de O₂. Se utilizaron estufas de cultivo con unas presiones de 3 y 21% de O₂. En este objetivo encontramos el problema de que durante el tiempo que se procesaba el tejido pulpar en la campana de cultivo (fragmentar la pulpa, centrifugarla...), las condiciones de presión de O₂ fueron las del ambiente, es decir 21%. Aunque este tiempo es reducido, hubo momentos en los cuales, pulpas cultivadas a 3% de O₂ se encontraron en condiciones de 21% de O₂.

Una de las dificultades de la presente tesis fue evaluar la interacción de las CMPD sobre el biomaterial β-fosfato tricálcico. Comercialmente el biomaterial se presenta en forma granulada, pero para el estudio se utilizó un agregado del biomaterial que conformaba un disco. La adhesión de las CMPD se pudo evaluar mediante el microscopio óptico. La proliferación celular se evaluó cuantificando el DNA extraído en los distintos momentos. Uno de las dificultades fue extraer el DNA, que es ácido, del biomaterial, que es básico. La literatura científica no aclara muy bien este problema en la metodología de las publicaciones. Muy recientemente, Khanna- Jain y cols. (Khanna-Jain R y cols. 2013) utilizaron un reactivo que permite

medir el DNA cuando está en contacto con el propio biomaterial, de manera que no es necesario extraer el DNA de las células que están sobre el biomaterial. El inconveniente que encontramos a este método es que, al ser el biomaterial poroso, las células se introducen en estos poros y no se puede computar el DNA que no está en la superficie externa del biomaterial.

Se intentó además, en esta tesis, estudiar la interacción de CMPD sobre otros biomateriales de regeneración ósea (hidroxiapatita, hueso mineral bovino desproteinizado). Con estos biomateriales se utilizó la forma comercial granulada. Encontramos el problema que las células se adherían a la placa de cultivo y no al biomaterial dado la gran afinidad de las células a adherirse al plástico.

7.7 Proyecciones del estudio

La ingeniería tisular combina células y matrices para regenerar o reparar los tejidos. Esta tesis estudia distintos métodos para acortar el tiempo de aislamiento y de obtención de CMPD. Además también se estudia la presión de O₂ idónea para aumentar la proliferación del cultivo celular. Se estudia también la interacción de la CMPD con β-fosfato tricálcico. Enfocamos de esta manera esta tesis hacia el campo de la regeneración ósea con células madre. Todos estos factores están encaminados a facilitar la aplicación clínica de estas células. La continuación de este estudio consistiría en realizar una experimentación animal para evaluar si se puede extraer las células de

Discusión

la pulpa dental, e injertarlas en un mismo acto quirúrgico. Dado que la legislación en Europa no permite extraer un tejido, expandir las células, e injertarlas en un acto quirúrgico distinto, hace que la posible aplicación de CMPD sea complicada. Por esta razón los estudios en humanos realizados en Europa donde se han aplicado células madre en el campo de la cirugía bucal (Gonshor A y cols. 2011) se han llevado a cabo con células madre de médula ósea mediante punción aspiración. De esta manera se obtiene gran cantidad de células y no es necesario expandirlas en cultivo. El inconveniente es que se necesita de un campo extraoral para obtener las células. Las CMPD tienen la ventaja de que el acceso y la obtención son sencillas. Además existen estudios donde se han aislado las células de dientes no extraídos (Huang AH y cols. 2009) o con pulpitis irreversible (Li W y cols. 2007). Otro aspecto que la literatura no ha investigado a fondo es la optimización del número de células para acelerar la regeneración ósea. Sería interesante comparar la formación ósea con un solo biomaterial y distinto número de células. Estas líneas de investigación facilitarían la aplicación de estas terapias de ingeniería tisular en humanos, las cuales permiten ser menos invasivo y acortar los tiempos de tratamiento.

8 CONCLUSIONES

- 1- En nuestro grupo hemos obtenido células madre de pulpa dental, permitiéndonos así, determinar las condiciones óptimas para su aislamiento y cultivo.
- 2- De todos los métodos empleados para su obtención, la digestión de la pulpa con EDTA, colagenasa/disypasa, termolisina y sonicación, fue el que demostró mayor velocidad de aislamiento de las células.
- 3- Las células obtenidas de la pulpa dental fueron positivas para los marcadores CD-133, Oct4, Nestin, Stro-1, demostrando sus características de células madre mesenquimales. Además fueron negativas para el marcador de células madre hematopoyéticas CD-45. El marcador CD-34 fue positivo en un caso y negativo en otro.
- 4- Las células madre de pulpa dental mostraron una tasa de proliferación mayor al ser cultivadas bajo condiciones fisiológicas de O₂ (3%) que bajo condiciones ambientales (21% O₂).
- 5- Las células madre de pulpa dental tienen la capacidad de adherirse y proliferar sobre el biomaterial de regeneración ósea β-fosfato tricálcico.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abukawa, H., M. Shin, W. B. Williams, J. P. Vacanti, L. B. Kaban and M. J. Troulis (2004). *"Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone."* **J Oral Maxillofac Surg** 62(5): 601-6.
- Aghaloo, T. L., P. K. Moy and E. G. Freymiller (2005). *"Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study."* **Clin Oral Implants Res** 16(2): 250-7.
- Aimetti, M., F. Romano, C. Dellavia and S. De Paoli (2008). *"Sinus grafting using autogenous bone and platelet-rich plasma: histologic outcomes in humans."* **Int J Periodontics Restorative Dent** 28(6): 585-91.
- Alongi, D. J., T. Yamaza, Y. Song, A. F. Fouad, E. E. Romberg, S. Shi, R. S. Tuan and G. T. Huang (2010). *"Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential."* **Regen Med** 5(4): 617-31.
- Altman, G. H., R. L. Horan, I. Martin, J. Farhadi, P. R. Stark, V. Volloch, J. C. Richmond, G. Vunjak-Novakovic and D. L. Kaplan (2002). *"Cell differentiation by mechanical stress."* **FASEB J** 16(2): 270-2.
- Anitua, E. (1999). *"Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants."* **Int J Oral Maxillofac Implants** 14(4): 529-35.

