



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Departament d' Estomatologia
Facultat de Medicina i Odontologia

REGENERACIÓN TISULAR: ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL

Tesis doctoral presentada por Santiago Peydró Tomás, para
optar al título de Doctor en Odontología por
la Universitat de València

Directores de tesis:

Prof.^a Carmen Carda Batalla

Prof. José Javier Martín de Llano

Prof. Amando Peydró Olaya

Valencia, Mayo 2015

Dña. Carmen Carda Batalla, Catedrática de Histología de la Universitat de València

D. José Javier Martín de Llano, Profesor Titular de Histología de la Universitat de València

D. Amando Peydró Olaya, Catedrático Emérito de Histología de la Universitat de València

Certifican que:

La presente tesis doctoral “Regeneración tisular: estudio de la diferenciación *in vitro* de las células madre de la pulpa dental” ha sido realizada por D. Santiago Peydró Tomás, licenciado en odontología, bajo nuestra dirección y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura.

Y para que conste, firman la presente en Valencia, Mayo de 2015.

Fdo: Prof.^a Carmen Carda Batalla

Fdo: Prof. José Javier Martín de Llano

Fdo: Prof. Amando Peydró Olaya

Agradecimientos

A Amando Peydró, mi padre, por ser un ejemplo de profesionalidad y dedicación.

A Carmen Carda, por su sabiduría y paciencia.

A Javier Martín, cuyos conocimientos y experiencia me han guiado durante todo este trabajo.

A Elena Carcelén, sin cuyo arte con el micrótomo el resultado no habría sido el mismo.

A Alejo Sempere, por sus valiosos consejos.

A Noemí, Teresa, Jürgen, José Manuel y a todos los que de alguna manera han colaborado en este trabajo.

A todo el Departamento de Patología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, por su apoyo durante este largo camino.

A mi familia, por estar siempre ahí.

A Blanca, por todo...

ABREVIATURAS

ALP: Fosfatasa alcalina

BMSC: Células madre de la médula ósea

CCD: Conexión cementodentinaria

CAD: Conexión amelodentinaria

CDHA: Hidroxiapatita de carbonato cálcico

CEMP-1: Proteína del cemento 1

CL: Clorhexidina

DMSO: Dimetil sulfóxido

DPBS: Disolución salina de tampón fosfato de Dulbecco

DPSC: Células madre de la pulpa dental

DSP: Sialoproteína dentinaria

DSPP: Sialofosfoproteína dentinaria

EDTA: Ácido etilen-diamino tetraacético

FCS: Suero fetal bovino

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

HA: Hidroxiapatita

HBSS: Disolución salina tampón de Hank

HDMEC: Células endoteliales

HS: Hipoclorito sódico

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IgG: Inmunoglobulina G

IL: Interleuquina

MEM: Medio esencial mínimo de Eagle

MET: Microscopía electrónica de transmisión

MTA: Agregado de trióxido mineral

NaClO: Hipoclorito sódico

NFG: Gelatina nanofibrosa

PA-CM: Medio de cultivo acondicionado por pre-ameloblastos

PAFSC: Células madre de la papila apical
PAS: Ácido periyódico de Schiff
PBS: Disolución salina de tampón fosfato
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDLSC: Células madre del ligamento periodontal
PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PLLA: Ácido poliláctico
PLSC: Células madre del ligamento periodontal
PRP: Plasma rico en plaquetas
RTG: Regeneración tisular guiada
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
SCAP: Células madre de la papila apical dental
SHED: Células madre de la pulpa de dientes deciduos
TBS: Solución salina con tampón Tris
TCP: Fosfato tricálcico
TGC-CM: Medio de cultivo acondicionado por células del germen dentario
TGF- β : Factor de crecimiento transformador β
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
WHO: Organización mundial de la salud

1. Introducción	1
1.1. Histogénesis dentaria	5
1.1.1. Formación de la corona	9
1.1.2. Formación de la raíz	11
1.1.3. Formación del periodonto	12
1.1.4. Dentinogénesis	14
1.1.5. Amelogénesis	16
1.2. Estructura histológica	19
1.2.1. Estructura del diente	19
1.2.1.1. Esmalte	19
1.2.1.2. Dentina	20
1.2.1.3. Pulpa	25
1.2.2. Estructura del periodonto	30
1.2.2.1. Cemento	30
1.2.2.2. Ligamento periodontal	32
1.2.2.3. Hueso alveolar	34
1.3. Patología dentaria y peridentaria	36
1.3.1. La caries dental	36
1.3.1.1. Epidemiología	37
1.3.1.2. Histopatología	38
1.3.2. La enfermedad periodontal destructiva	40

1.3.2.1. Epidemiología	40
1.3.2.2. Histopatología	41
1.4. Terapéutica odontológica: estado actual	44
1.4.1. Tratamiento de la caries dental	44
1.4.2. Tratamiento de la enfermedad periodontal	45
1.5. Ingeniería tisular	47
1.6. Hipótesis	54
1.7. Objetivos	55
2. Materiales y métodos	57
2.1. Células madre de la pulpa dental (DPSC)	61
2.1.1. Obtención	61
2.1.2. Cultivo	64
2.1.3. Caracterización celular	65
2.1.3.1. Morfología	65
2.1.3.2. Citometría de flujo	65
2.1.4. Conservación	66
2.2. Matrices de tejido dentario	67
2.3. Cultivo de DPSC con matrices de tejido dentario	71
2.3.1. Estudio Preliminar	71
2.3.2. Ensayo Optimizado	74
2.4. Estudio a microscopía óptica	78

2.5. Estudio a microscopía electrónica de transmisión	80
2.6. Materiales y reactivos empleados	82
2.6.1. Obtención y cultivo de DPSC	82
2.6.2. Caracterización de las DPSC	83
2.6.3. Obtención de las matrices de tejido dentario	84
2.6.4. Procesado de las muestras para su estudio	84
3. Resultados	87
3.1. Células madre de la pulpa dental	89
3.1.1. Obtención	89
3.1.2. Cultivo	90
3.1.3. Caracterización	90
3.1.3.1. Morfología	90
3.1.3.2. Citometría de flujo	91
3.2. Cultivo de DPSC con matrices de tejido dentario	97
3.2.1. Estudio preliminar	97
3.2.1.1. Proliferación	97
3.2.1.2. Cambios morfológicos	107
3.2.2. Ensayo optimizado	131
3.2.2.1. Proliferación	131
3.2.2.2. Cambios morfológicos	139
4. Discusión	183

4.1. Matrices de origen dentario	188
4.2. Matrices artificiales	212
4.3. Inducción mediante sustancias químicas	223
5. Conclusiones	233
6. Bibliografía	239

1. INTRODUCCIÓN

El diente y el periodonto componen una unidad funcional altamente especializada cuyo principal fin es permitir la masticación eficiente de los alimentos. El diente, compuesto por una combinación de tejidos extremadamente duros y elásticos, permite cortar, triturar y moler los alimentos. Y el periodonto, además de sujetar el diente al maxilar, absorbe las fuerzas oclusales y proporciona la vascularización y la propiocepción necesarias.