Bibliografía

- Aonuma, H., N. Ogura, K. Takahashi, Y. Fujimoto, S. Iwai, H. Hashimoto, K. Ito, Y. Kamino and T. Kondoh (2012). *"Characteristics and osteogenic differentiation of stem/progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling."* **Cell Tissue Res** 350(2): 317-31.
- Atari, M., M. Barajas, F. Hernandez-Alfaro, C. Gil, M. Fabregat, E. Ferres Padro, L. Giner and N. Casals (2011). *"Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp."* **Histol Histopathol** 26(8): 1057-70.
- Atari, M., C. Gil-Recio, M. Fabregat, D. Garcia-Fernandez, M. Barajas, M. A. Carrasco, H. S. Jung, F. H. Alfaro, N. Casals, F. Prosper, E. Ferres-Padro and L. Giner (2012). *"Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells."* **J Cell Sci** 125(Pt 14): 3343-56.
- Azizi, S. A., D. Stokes, B. J. Augelli, C. DiGirolamo and D. J. Prockop (1998). *"Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts."* **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(7): 3908-13.
- Bergenholtz, G., I. A. Mjor, W. R. Cotton, C. T. Hanks, S. Kim, C. D. Torneck and H. O. Trowbridge (1985). *"The biology of dentin and pulp. Consensus report."* **J Dent Res** 64 Spec No: 631-3.
- Bosch, P., D. S. Musgrave, J. Y. Lee, J. Cummins, T. Shuler, T. C. Ghivizzani, T. Evans, T. D. Robbins and Huard (2000). *"Osteoprogenitor cells within skeletal muscle."* **J Orthop Res** 18(6): 933-44.

- Boyapati, L. and H. L. Wang (2006). *"The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review."* **Implant Dent** 15(2): 160-70.
- Boyne, P. J., R. E. Marx, M. Nevins, G. Triplett, E. Lazaro, L. C. Lilly, M. Alder and P. Nummikoski (1997). *"A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation."* **Int J Periodontics Restorative Dent** 17(1): 11-25.
- Boyne, P. J., L. C. Lilly, R. E. Marx, P. K. Moy, M. Nevins, D. B. Spagnoli and R. G. Triplett (2005). *"De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation."* **J Oral Maxillofac Surg** 63(12): 1693-707.
- Bressan, E., L. Ferroni, C. Gardin, P. Pinton, E. Stellini, D. Botticelli, S. Sivolella and B. Zavan (2012). *"Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds."* **PLoS One** 7(11): e49146.
- Broggini, N., W. Hofstetter, E. Hunziker, D. D. Bosshardt, M. M. Bornstein, I. Seto, G. Weibrich and D. Buser (2010). *"The influence of PRP on early bone formation in membrane protected defects. A histological and histomorphometric study in the rabbit calvaria."* **Clin Implant Dent Relat Res** 13(1): 1-12.

Bibliografía

- Calvo-Guirado, J. L., M. P. Ramirez-Fernandez, G. Gomez-Moreno, J. E. Mate-Sanchez, R. Delgado-Ruiz, J. Guardia, L. Lopez-Mari, A. Barone, A. J. Ortiz-Ruiz, J. M. Martinez-Gonzalez and L. A. Bravo (2010). "*Melatonin stimulates the growth of new bone around implants in the tibia of rabbits.*" **J Pineal Res** 49(4): 356-63.
- Caplan, A. I. (1991). "*Mesenchymal stem cells.*" **J Orthop Res** 9(5): 641-50.
- Catledge, S. A., Y. K. Vohra, S. L. Bellis and A. A. Sawyer (2004). "*Mesenchymal stem cell adhesion and spreading on nanostructured biomaterials.*" **J Nanosci Nanotechnol** 4(8): 986-9.
- Conget, P. A. and J. J. Minguell (1999). "*Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.*" **J Cell Physiol** 181(1): 67-73.
- Consolo, U., D. Zaffe, C. Bertoldi and G. Ceccherelli (2007). "*Platelet-rich plasma activity on maxillary sinus floor augmentation by autologous bone.*" **Clin Oral Implants Res** 18(2): 252-62.
- Cordeiro, M. M., Z. Dong, T. Kaneko, Z. Zhang, M. Miyazawa, S. Shi, A. J. Smith and J. E. Nor (2008). "*Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth.*" **J Endod** 34(8): 962-9.