Asimismo, la formación dentaria y peridentaria es un proceso dinámico extremadamente complejo en el que intervienen células provenientes de diferentes estructuras embriológicas y que interaccionan entre sí para dar como resultado unas poblaciones celulares altamente especializadas que formarán los distintos tejidos que componen el diente y el periodonto.

Las dos grandes patologías que afectan a los tejidos dentales y periodontales, la caries y la enfermedad periodontal, cursan con destrucción de los tejidos afectados. El hecho de que la mayoría de los tejidos que conforman el diente y el periodonto presenten una baja o incluso nula capacidad intrínseca de regeneración, y de que todavía no se han desarrollado técnicas regenerativas que garanticen la reconstrucción total de la morfología

original de los tejidos y que sean aplicables para la mayor parte de los casos, hace que la terapéutica actual siga buscando soluciones al problema de la regeneración de los tejidos dentarios y peridentarios.

Los conocimientos sobre cómo se produce la formación de estos tejidos, unido a las técnicas de laboratorio y a los biomateriales que se han desarrollado en los últimos años, abren las puertas a la posibilidad de diseñar protocolos de regeneración que permitan la restauración de los tejidos dañados o perdidos.

Así pues, para poder reproducir y controlar este proceso de formación tisular en primer lugar debemos entender cómo se produce.

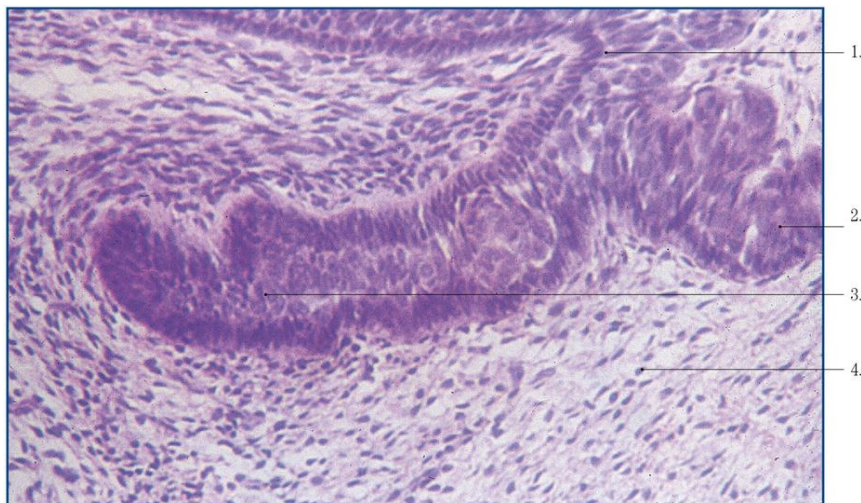
1.1. Histogénesis dentaria

Durante la sexta semana del desarrollo embrionario, en la región del primer arco branquial se produce una proliferación del ectodermo hacia el tejido mesenquimático subyacente inducida por células ectomesenquimáticas provenientes de las crestas neurales (Lumsden, 1988). Esta proliferación ectodérmica, llamada **banda epitelial primaria**, se divide en dos hojas epiteliales que van a formar estructuras diferentes: la lámina vestibular, que da origen al vestíbulo bucal, y la **lámina dentaria**, que da origen al órgano del esmalte.

En la semana octava del desarrollo embriológico, en el extremo de esta lámina dentaria se produce un engrosamiento de las capas celulares, pudiéndose distinguir una capa de células prismáticas cubriendo la superficie externa y una zona interna ocupada por células con morfología poligonal. Simultáneamente, en el mesénquima que lo rodea se produce una proliferación de células ectomesenquimáticas. Esta fase del desarrollo se corresponde al clásicamente denominado **estadio de yema o brote** (Nanci, 2013).

A partir de la décima semana del desarrollo embrionario la superficie externa del brote epitelial desarrolla una

concauidad central, adquiriendo una forma de casco o casquete.



©2009 Editorial Médica Panamericana

Figura 1. Estadio de yema o brote. 1: Lámina basal; 2: Restos de la lámina dentaria del diente primario; 3: Brote de diente permanente; 4: Ectomesénquima. De Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009.

En ese punto, esta estructura pasa a denominarse **órgano del esmalte**, y en él se distinguen tres componentes celulares:

- I. Epitelio dental externo: cubre la cara más externa y está formado por una capa de células cuboides.
- II. Epitelio dental interno: recubre la concauidad central y está formado igualmente por una capa de células isodiamétricas. Con el tiempo aparece una

proliferación de células que se proyecta hacia el retículo estrellado, llamado nudo del esmalte.

- III. Retículo estrellado: situado entre ambos epitelios, está formado por células con múltiples prolongaciones, de aspecto estrellado, unidas entre sí pero dejando espacios intercelulares ocupados por una sustancia fundamental intercelular rica en albúmina, mucopolisacáridos y fibras reticulares.

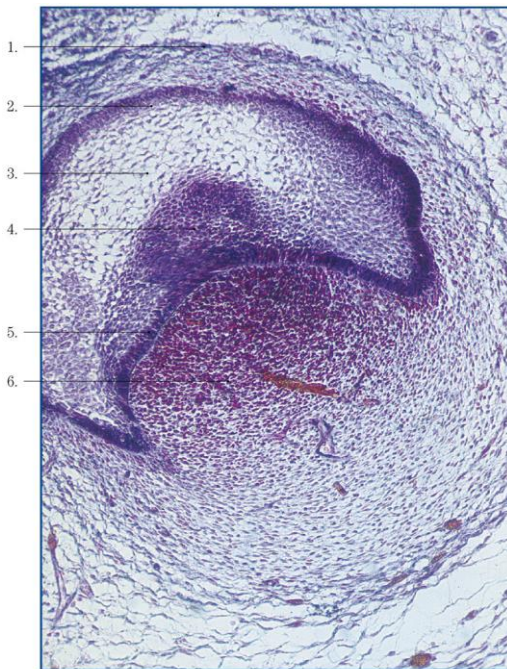


Figura 2. Estadio de casquete.

- 1: Saco dentario.*
- 2: Epitelio dental externo.*
- 3: Retículo estrellado.*
- 4: Nudo del esmalte.*
- 5: Epitelio dental interno.*
- 6: Papila dentaria.*

De Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009.

Al mismo tiempo, alrededor de este órgano epitelial se produce la proliferación y condensación de las células ectomesenquimáticas. El tejido que queda rodeado por la concavidad del epitelio interno se

denomina **papila dentaria**. Alrededor del órgano del esmalte y la papila dentaria esta condensación de células ectomesenquimáticas comienza a formar el llamado **saco dentario**, que envolverá todo el germen del diente en formación (Bhaskar, 1991).



Figura 3. Estadio de campana. 1: Hueso alveolar en formación; 2: Asa cervical; 3: Brote del diente permanente; 4: Papila dentaria; 5: Epitelio dental interno; 6: Estrato intermedio; 7: Retículo estrellado; 8: Saco dentario.
De Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009.