- Chow, D. C., L. A. Wenning, W. M. Miller and E. T. Papoutsakis (2001). "*Modeling $pO(2)$ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model.*" **Biophys J** 81(2): 675-84.
- d'Aquino, R., A. De Rosa, V. Lanza, V. Tirino, L. Laino, A. Graziano, V. Desiderio, G. Laino and G. Papaccio (2009). "*Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes.*" **Eur Cell Mater** 18: 75-83.
- D'Ippolito, G., P. C. Schiller, C. Ricordi, B. A. Roos and G. A. Howard (1999). "*Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow.*" **J Bone Miner Res** 14(7): 1115-22.
- Dallari, D., M. Fini, C. Stagni, P. Torricelli, N. Nicoli Aldini, G. Giavaresi, E. Cenni, N. Baldini, A. Cenacchi, A. Bassi, R. Giardino, P. M. Fornasari and A. Giunti (2006). "*In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination.*" **J Orthop Res** 24(5): 877-88.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, P. Tylzanowski and F. P. Luyten (2001). "*Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane.*" **Arthritis Rheum** 44(8): 1928-42.

Bibliografía

- De Girolamo, L., M. F. Sartori, E. Arrigoni, L. Rimondini, W. Albisetti, R. L. Weinstein and A. T. Brini (2008). "*Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction.*" **Int J Artif Organs** 31(6): 467-79.
- De Kok, I. J., S. J. Drapeau, R. Young and L. F. Cooper (2005). "*Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study.*" **Int J Oral Maxillofac Implants** 20(4): 511-8.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "*Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.*" **Nature** 292(5819): 154-6.
- Ferro, F., R. Spelat, A. P. Beltrami, D. Cesselli and F. Curcio (2012). "*Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum.*" **PLoS One** 7(11): e48945.
- Fiorellini, J. P., T. H. Howell, D. Cochran, J. Malmquist, L. C. Lilly, D. Spagnoli, J. Toljanic, A. Jones and M. Nevins (2005). "*Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation.*" **J Periodontol** 76(4): 605-13.

- Friedenstein, A. J., A. A. Ivanov-Smolenski, R. K. Chajlakjan, U. F. Gorskaya, A. I. Kuralesova, N. W. Latzinik and U. W. Gerasimow (1978). "*Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants.*" **Exp Hematol** 6(5): 440-4.
- Friedlaender, G. E., C. R. Perry, J. D. Cole, S. D. Cook, G. Cierny, G. F. Muschler, G. A. Zych, J. H. Calhoun, A. J. LaForte and S. Yin (2001). "*Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions.*" **J Bone Joint Surg Am** 83-A Suppl 1(Pt 2): S151-8.
- Froum, S. J., S. S. Wallace, D. P. Tarnow and S. C. Cho (2002). "*Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports.*" **Int J Periodontics Restorative Dent** 22(1): 45-53.
- Fuchs, J. R., D. Hannouche, S. Terada, S. Zand, J. P. Vacanti and D. O. Fauza (2005). "*Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells.*" **Stem Cells** 23(7): 958-64.
- Gandia, C., A. Arminan, J. M. Garcia-Verdugo, E. Lledo, A. Ruiz, M. D. Minana, J. Sanchez-Torrijos, R. Paya, V. Mirabet, F. Carbonell-Uberos, M. Llop, J. A. Montero and P. Sepulveda (2008). "*Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction.*" **Stem Cells** 26(3): 638-45.

Bibliografía

- Gomez-Moreno, G., A. Cutando, C. Arana, C. V. Worf, J. Guardia, F. Munoz, M. Lopez-Pena and J. Stephenson (2009). "*The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants.*" **Int J Oral Maxillofac Implants** 24(6): 1068-73.
- Gonshor, A., B. S. McAllister, S. S. Wallace and H. Prasad (2011). "*Histologic and histomorphometric evaluation of an allograft stem cell-based matrix sinus augmentation procedure.*" **Int J Oral Maxillofac Implants** 26(1): 123-31.
- Graziano, A., R. d'Aquino, G. Laino, A. Proto, M. T. Giuliano, G. Pirozzi, A. De Rosa, D. Di Napoli and G. Papaccio (2008). "*Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo.*" **Cell Prolif** 41(1): 1-11.
- Gronthos, S. and P. J. Simmons (1995). "*The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro.*" **Blood** 85(4): 929-40.
- Gronthos, S., M. Mankani, J. Brahim, P. G. Robey and S. Shi (2000). "*Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(25): 13625-30.
- Gronthos, S., J. Brahim, W. Li, L. W. Fisher, N. Cherman, A. Boyde, P. DenBesten, P. G. Robey and S. Shi (2002). "*Stem cell properties of human dental pulp stem cells.*" **J Dent Res** 81(8): 531-5.
- Guerette, D., P. A. Khan, P. E. Savard and M. Vincent (2007). "*Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins.*" **BMC Evol Biol** 7: 164.

- Gutwald, R., J. Haberstroh, J. Kuschnierz, C. Kister, D. A. Lysek, M. Maglione, S. P. Xavier, T. Oshima, R. Schmelzeisen and S. Sauerbier (2009). "*Mesenchymal stem cells and inorganic bovine bone mineral in sinus augmentation: comparison with augmentation by autologous bone in adult sheep.*" **Br J Oral Maxillofac Surg** 48(4): 285-90.
- Hanisch, O., C. A. Cortella, M. M. Boskovic, R. A. James, J. Slots and U. M. Wikesjo (1997a). "*Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants.*" **J Periodontol** 68(1): 59-66.
- Hanisch, O., D. N. Tatakis, M. M. Boskovic, M. D. Rohrer and U. M. Wikesjo (1997b). "*Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defects following surgical implantation of rhBMP-2.*" **Int J Oral Maxillofac Implants** 12(5): 604-10.
- Hanisch, O., D. N. Tatakis, M. D. Rohrer, P. S. Wohrle, J. M. Wozney and U. M. Wikesjo (1997c). "*Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates.*" **Int J Oral Maxillofac Implants** 12(6): 785-92.
- Hasegawa, T., M. Miwa, Y. Sakai, T. Niikura, S. Y. Lee, K. Oe, T. Iwakura, M. Kurosaka and T. Komori (2010). "*Efficient cell-seeding into scaffolds improves bone formation.*" **J Dent Res** 89(8): 854-9.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber and A. I. Caplan (1992). "*Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies.*" **Bone** 13(1): 69-80.

Bibliografía

- Heo, Y. Y., S. Um, S. K. Kim, J. M. Park and B. M. Seo (2010). *"Responses of periodontal ligament stem cells on various titanium surfaces."* **Oral Dis** 17(3): 320-7.
- Herten, M., D. Rothamel, F. Schwarz, K. Friesen, G. Koegler and J. Becker (2009). *"Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability."* **Clin Oral Investig** 13(2): 149-55.
- Hirata, T. M., N. Ishkitiev, K. Yaegaki, B. Calenic, H. Ishikawa, T. Nakahara, V. Mitev, T. Tanaka and M. Haapasalo (2010). *"Expression of multiple stem cell markers in dental pulp cells cultured in serum-free media."* **J Endod** 36(7): 1139-44.
- Howell, T. H., J. Fiorellini, A. Jones, M. Alder, P. Nummikoski, M. Lazaro, L. Lilly and D. Cochran (1997). *"A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation."* **Int J Periodontics Restorative Dent** 17(2): 124-39.
- Hu, B., F. Unda, S. Bopp-Kuchler, L. Jimenez, X. J. Wang, Y. Haikel, S. L. Wang and H. Lesot (2006). *"Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells."* **J Dent Res** 85(5): 416-21.
- Huang, A. H., Y. K. Chen, L. M. Lin, T. Y. Shieh and A. W. Chan (2008). *"Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth."* **J Oral Pathol Med** 37(9): 571-4.

- Huang, A. H., Y. K. Chen, A. W. Chan, T. Y. Shieh and L. M. Lin (2009). *"Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy."* **J Endod** 35(5): 673-81.
- Huang, Y. H., G. Polimeni, M. Qahash and U. M. Wikesjo (2008). *"Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge - future possibilities."* **Periodontol 2000** 47: 206-23.
- Iohara, K., M. Nakashima, M. Ito, M. Ishikawa, A. Nakasima and A. Akamine (2004). *"Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2."* **J Dent Res** 83(8): 590-5.
- Ito, K., Y. Yamada, S. Nakamura and M. Ueda (2011). *"Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants."* **Int J Oral Maxillofac Implants** 26(5): 947-54.
- Ito, K., Y. Yamada, T. Naiki and M. Ueda (2006). *"Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma."* **Clin Oral Implants Res** 17(5): 579-86.

Bibliografía

- Ito, K., Y. Yamada, S. Nakamura and M. Ueda (2011). "*Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants.*" **Int J Oral Maxillofac Implants** 26(5): 947-54.
- Jaenisch, R. and R. Young (2008). "*Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming.*" **Cell** 132(4): 567-82.
- Jafarian, M., M. B. Eslaminejad, A. Khojasteh, F. Mashhadi Abbas, M. M. Dehghan, R. Hassanizadeh and B. Houshmand (2008). "*Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral.*" **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 105(5): e14-24.
- Jung, R. E., R. Glauser, P. Scharer, C. H. Hammerle, H. F. Sailer and F. E. Weber (2003). "*Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans.*" **Clin Oral Implants Res** 14(5): 556-68.
- Jung, R. E., D. S. Thoma and C. H. Hammerle (2008). "*Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review.*" **J Clin Periodontol** 35(8 Suppl): 255-81.

- Jung, R. E., S. I. Windisch, A. M. Eggenschwiler, D. S. Thoma, F. E. Weber and C. H. Hammerle (2009). "A randomized-controlled clinical trial evaluating clinical and radiological outcomes after 3 and 5 years of dental implants placed in bone regenerated by means of GBR techniques with or without the addition of BMP-2." **Clin Oral Implants Res** 20(7): 660-6.
- Kanafi, M. M., R. Pal and P. K. Gupta (2013). "Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells." **Cell Biol Int** 37(2): 126-36.
- Karamzadeh, R., M. B. Eslaminejad and R. Aflatoonian (2012). "Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods." **J Vis Exp**(69).
- Kemoun, P., S. Laurencin-Dalcieux, J. Rue, J. C. Farges, I. Gennero, F. Conte-Auriol, F. Briand-Mesange, M. Gadelorge, H. Arzate, A. S. Narayanan, G. Brunel and J. P. Salles (2007). "Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro." **Cell Tissue Res** 329(2): 283-94.
- Kerkis, I., A. Kerkis, D. Dozortsev, G. C. Stukart-Parsons, S. M. Gomes Massironi, L. V. Pereira, A. I. Caplan and H. F. Cerruti (2006). "Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers." **Cells Tissues Organs** 184(3-4): 105-16.