El órgano del esmalte continúa su desarrollo y aproximadamente entre la semana catorce y la dieciocho del desarrollo embrionario comienzan a observarse una serie de cambios en su estructura: las células del epitelio dental externo se vuelven más aplanadas, las células del epitelio dental interno aumentan de tamaño hasta hacerse prismáticas, pasando a denominarse **preameloblastos**, y

aparece una capa de células aplanadas sobre el epitelio interno denominado **estrato intermedio**. En esta etapa, llamada **estadio de campana**, el epitelio interno adopta la forma que presentará la corona del diente, marcando lo que se denomina el patrón coronario (Nanci, 2013).

1.1.1. Formación de la corona

En una fase más tardía e inducidas por los preameloblastos, algunas células ectomesenquimáticas de la papila dentaria se diferencian en **preodontoblastos**, células cuboides que se disponen formando una capa a modo de empalizada en contacto con la membrana basal del epitelio dental interno. Los preodontoblastos a su vez se diferencian en células prismáticas grandes llamadas **odontoblastos** que inmediatamente comienzan a producir matriz dentinaria o **predentina** sobre la membrana basal de los preameloblastos. Este proceso se inicia en las zonas correspondientes a las cúspides o del borde incisal del diente y en él los componentes orgánicos dentinarios (colágeno, glucosaminglicanos, ...) sintetizados por los odontoblastos se mezclan con la matriz extracelular de la papila dentaria que los rodea formando una fina capa. A continuación inducen su mineralización depositando pequeños cristales de hidroxiapatita sobre ella. Estos cristales se forman en el interior de pequeñas

evaginaciones llamadas **vesículas matriciales**. Durante el proceso de mineralización de la primera capa de dentina, llamada **dentina del manto**, los odontoblastos expulsan estas vesículas que al romperse liberan los cristales de hidroxiapatita que se depositan sobre la matriz dentinaria (Nanci, 2013).

La mineralización de las primeras capas de dentina estimula la diferenciación de los preameloblastos en ameloblastos secretores, que comienzan la síntesis de esmalte depositándolo sobre la dentina ya mineralizada. La membrana basal del epitelio dental interno, situada entre este epitelio y la papila dentaria, sufre un proceso de mineralización transformándose en la llamada **conexión amelodentinaria**, formada por un tejido hipermineralizado que sirve de anclaje entre el esmalte y la capa más superficial de la dentina.

Este proceso se va extendiendo desde las zonas correspondientes al borde incisal y las cúspides hacia la zona cervical del diente en formación. El punto donde el epitelio dental interno se une al epitelio dental externo se denomina asa cervical, y marca lo que será la futura línea amelocementaria (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

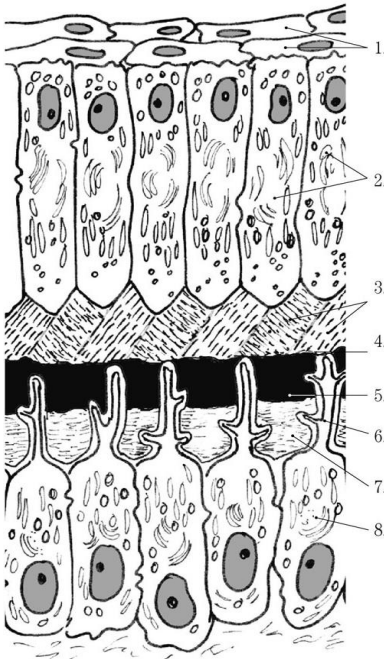


Figura 4. Primeras etapas en la síntesis del esmalte y la dentina.

1: Estrato intermedio.

2: Ameloblastos.

3: Prismas del esmalte.

4: Conexión amelodentinaria.

5: Dentina.

6: Proceso odontoblástico.

7: Predentina.

8: Odontoblasto.

De Gómez de Ferraris y

Cambos Muñoz. 2009.

1.1.2. Formación de la raíz

Una vez formada la corona, las células del epitelio dental interno de la zona cervical no se diferencian en preameloblastos, sino que se funden con las células del epitelio dental externo formando la llamada **vaina epitelial de Hertwig**, cuya función es la de inducir y controlar la formación de la raíz del diente (Nanci, 2013).

Las células de la vaina de Hertwig se disponen formando una bicapa de células cuboideas envolviendo la papila dentaria e inducen la diferenciación de células ectomesenquimáticas de la misma en preodontoblastos.

Los preodontoblastos se disponen formando una capa a modo de empalizada similar a la que se observa en la formación de la dentina coronaria y a continuación se diferencian en odontoblastos, quienes comienzan a depositar la dentina radicular. Este proceso se inicia a nivel cervical y se extiende progresivamente hacia la zona apical. En los dientes monorradiculares la vaina de Hertwig adopta una forma cónica con un único extremo abierto en la zona apical denominado **diafragma** que conforma el foramen apical primario. En los dientes multirradiculares en las paredes de la vaina de Hertwig aparecen unas lengüetas epiteliales que se funden y la dividen en segmentos más o menos independientes, cada uno de ellos con su diafragma epitelial, que formarán las diferentes raíces del diente (Bhaskar, 1991).

1.1.3. Formación del periodonto

A medida que las primeras capas de dentina radicular se mineralizan, la porción de la vaina de Hertwig en contacto con ella se fragmenta transformándose en una lámina fenestrada o red. A través de estos espacios penetran células ectomesenquimáticas del saco dentario que se colocan sobre la superficie externa de la dentina recién formada y se diferencian en cementoblastos.

Al mismo tiempo, a partir de las mismas células ectomesenquimáticas del saco dentario, se diferencian fibroblastos que producirán las fibras del ligamento periodontal y osteoblastos que formarán el hueso alveolar.

Los cementoblastos depositan la matriz cementoide, compuesta principalmente por colágeno tipo I y proteoglucanos, sobre la superficie de la dentina, envolviendo los gruesos haces de fibras colágenas del ligamento periodontal. De esta manera, al mineralizarse el cemento quedan ancladas las fibras periodontales a la superficie radicular del diente (figura 5).