Bibliografía

- Khanna-Jain, R., B. Mannerstrom, A. Vuorinen, G. K. Sandor, R. Suuronen and S. Miettinen (2013). "*Osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells on beta-tricalcium phosphate/poly (l-lactic acid/caprolactone) three-dimensional scaffolds.*" **J Tissue Eng** 3(1): 2041731412467998.
- Kim, S. H., K. H. Kim, B. M. Seo, K. T. Koo, T. I. Kim, Y. J. Seol, Y. Ku, I. C. Rhyu, C. P. Chung and Y. M. Lee (2009). "*Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study.*" **J Periodontol** 80(11): 1815-23.
- Kinoshita, K., H. Hibi, Y. Yamada and M. Ueda (2008). "*Promoted new bone formation in maxillary distraction osteogenesis using a tissue-engineered osteogenic material.*" **J Craniofac Surg** 19(1): 80-7.
- Kitamura, C., K. Kimura, T. Nakayama and M. Terashita (1999). "*Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars.*" **J Dent Res** 78(2): 673-80.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop and D. G. Phinney (1999). "*Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(19): 10711-6.

- Korbling, M. and Z. Estrov (2003). *"Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?"* **N Engl J Med** 349(6): 570-82.
- Koyama, N., Y. Okubo, K. Nakao and K. Bessho (2009). *"Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells."* **J Oral Maxillofac Surg** 67(3): 501-6.
- Laino, G., A. Graziano, R. d'Aquino, G. Pirozzi, V. Lanza, S. Valiante, A. De Rosa, F. Naro, E. Vivarelli and G. Papaccio (2006). *"An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering."* **J Cell Physiol** 206(3): 693-701.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). *"Tissue engineering."* **Science** 260(5110): 920-6.
- Lee, L. T., P. C. Kwan, Y. F. Chen and Y. K. Wong (2008). *"Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells."* **J Chin Med Assoc** 71(2): 66-73.
- Lee, S. Y., P. C. Chiang, Y. H. Tsai, S. Y. Tsai, J. H. Jeng, T. Kawata and H. M. Huang (2010). *"Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells."* **J Endod** 36(8): 1336-40.
- Li, L., Y. Q. Zhu, L. Jiang, W. Peng and H. H. Ritchie (2011). *"Hypoxia promotes mineralization of human dental pulp cells."* **J Endod** 37(6): 799-802.

Bibliografía

- Li, W., A. L. Sabater, Y. T. Chen, Y. Hayashida, S. Y. Chen, H. He and S. C. Tseng (2007). "A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells." **Invest Ophthalmol Vis Sci** 48(2): 614-20.
- Liao, J., M. Al Shahrani, M. Al-Habib, T. Tanaka and G. T. Huang (2011). "Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic." **J Endod** 37(9): 1217-24.
- Lindroos, B., K. Maenpaa, T. Ylikomi, H. Oja, R. Suuronen and S. Miettinen (2008). "Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts." **Biochem Biophys Res Commun** 368(2): 329-35.
- Liu, H., W. Li, S. Shi, S. Habelitz, C. Gao and P. Denbesten (2005). "MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate." **Arch Oral Biol** 50(11): 923-8.
- Liu, H. W., C. H. Chen, C. L. Tsai, I. H. Lin and G. H. Hsiue (2007). "Heterobifunctional poly(ethylene glycol)-tethered bone morphogenetic protein-2-stimulated bone marrow mesenchymal stromal cell differentiation and osteogenesis." **Tissue Eng** 13(5): 1113-24.
- Liu, Q., A. Humpe, D. Kletsas, F. Warnke, S. T. Becker, T. Douglas, S. Sivananthan and P. H. Warnke (2011). "Proliferation assessment of primary human mesenchymal stem cells on collagen membranes for guided bone regeneration." **Int J Oral Maxillofac Implants** 26(5): 1004-10.

- Lock, J., T. Y. Nguyen and H. Liu (2012). "*Nanophase hydroxyapatite and poly(lactide-co-glycolide) composites promote human mesenchymal stem cell adhesion and osteogenic differentiation in vitro.*" **J Mater Sci Mater Med** 23(10): 2543-52.
- Lumsden, A. G. (1988). "*Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ.*" **Development** 103 Suppl: 155-69.
- Marei, M. K., S. R. Nouh, M. M. Saad and N. S. Ismail (2005). "*Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants.*" **Tissue Eng** 11(5-6): 751-67.
- McAllister, B. S., K. Haghghat and A. Gonshor (2009). "*Histologic evaluation of a stem cell-based sinus-augmentation procedure.*" **J Periodontol** 80(4): 679-86.
- Meijer, G. J., J. D. de Bruijn, R. Koole and C. A. van Blitterswijk (2008). "*Cell based bone tissue engineering in jaw defects.*" **Biomaterials** 29(21): 3053-61.
- Michel, M., N. Torok, M. J. Godbout, M. Lussier, P. Gaudreau, A. Royal and L. Germain (1996). "*Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage.*" **J Cell Sci** 109 (Pt 5): 1017-28.
- Mina, M. and A. Braut (2004). "*New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Colla1-GFP transgenes.*" **Cells Tissues Organs** 176(1-3): 120-33.

Bibliografía

- Miura, M., S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L. W. Fisher, P. G. Robey and S. Shi (2003). "*SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(10): 5807-12.
- Montenegro, R., I. Needleman, D. Moles and M. Tonetti (2002). "*Quality of RCTs in periodontology--a systematic review.*" **J Dent Res** 81(12): 866-70.
- Morsczeck, C., W. Gotz, J. Schierholz, F. Zeilhofer, U. Kuhn, C. Mohl, C. Sippel and K. H. Hoffmann (2005). "*Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth.*" **Matrix Biol** 24(2): 155-65.
- Mrozik, K. M., S. Gronthos, D. Menicanin, V. Marino and P. M. Bartold (2011). "*Effect of coating Straumann Bone Ceramic with Emdogain on mesenchymal stromal cell hard tissue formation.*" **Clin Oral Investig** 16(3): 867-78.
- Murray, P. E., J. B. Matthews, A. J. Sloan and A. J. Smith (2002). "*Analysis of incisor pulp cell populations in Wistar rats of different ages.*" **Arch Oral Biol** 47(10): 709-15.
- Mylonas, D., M. D. Vidal, I. J. De Kok, J. D. Moriarity and L. F. Cooper (2007). "*Investigation of a thermoplastic polymeric carrier for bone tissue engineering using allogeneic mesenchymal stem cells in granular scaffolds.*" **J Prosthodont** 16(6): 421-30.
- Nakahara, H., V. M. Goldberg and A. I. Caplan (1991). "*Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo.*" **J Orthop Res** 9(4): 465-76.