Inicialmente estas fibras periodontales no presentan una orientación definida, por lo que se suele denominar **membrana periodontal**. Pero una vez el diente erupciona y recibe las cargas de otros elementos de la cavidad bucal, las fibras periodontales se organizan formando gruesos haces orientados en los diferentes ejes del espacio y fuertemente anclados tanto al cemento como al hueso alveolar, pasando a denominarse ya **ligamento periodontal** (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

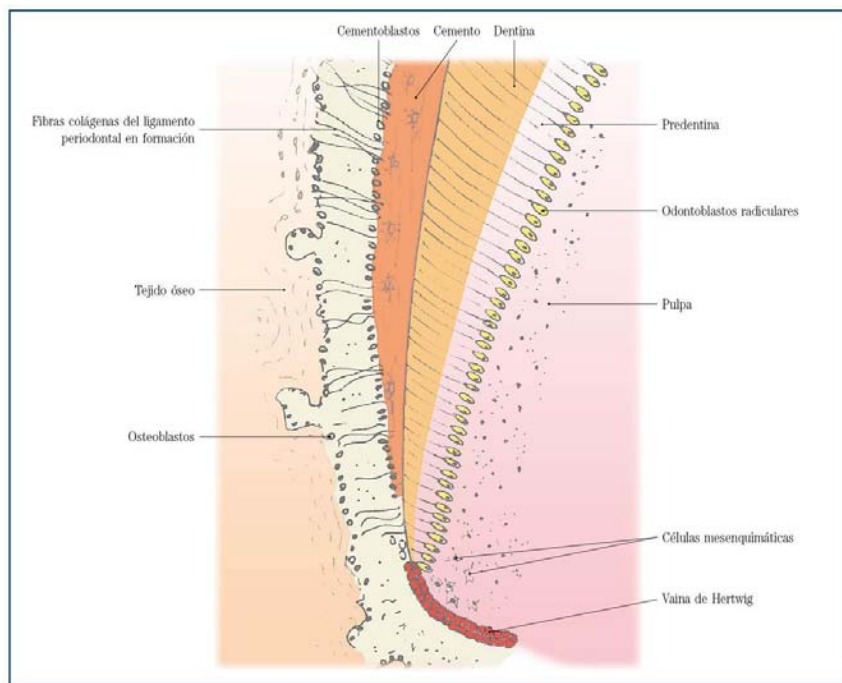


Figura 5. Formación de la raíz y del periodonto. De Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009.

1.1.4. Dentinogénesis

Como ya se ha expuesto anteriormente, en la síntesis de la primera capa de dentina, la llamada dentina del manto, el odontoblasto produce la matriz orgánica o predentina y la mineraliza liberando los cristales de hidroxipatita contenidos en las vesículas matriciales. Es decir, que la cristalización del fosfato cálcico se produce en el interior del odontoblasto, en las vesículas matriciales y, tras

evaginarse y romperse estas vesículas, los cristales se depositan sobre la predentina (Nanci, 2013).

Una vez la capa de dentina mineralizada alcanza los 20-22 μm de grosor, el proceso de síntesis de la dentina cambia, por lo que pasa a denominarse **dentina circumpulpar**. Este proceso presenta tres diferencias importantes respecto a la síntesis de la dentina del manto: las fibras colágenas son más pequeñas (50 nm de diámetro) y se orientan perpendicularmente a los túbulos dentinarios, la predentina está producida exclusivamente por los odontoblastos y no se mezcla con la sustancia fundamental de la papila dentaria que los rodea y la mineralización de la predentina se lleva a cabo siguiendo un patrón diferente. Durante la síntesis de la dentina circumpulpar, el odontoblasto produce la predentina y libera el fosfato cálcico y la fosforina dentinaria, de manera que el proceso de cristalización se produce fuera del odontoblasto, directamente sobre la predentina, formándose unos pequeños núcleos de mineralización llamados **calcosferitos** que actúan como núcleos de mineralización que van creciendo progresivamente a medida que aumenta el grado de mineralización, hasta fusionarse unos con otros (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

1.1.5. Amelogénesis

Como ya se ha dicho anteriormente, al final del estadio de campana de la odontogénesis se deposita la primera capa de dentina coronaria. Esto induce la diferenciación de los preameloblastos del epitelio dental interno en ameloblastos, que comienzan a sintetizar las primeras capas de esmalte.

La amelogénesis se lleva a cabo en tres etapas, en las que el ameloblasto experimenta cambios morfológicos significativos que determinan las características del tejido sintetizado:

- I. Los ameloblastos liberan por exocitosis los gránulos de secreción que contienen la matriz orgánica, llamados **cuerpos adamantinos**. Esta matriz orgánica, rica en amelogenina y fosfoproteína ácida, al ser depositada sufre un rápido proceso de mineralización parcial (hasta un 15%). Tras depositar una primera capa de esmalte en la que los cristales de hidroxiapatita formados durante la mineralización no presentan ningún tipo de organización (esmalte aprismático), el ameloblasto desarrolla en su polo secretor una proyección corta de aspecto cónico llamada **proceso de Tomes**, que le permite orientar la síntesis de los distintos componentes, de manera que los cristales de

hidroxiapatita quedan empaquetados formando unas estructuras tubulares largas conocidas como **prismas del esmalte** (esmalte prismático). El proceso de formación continúa siguiendo este patrón hasta llegar a las capas más externas del esmalte, en las que volvemos a encontrar un patrón aprismático (Bhaskar, 1991).

- II. Una vez el esmalte alcanza su grosor definitivo, los ameloblastos reducen su tamaño y desarrollan un borde estriado en su polo apical. En esta fase eliminan la mayor parte de la matriz proteica sintetizada, liberando metaloproteasas y aumentan la mineralización, liberando grandes cantidades de fosfato cálcico. A este proceso se le denomina **maduración del esmalte**.
- III. En una última fase, aumenta la mineralización (hasta un 96%) y se eliminan los poros resultantes de la absorción del agua y de la matriz proteica. Una vez finalizado el proceso de maduración, los ameloblastos reducen su tamaño hasta transformarse en células cuboides involutivas, y producen una última capa proteica, similar a una membrana basal, que recubre toda la superficie de esmalte denominada **cutícula primaria** (Gómez de Farraris y Campos Muñoz, 2009).

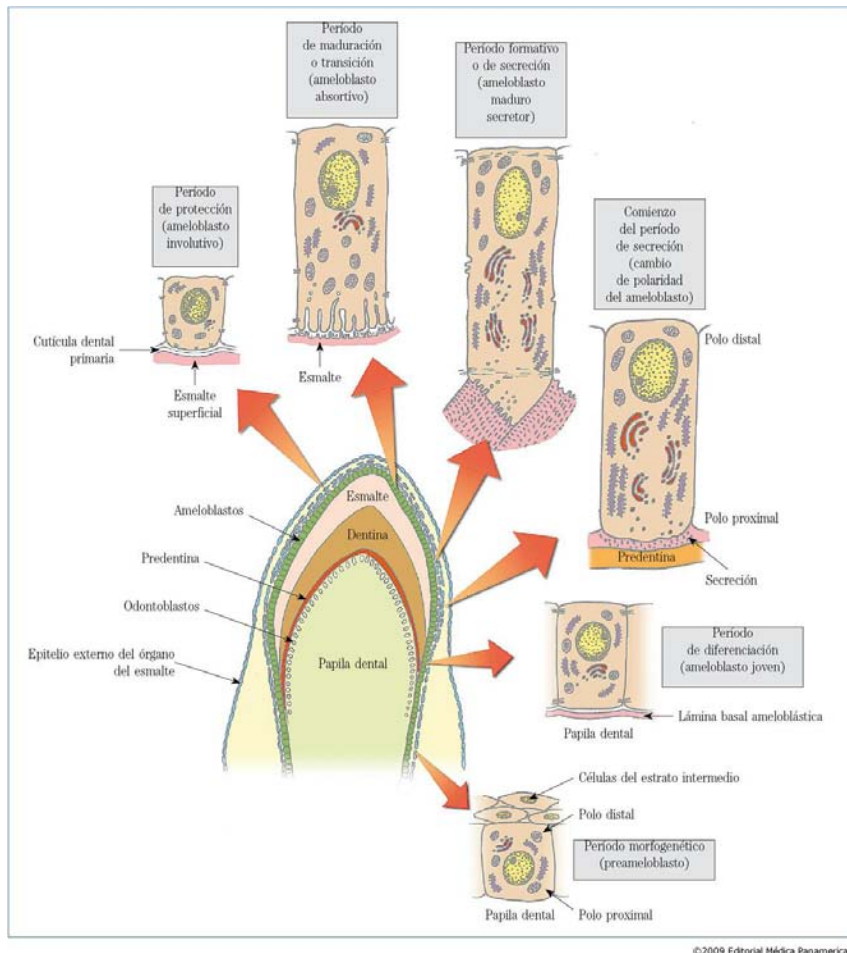


Figura 6. Ciclo vital de ameloblasto. De Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009.

1.2. Estructura histológica

1.2.1. Estructura del diente

El diente está formado por tres tejidos con características físicas e histológicas bien diferentes: esmalte, dentina y pulpa.

1.2.1.1. Esmalte

El esmalte es un tejido acelular, avascular y sin inervación, que como características físicas destacables presenta una gran dureza (5 en la escala de Mohs), poca elasticidad, cierta transparencia y una alta radiopacidad. Está compuesto por fosfato cálcico cristalizado en forma de hidroxiapatita (96%), agua (3%) y una escasa matriz orgánica (1%) formada por proteínas (enamelinas, ameloblastinas, tuftelina, ...). En función de cómo se organizan sus componentes se distingue entre esmalte prismático y esmalte aprismático (Nanci, 2013).

El esmalte prismático constituye la mayor parte y en él la matriz orgánica envuelve los cristales de hidroxiapatita y los agrupa formando unas estructuras alargadas y onduladas denominadas prismas del esmalte. Los prismas se orientan perpendiculares a la conexión amelodentinaria (CAD), y de ahí se dirigen hacia la superficie. En el esmalte se

observan unas líneas incrementales transversales, denominadas estrías de Retzius, que se corresponden con los ciclos de aposición durante la amelogenesis. En la zona próxima a la CAD y en la superficie encontramos esmalte aprismático, en el cual los cristales de hidroxiapatita están orientados pero no se agrupan formando prismas (Bhaskar, 1991).

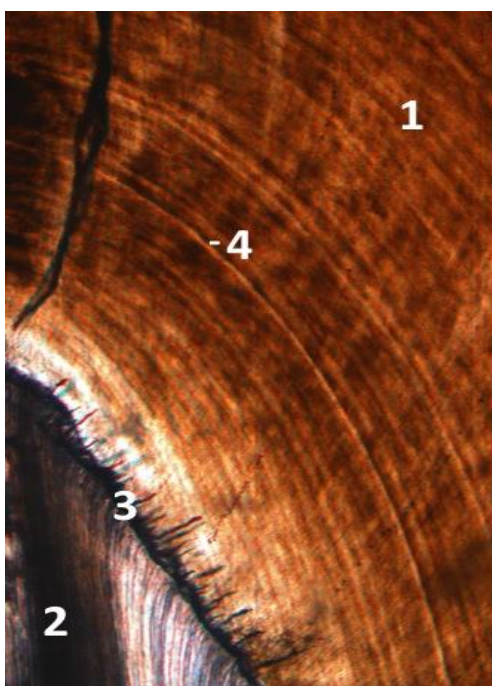


Figura 7. Esmalte y dentina.

1: Esmalte.

2: Dentina.

3: Conexión

amelodentinaria.

4: Estría de Retzius.

Corte por desgaste.

20x, aumentos originales.

1.2.1.2. Dentina

La dentina también es un tejido duro avascular, pero no se puede decir que sea acelular y que no presente inervación, pues en su interior se alojan las prolongaciones celulares

de los odontoblastos pulpaes, a las que acompañan algunas terminaciones nerviosas. Destaca por presentar una gran elasticidad, alta permeabilidad y alta radiopacidad, aunque menor que la del esmalte. Está compuesta por cristales de hidroxiapatita (70%), de menor tamaño que los del esmalte, una matriz proteica más abundante, formada principalmente por colágeno tipo I (18%), y agua (12%) (Gómez de Farraris y Campos Muñoz, 2009).

La característica estructural más significativa de la dentina es que no es un tejido macizo, sino que se encuentra totalmente perforada por pequeños canales denominados **túbulos dentinarios**. El diámetro de estos túbulos varía entre los 2.5 μm (cerca de la pulpa) y los 1.2 – 0.9 μm (en las capas externas), y se orientan desde la CAD y la conexión cementodentinaria (CCD) hacia la pulpa.

En ellos podemos encontrar las prolongaciones de los odontoblastos, cuyos cuerpos celulares se hallan en la pulpa. El espacio entre la prolongación del odontoblasto, llamada proceso odontoblástico, y la pared del túbulo dentinario se denomina espacio periprocesal, y está ocupado por el fluido dentinario. En ocasiones también podemos encontrar terminaciones nerviosas dentro de los

túbulos dentinarios, acompañando al proceso odontoblástico (Carda y Peydró, 2006).

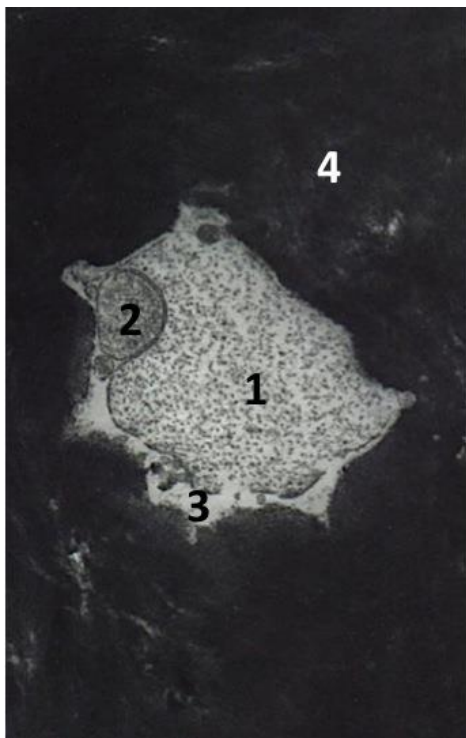


Figura 8. Sección

transversal de un túbulo dentinario.

1: Proceso odontoblástico.

2: Fibra nerviosa.

3: Espacio periprocesal.

4: Dentina.

MET. 10000x.