- Ohya, M., Y. Yamada, R. Ozawa, K. Ito, M. Takahashi and M. Ueda (2005). *"Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits."* **Clin Oral Implants Res** 16(5): 622-9.
- Oliveira, J. M., M. T. Rodrigues, S. S. Silva, P. B. Malafaya, M. E. Gomes, C. A. Viegas, I. R. Dias, J. T. Azevedo, J. F. Mano and R. L. Reis (2006). *"Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells."* **Biomaterials** 27(36): 6123-37.
- Papaccio, G., A. Graziano, R. d'Aquino, M. F. Graziano, G. Pirozzi, D. Menditti, A. De Rosa, F. Carinci and G. Laino (2006). *"Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair."* **J Cell Physiol** 208(2): 319-25.
- Pereira, L. O., M. R. Rubini, J. R. Silva, D. M. Oliveira, I. C. Silva, M. J. Pocas-Fonseca and R. B. Azevedo (2012). *"Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps."* **Int Endod J** 45(12): 1080-90.
- Perry, B. C., D. Zhou, X. Wu, F. C. Yang, M. A. Byers, T. M. Chu, J. J. Hockema, E. J. Woods and W. S. Goebel (2008). *"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.

Bibliografía

- Pierdomenico, L., L. Bonsi, M. Calvitti, D. Rondelli, M. Arpinati, G. Chirumbolo, E. Becchetti, C. Marchionni, F. Alviano, V. Fossati, N. Staffolani, M. Franchina, A. Grossi and G. P. Bagnara (2005). "*Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp.*" **Transplantation** 80(6): 836-42.
- Pieri, F., E. Lucarelli, G. Corinaldesi, G. Iezzi, A. Piattelli, R. Giardino, M. Bassi, D. Donati and C. Marchetti (2008). "*Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs.*" **J Clin Periodontol** 35(6): 539-46.
- Pieri, F., E. Lucarelli, G. Corinaldesi, M. Fini, N. N. Aldini, R. Giardino, D. Donati and C. Marchetti (2009). "*Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs.*" **J Oral Maxillofac Surg** 67(2): 265-72.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "*Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.*" **Science** 284(5411): 143-7.
- Plachokova, A. S., D. Nikolidakis, J. Mulder, J. A. Jansen and N. H. Creugers (2008). "*Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review.*" **Clin Oral Implants Res** 19(6): 539-45.

- Qi, M., J. Hu, S. Zou, H. Zhou and L. Han (2006). "*Mandibular distraction osteogenesis enhanced by bone marrow mesenchymal stem cells in rats.*" **J Craniomaxillofac Surg** 34(5): 283-9.
- Raghoobar, G. M., J. Schortinghuis, R. S. Liem, J. L. Ruben, J. E. van der Wal and A. Vissink (2005). "*Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor?*" **Clin Oral Implants Res** 16(3): 349-56.
- Rickert, D., S. Sauerbier, H. Nagursky, D. Menne, A. Vissink and G. M. Raghoobar (2010). "*Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: a prospective randomized clinical trial.*" **Clin Oral Implants Res** 22(3): 251-8.
- Rodriguez-Lozano, F. J., C. L. Insausti, L. Meseguer, M. C. Ramirez, S. Martinez and J. M. Moraleda (2012). "*Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation.*" **J Craniofac Surg** 23(6): e571-5.
- Roldan, J. C., E. Chang, M. Kelantan, L. Jazayeri, U. Deisinger, R. Detsch, T. E. Reichert and G. C. Gurtner (2010). "*Quantifying migration and polarization of murine mesenchymal stem cells on different bone substitutes by confocal laser scanning microscopy.*" **J Craniomaxillofac Surg** 38(8): 580-8.
- Ruch, J. V. (1985). "*Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer.*" **J Dent Res** 64 Spec No: 489-98.

Bibliografía

- Ruch, J. V. (1998). "*Odontoblast commitment and differentiation.*" **Biochem Cell Biol** 76(6): 923-38.
- Sakdee, J. B., R. R. White, T. C. Pagonis and P. V. Hauschka (2009). "*Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells.*" **J Endod** 35(6): 818-23.
- Sammartino, G., M. Tia, G. Marenzi, A. E. di Lauro, E. D'Agostino and P. P. Claudio (2005). "*Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars.*" **J Oral Maxillofac Surg** 63(6): 766-70.
- Sasaki, R., S. Aoki, M. Yamato, H. Uchiyama, K. Wada, T. Okano and H. Ogiuchi (2008). "*Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor.*" **Eur J Neurosci** 27(3): 538-48.
- Sauerbier, S., K. Stubbe, M. Maglione, J. Haberstroh, J. Kuschnierz, T. Oshima, S. P. Xavier, L. Brunnberg, R. Schmelzeisen and R. Gutwald (2010). "*Mesenchymal stem cells and bovine bone mineral in sinus lift procedures--an experimental study in sheep.*" **Tissue Eng Part C Methods** 16(5): 1033-9.
- Scheller, E. L., J. Chang and C. Y. Wang (2008). "*Wnt/beta-catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation.*" **J Dent Res** 87(2): 126-30.
- Shanti, R. M., W. J. Li, L. J. Nesti, X. Wang and R. S. Tuan (2007). "*Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery.*" **J Oral Maxillofac Surg** 65(8): 1640-7.