La dentina que encontramos entre los túbulos, llamada dentina intertubular, presenta una red de fibrillas de colágeno tipo I sobre la que se depositan los cristales de hidroxiapatita. Sin embargo, alrededor de los túbulos encontramos una capa de 400-750 nm de dentina hipermineralizada que se deposita de forma centrípeta a la luz del túbulo denominada dentina peritubular. Ésta, a diferencia de la dentina intertubular, presenta una matriz orgánica rica en glucosaminglicanos pero pobre en

colágeno. El odontoblasto continúa produciendo esta dentina durante toda la vida y, con el tiempo, puede llegar a obturar el túbulo dentinario (Gómez de Farraris y Campos Muñoz, 2009).

En función de cuándo se deposita podemos distinguir tres tipos de dentina:

- I. **Dentina primaria:** es la primera que se deposita y conforma el cuerpo del diente. En ella se distingue una primera capa externa de 20-22 μm de grosor, llamada **dentina del manto**, compuesta por una matriz de gruesas fibras de colágeno y sustancia fundamental ligeramente menos mineralizada que el resto de la dentina. La mineralización de su matriz se produce a partir de las vesículas matriciales, vesículas intracelulares donde el fosfato cálcico cristaliza en forma de hidroxiapatita y que al ser liberadas por el odontoblasto sirven de núcleos de calcificación. A continuación se observa una dentina, denominada **dentina circumpulpar**, compuesta por una matriz orgánica con fibras de colágeno muy finas (0.05 μm de diámetro) que presenta un mayor grado de mineralización. El proceso de mineralización en esta dentina difiere del de la dentina del manto, pues la formación de los cristales

de hidroxiapatita se produce de manera extracelular, formándose los llamados calcosferitos, que actúan como centros de mineralización. Durante el proceso los odontoblastos liberan los metabolitos sobre la matriz orgánica, de manera que los calcosferitos van aumentando de tamaño y fusionándose hasta mineralizarse toda la matriz.

- II. **Dentina secundaria:** una vez completada la formación de la corona y, posteriormente, la de la raíz, los odontoblastos continúan depositando dentina durante toda la vida tanto en la cámara pulpar como en los conductos radiculares, pero a un ritmo mucho menor y de forma heterogénea, lo que provoca una reducción progresiva del volumen del tejido pulpar conocida como **recesión pulpar**. En la dentina secundaria se puede observar además un cambio en la dirección y en la distribución de los túbulos dentinarios respecto a la dentina primaria (Nanci, 2013).
- III. **Dentina terciaria:** como respuesta a un estímulo nocivo (caries, trauma oclusal, ...), los odontoblastos afectados producen una dentina diferente a las anteriores. Esta dentina se deposita más rápidamente, presenta unos túbulos dentinarios escasos e irregulares y puede contener células incluidas que han quedado rodeadas por la matriz

mineralizada. Este estímulo nocivo puede inducir a los odontoblastos primitivos a producir dentina con mayor rapidez, en cuyo caso hablaríamos de dentina reactiva. Pero también puede producirse la muerte de los odontoblastos primitivos, con lo que la nueva dentina sería sintetizada por una generación distinta de odontoblastos diferenciados a partir de las células madre de la pulpa, en cuyo caso hablaríamos de dentina reparativa (Gómez de Farraris y Campos Muñoz, 2009).

La dentina se encuentra separada de la pulpa por una capa de 25-30 μm de matriz orgánica producida por los odontoblastos que todavía no se ha mineralizado, denominada **predentina** (Nanci, 2013).

1.2.1.3. Pulpa

La pulpa es el único tejido blando del diente y es una variedad especializada de tejido conjuntivo muy vascularizado y ricamente innervado, en el que encontramos varios tipos celulares rodeados por una matriz intercelular rica en fibras colágenas y reticulares.

Dentro de la variedad celular que encontramos destacan los **odontoblastos**, unas células postmitóticas altamente diferenciadas responsables de la síntesis de la dentina.

Embriológicamente estas células provienen del ectomesénquima que origina la papila dentaria durante la odontogénesis (Ruch, 1998).

Morfológicamente, los odontoblastos son células prismáticas altas, unidas unas a otras por complejos de unión, que presentan una prolongación única y larga en el polo apical, con pequeñas ramificaciones laterales, denominada **proceso odontoblástico** o fibra de Tomes. En su citoplasma observamos un núcleo redondo y voluminoso, con la cromatina dispersa y desplazado hacia el polo basal, un retículo endoplasmático rugoso y un complejo de Golgi muy desarrollados, así como gran cantidad de mitocondrias y vesículas. A nivel del proceso odontoblástico encontramos un citoesqueleto reforzado por abundantes microtúbulos y microfilamentos, así como la ausencia de orgánulos principales.

Es importante destacar que esta descripción sirve para los odontoblastos que encontramos en la corona, pues a medida que descendemos por la raíz hacia el ápice del diente la morfología de estas células cambia sustancialmente, reduciendo su tamaño y pasando a tener un aspecto cuboide e incluso aplanado cerca del ápice.

Otro factor que puede modificar la morfología del odontoblasto es el estado de actividad funcional en el que

se encuentra la célula. En los periodos de reposo la célula presenta un aspecto aplanado con un citoplasma escaso, mientras que en los periodos de actividad observamos una célula grande con sus orgánulos bien desarrollados (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

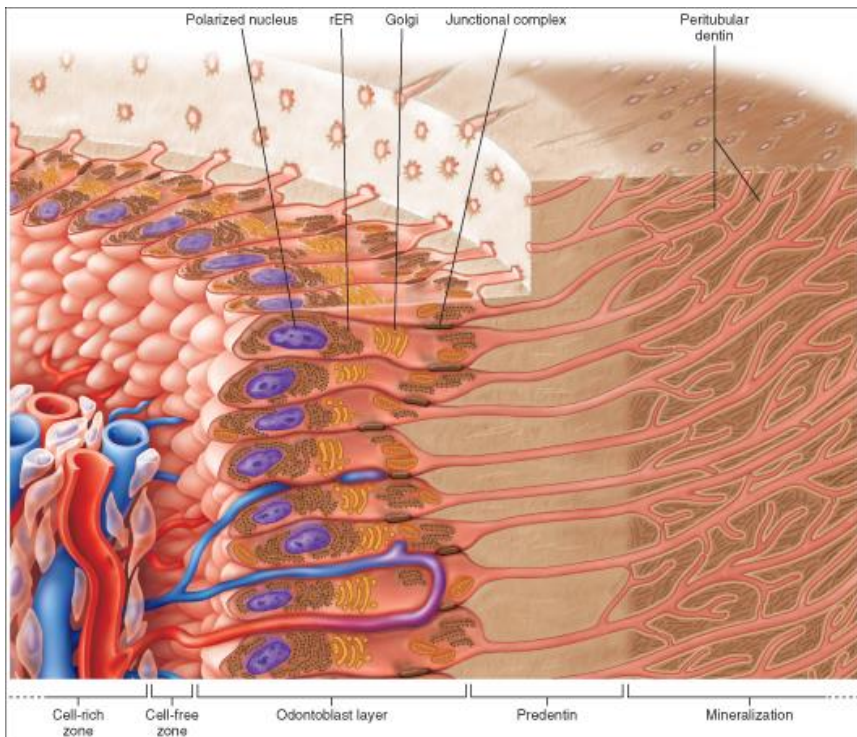


Figura 9. Odontoblastos en la pulpa dentaria marginal. De Nanci, 2013.

En el tejido pulpar se pueden observar cuatro capas bien diferenciadas:

- I. Capa odontoblástica: en ella se encuentran los cuerpos celulares de los odontoblastos formando una capa a modo de empalizada similar a un epitelio pseudoestratificado. Por debajo de ellos encontramos las **células de Höhl**, que proceden de la última división de las células ectomesenquimáticas que originan los odontoblastos y cuya función es actuar como *pool* de reserva.
- II. Capa subodontoblástica u oligocelular de Weil: con escasa celularidad pero muy rica en fibras reticulares, vasos sanguíneos y fibras nerviosas. Se observa principalmente en la zona coronaria. En ella las fibras reticulares, producidas por los fibroblastos de las capas adyacentes, forman el llamado plexo de von Korff. Asimismo, las fibras nerviosas forman un plexo extenso próximo a la zona basal de los odontoblastos denominado plexo de Raschkow.
- III. Capa rica en células: en ella encontramos una gran densidad celular, principalmente fibroblastos y células pulpares de reserva, así como otros tipos celulares (macrófagos, células dendríticas, linfocitos, ...).
- IV. Pulpa central: formada por una variedad de tejido conjuntivo laxo muy vascularizado y ricamente innervado, presenta una proporción equilibrada de células, principalmente fibroblastos, fibras y

sustancia fundamental rica en mucopolisacáridos y proteoglucanos (Berkovitz, 1992).

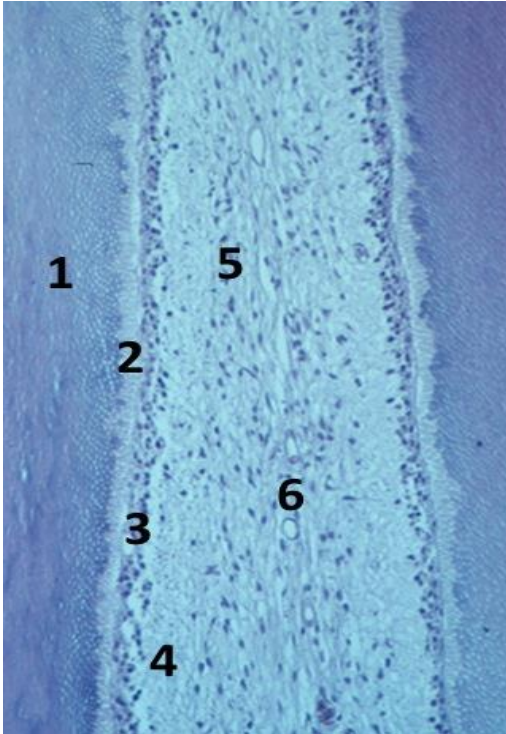


Figura 10. Corte longitudinal de un canal radicular.

1: Dentina.

2: Predentina.

3: Capa odontoblástica.

4: Capa subodontoblástica.

5: Capa rica en células.

6: Pulpa central.

Azul de Toluidina.

20x, aumentos originales.

Así pues, los odontoblastos, que son las células encargadas de la síntesis y el mantenimiento de la dentina, aunque conservan su prolongación celular dentro de la dentina mantienen la mayor parte de su citoplasma en la pulpa. Esto supone que la nutrición y la capacidad de reparación, además de la sensibilidad y las demás características que hacen que la dentina sea un tejido vivo, provienen de la pulpa, por lo que en la actualidad hablamos de **complejo dentinopulpar** en referencia a esa unidad

biológica y funcional que forman la dentina y la pulpa, si bien con características histológicas muy diferentes (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

1.2.2. Estructura del periodonto

El periodonto está formado a su vez por tres tejidos: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar.

1.2.2.1. **Cemento**

El cemento es el tejido duro y avascular que recubre la superficie de externa de la dentina radicular. Se compone de una matriz orgánica (25%) rica en colágeno tipo I, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, y mineralizada (65%). En el interior de este tejido mineralizado podemos encontrar algunas células, llamadas **cementocitos**, situados en pequeñas lagunas o cementoplastos que se comunican con la superficie externa a través de canalículos calcóforos que permiten la difusión de los nutrientes necesarios para la pervivencia de estas células.

El cemento es producido por los llamados **cementoblastos**, células cuboideas que se disponen formando una monocapa más o menos continua en la superficie externa del cemento, por lo que en realidad no se encuentran en el cemento sino en el ligamento periodontal.

En un diente adulto erupcionado normal podemos encontrar tres tipos de cemento:

- I. **Cemento acelular afibrilar:** se encuentra cerca de la línea amelocementaria y no presenta fibras de colágeno ni cementocitos. Las células que lo producen no han sido todavía identificadas y no interviene en el anclaje del diente al ligamento periodontal.
- II. **Cemento acelular de fibras extrínsecas o primario:** lo encontramos en el tercio cervical de diente y se deposita lentamente desde los inicios de la formación radicular hasta que el diente erupciona. No contiene cementocitos y durante su formación envuelve los gruesos haces de fibras producidas por los fibroblastos del ligamento periodontal adyacente, anclándolos al diente.
- III. **Cemento celular de fibras intrínsecas o secundario:** se localiza en los tercios medio y apical del diente y se deposita a mayor velocidad a partir de la erupción dentaria. Sus componentes, incluidas las fibras, son producidos enteramente por los cementoblastos. Debido a que se deposita a mayor velocidad, algunos cementoblastos quedan atrapados dentro de la matriz, transformándose en cementocitos. Este tipo de cemento continúa

creciendo por aposición durante toda la vida, lo que provoca que su grosor aumente progresivamente a lo largo de la vida, principalmente en la zona apical del diente (Nanci, 2013).

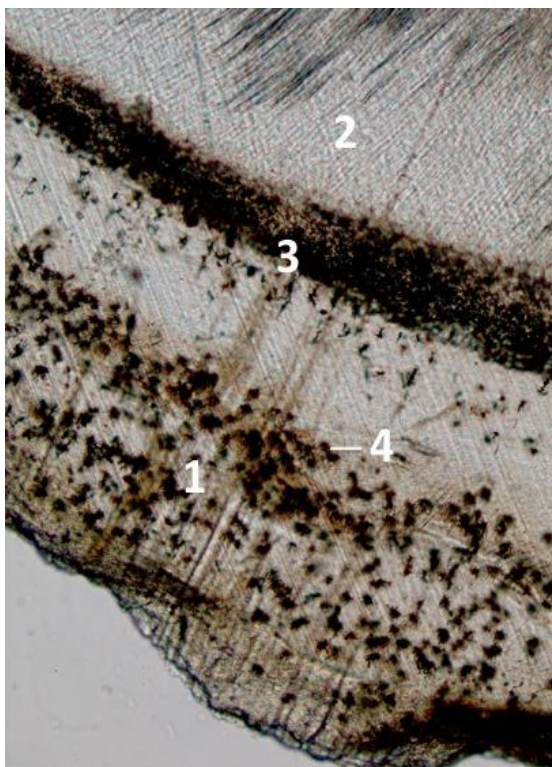


Figura 11. Raiz dentaria.