- Shayesteh, Y. S., A. Khojasteh, M. Soleimani, M. Alikhasi, A. Khoshzaban and N. Ahmadbeigi (2008). "*Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold.*" **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 106(2): 203-9.
- Shi, S., P. G. Robey and S. Gronthos (2001). "*Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis.*" **Bone** 29(6): 532-9.
- Shi, S. and S. Gronthos (2003). "*Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp.*" **J Bone Miner Res** 18(4): 696-704.
- Sigurdsson, T. J., E. Fu, D. N. Tatakis, M. D. Rohrer and U. M. Wikesjo (1997). "*Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration.*" **Clin Oral Implants Res** 8(5): 367-74.
- Sigurdsson, T. J., S. Nguyen and U. M. Wikesjo (2001). "*Alveolar ridge augmentation with rhBMP-2 and bone-to-implant contact in induced bone.*" **Int J Periodontics Restorative Dent** 21(5): 461-73.
- Sinanan, A. C., N. P. Hunt and M. P. Lewis (2004). "*Human adult craniofacial muscle-derived cells: neural-cell adhesion-molecule (NCAM; CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells.*" **Biotechnol Appl Biochem** 40(Pt 1): 25-34.

Bibliografía

- Smiler, D., M. Soltan and J. W. Lee (2007). "A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells." **Implant Dent** 16(1): 42-53.
- Smith, A. J. and H. Lesot (2001). "Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair?" **Crit Rev Oral Biol Med** 12(5): 425-37.
- Song, L. and R. S. Tuan (2004). "Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow." **FASEB J** 18(9): 980-2.
- Sonoyama, W., Y. Liu, D. Fang, T. Yamaza, B. M. Seo, C. Zhang, H. Liu, S. Gronthos, C. Y. Wang, S. Wang and S. Shi (2006). "Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine." **PLoS One** 1: e79.
- Sonoyama, W., Y. Liu, T. Yamaza, R. S. Tuan, S. Wang, S. Shi and G. T. Huang (2008). "Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study." **J Endod** 34(2): 166-71.
- Soria, J. M., M. Sancho-Tello, M. A. Esparza, V. Mirabet, J. V. Bagan, M. Monleon and C. Carda (2011). "Biomaterials coated by dental pulp cells as substrate for neural stem cell differentiation." **J Biomed Mater Res A**.
- Stenderup, K., J. Justesen, C. Clausen and M. Kassem (2003). "Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells." **Bone** 33(6): 919-26.

- Stolzing, A., E. Jones, D. McGonagle and A. Scutt (2008). "*Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies.*" **Mech Ageing Dev** 129(3): 163-73.
- Suchanek, J., T. Soukup, B. Visek, R. Ivancakova, L. Kucerova and J. Mokry (2009). "*Dental pulp stem cells and their characterization.*" **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** 153(1): 31-5.
- Takeda, T., Y. Tezuka, M. Horiuchi, K. Hosono, K. Iida, D. Hatakeyama, S. Miyaki, T. Kunisada, T. Shibata and K. Tezuka (2008). "*Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs.*" **J Dent Res** 87(7): 676-81.
- Tecles, O., P. Laurent, S. Zygouritsas, A. S. Burger, J. Camps, J. Dejou and I. About (2005). "*Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury.*" **Arch Oral Biol** 50(2): 103-8.
- Tete, S., F. Mastrangelo, L. Carone, E. Nargi, G. Costanzo, R. Vinci, F. Burruano, S. Tortorici, V. Dadorante, F. Caciagli, T. Traini, E. Gherlone, A. Caraffa, V. Salini, P. Conti and R. Ciccarelli (2007). "*Morphostructural analysis of human follicular stem cells on highly porous bone hydroxyapatite scaffold.*" **Int J Immunopathol Pharmacol** 20(4): 819-26.
- Thesleff, I. and P. Sharpe (1997). "*Signalling networks regulating dental development.*" **Mech Dev** 67(2): 111-23.

Bibliografía

- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998). "*Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.*" **Science** 282(5391): 1145-7.
- Thor, A., K. Wannfors, L. Sennerby and L. Rasmusson (2005). "*Reconstruction of the severely resorbed maxilla with autogenous bone, platelet-rich plasma, and implants: 1-year results of a controlled prospective 5-year study.*" **Clin Implant Dent Relat Res** 7(4): 209-20.
- Tirino, V., F. Paino, R. d'Aquino, V. Desiderio, A. De Rosa and G. Papaccio (2011). "*Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives.*" **Stem Cell Rev** 7(3): 608-15.
- Torres, J., F. Tamimi, P. P. Martinez, M. H. Alkhraisat, R. Linares, G. Hernandez, J. Torres-Macho and E. Lopez-Cabarcos (2009). "*Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial.*" **J Clin Periodontol** 36(8): 677-87.
- Tsuji, K., A. Bandyopadhyay, B. D. Harfe, K. Cox, S. Kakar, L. Gerstenfeld, T. Einhorn, C. J. Tabin and V. Rosen (2006). "*BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing.*" **Nat Genet** 38(12): 1424-9.

- Tuli, R., S. Tuli, S. Nandi, M. L. Wang, P. G. Alexander, H. Haleem-Smith, W. J. Hozack, P. A. Manner, K. G. Danielson and R. S. Tuan (2003). "*Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone.*" **Stem Cells** 21(6): 681-93.
- Urist, M. R. (1965). "*Bone: formation by autoinduction.*" **Science** 150(3698): 893-9.
- Valderrama, P., R. E. Jung, D. S. Thoma, A. A. Jones and D. L. Cochran (2010). "*Evaluation of parathyroid hormone bound to a synthetic matrix for guided bone regeneration around dental implants: a histomorphometric study in dogs.*" **J Periodontol** 81(5): 737-47.
- Vina, J., R. Hems and H. A. Krebs (1978). "*Maintenance of glutathione content is isolated hepatocytes.*" **Biochem J** 170(3): 627-30.
- Waddington, R. J., S. J. Youde, C. P. Lee and A. J. Sloan (2009). "*Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp.*" **Cells Tissues Organs** 189(1-4): 268-74.
- Wakitani, S., T. Saito and A. I. Caplan (1995). "*Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.*" **Muscle Nerve** 18(12): 1417-26.
- Wang, J., X. Wei, J. Ling, Y. Huang and Q. Gong (2010). "*Side population increase after simulated transient ischemia in human dental pulp cell.*" **J Endod** 36(3): 453-8.

Bibliografía

- Wang, Y., J. Yao, M. Yuan, Z. Zhang and W. Hu (2012). "*Osteoblasts can induce dental pulp stem cells to undergo osteogenic differentiation.*" **Cytotechnology** 65(2): 223-31.
- Wang, Z., J. Pan, J. T. Wright, S. Bencharit, S. Zhang, E. T. Everett, F. B. Teixeira and J. S. Preisser (2010). "*Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study.*" **J Endod** 36(5): 820-5.
- Weissman, I. L. (2000). "*Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.*" **Cell** 100(1): 157-68.
- Wikesjo, U. M., R. G. Sorensen, A. Kinoshita and J. M. Wozney (2002). "*RhBMP-2/alphaBSM induces significant vertical alveolar ridge augmentation and dental implant osseointegration.*" **Clin Implant Dent Relat Res** 4(4): 174-82.
- Wikesjo, U. M., M. Qahash, G. Polimeni, C. Susin, R. H. Shanaman, M. D. Rohrer, J. M. Wozney and J. Hall (2008). "*Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations.*" **J Clin Periodontol** 35(11): 1001-10.
- Yamada, Y., K. Ito, S. Nakamura, M. Ueda and T. Nagasaka (2011). "*Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow.*" **Cell Transplant** 20(7): 1003-13.
- Yamada, Y., M. Ueda, T. Naiki and T. Nagasaka (2004a). "*Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants.*" **Clin Oral Implants Res** 15(5): 589-97.

- Yamada, Y., M. Ueda, T. Naiki, M. Takahashi, K. Hata and T. Nagasaka (2004b). *"Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration."* **Tissue Eng** 10(5-6): 955-64.
- Yamada, Y., K. Ito, S. Nakamura, M. Ueda and T. Nagasaka (2010). *"Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow."* **Cell Transplant** 20(7): 1003-13.
- Yamashita, M., M. Nevins, A. A. Jones, J. Schoolfield and D. L. Cochran (2010). *"A pilot experimental lateral ridge augmentation study using bone morphogenetic protein 2 in dogs."* **Int J Periodontics Restorative Dent** 30(5): 457-69.
- Yan, X., H. Qin, C. Qu, R. S. Tuan, S. Shi and G. T. Huang (2009). *"iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin."* **Stem Cells Dev** 19(4): 469-80.
- Yoshimi, R., Y. Yamada, K. Ito, S. Nakamura, A. Abe, T. Nagasaka, K. Okabe, T. Kohgo, S. Baba and M. Ueda (2009). *"Self-assembling peptide nanofiber scaffolds, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells for injectable bone regeneration with tissue engineering."* **J Craniofac Surg** 20(5): 1523-30.

Bibliografía

- Young, H. E., T. A. Steele, R. A. Bray, J. Hudson, J. A. Floyd, K. Hawkins, K. Thomas, T. Austin, C. Edwards, J. Cuzzourt, M. Duenzl, P. A. Lucas and A. C. Black, Jr. (2001). *"Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors."* **Anat Rec** 264(1): 51-62.
- Yu, J., H. He, C. Tang, G. Zhang, Y. Li, R. Wang, J. Shi and Y. Jin (2010). *"Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging."* **BMC Cell Biol** 11: 32.
- Zhang, W., X. F. Walboomers, J. G. Wolke, Z. Bian, M. W. Fan and J. A. Jansen (2005). *"Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro."* **Tissue Eng** 11(3-4): 357-68.
- Zhang, W., X. F. Walboomers, S. Shi, M. Fan and J. A. Jansen (2006). *"Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation."* **Tissue Eng** 12(10): 2813-23.
- Zhang, W., X. F. Walboomers, T. H. Van Kuppevelt, W. F. Daamen, P. A. Van Damme, Z. Bian and J. A. Jansen (2008). *"In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages."* **J Tissue Eng Regen Med** 2(2-3): 117-25.
- Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2002). *"Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells."* **Mol Biol Cell** 13(12): 4279-95.