1: Cemento secundario.

2: Dentina.

3: Conexión

cementodentinaria. 4:

Cementoplasto.

Corte por desgaste.

10x, aumentos

originales.

1.2.2.2. Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es una variedad especializada de tejido conjuntivo denso, muy rico en fibras colágenas y elásticas, pero a su vez muy vascularizado e innervado. Su espesor es de 0.2-0.15 mm, y actúa como elemento de anclaje entre el cemento y el hueso alveolar.

Las fibras se agrupan en haces gruesos, denominados **fibras principales**, que se disponen orientados en los diferentes ejes del espacio y que penetran tanto en el cemento como en el hueso alveolar.

Entre las fibras encontramos una gran variedad celular: fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, cementoclastos, osteoclastos, leucocitos, restos de la vaina de Hertwig (llamados restos epiteliales de Malassez) y células madre.

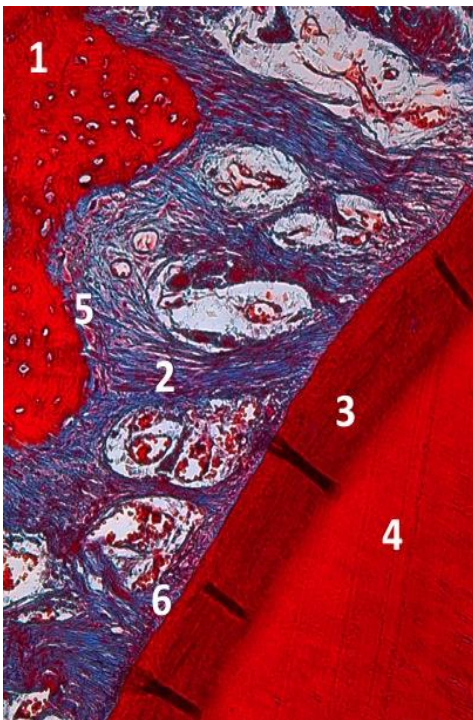


Figura 12. Diente y periodonto.

1: Hueso alveolar.

2: Fibras del ligamento periodontal.

3: Cemento.

4: Dentina.

5: Osteoblastos.

6: Cementoblastos.

Tricómico de Masson.

40x, aumentos originales.

1.2.2.3. Hueso alveolar

El hueso alveolar está compuesto por una delgada capa de tejido óseo compacto. Se forma al mismo tiempo que el ligamento periodontal, de manera que los osteoblastos depositan el osteoide sobre los haces de fibras producidas por los fibroblastos del ligamento periodontal y, al mineralizarse, estos haces quedan firmemente anclados en él. Estas fibras del ligamento periodontal que penetran en el hueso alveolar se denominan **fibras de Sharpey**.

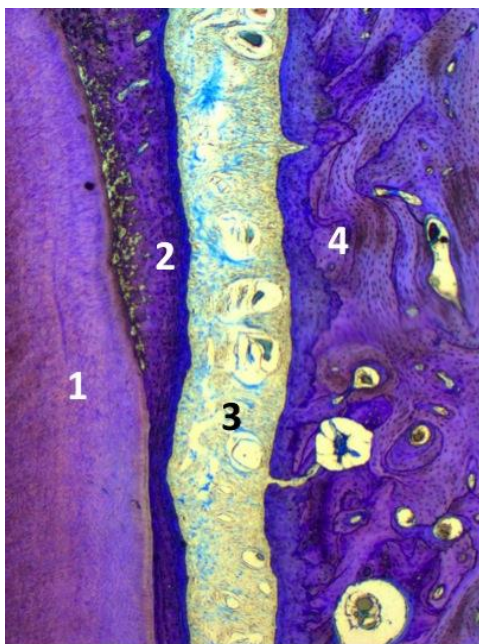


Figura 13. Diente y periodonto.

1: Dentina.

2: Cemento.

3: Ligamento periodontal.

4: Hueso alveolar.

Azul de toluidina.

20x, aumentos originales.

Normalmente está compuesto por dos capas corticales de hueso compacto, externa o perióstica e interna o periodóntica, entre las que encontramos una cantidad

variable de hueso esponjoso. La cortical periodóntica, también llamada hueso fascicular, consiste en una fina lámina cribosa perforada por las fibras de Sharpey.

Su presencia está totalmente condicionada por el ligamento periodontal: se forma a medida que se desarrollan la raíz del diente y el ligamento periodontal que la envuelve y sufre un proceso de atrofia hasta desaparecer si el diente se pierde (Lindhe *et al.*, 2009).

1.3. Patología dentaria y peridentaria

Dentro de la patología que afecta a los tejidos dentarios y peridentarios hay que destacar dos entidades, la caries y la enfermedad periodontal destructiva, por varias razones:

- I. Los estudios epidemiológicos realizados en diferentes poblaciones de todo el mundo reflejan altos índices de prevalencia.
- II. Ambas patologías cursan con destrucción de los tejidos dentarios y/o peridentarios y, finalmente, si no se aplica el tratamiento adecuado, pueden causar la pérdida total del diente.
- III. La alta repercusión económica sobre la población y sobre el sistema sanitario, derivada del tratamiento de estas patologías y de sus secuelas sobre el aparato estomatognático.

1.3.1. La caries dental

La caries es fundamentalmente una enfermedad microbiana que afecta a los tejidos calcificados del diente, empezando primero con una disolución localizada del componente inorgánico en la superficie dental mediante ácidos de origen bacteriano, hasta llegar a la desintegración total de la matriz orgánica (Menaker, 1986). Por lo general, es un proceso intermitente que evoluciona

siguiendo un patrón discontinuo de fases de remisión y recidiva de duración variable.

Actualmente se considera una enfermedad multifactorial, en la que deben concurrir dos factores asociados:

- **Bacterias:** los estudios realizados en humanos han proporcionado pruebas de que el *Streptococcus mutans* está asociado al origen del proceso cariogénico, si bien también hay evidencias de que puede haber otros gérmenes asociados (*Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, ...). Así mismo, numerosos estudios realizados con animales gnotobióticos han demostrado la implicación de las bacterias en la génesis del proceso carioso (Fitzgerald *et al.*, 1986).
- **Carbohidratos:** algunos gérmenes presentes en las lesiones cariosas (*Streptococcus mutans*) tienen capacidad para producir cantidades importantes de ácido láctico a partir de glucosa, fructosa o sacarosa. Estudios realizados en poblaciones de diferentes partes del mundo han asociado las dietas ricas en carbohidratos con una mayor incidencia de caries.

1.3.1.1. Epidemiología

Según publicó la Organización Mundial de la Salud (WHO) en su boletín sobre enfermedades orales en 2005, la

prevalencia de la caries dental es del 60-90% en los niños en edad escolar y de casi el 100% en los adultos en la mayoría de los países desarrollados (Petersen *et al.*, 2005). En la Comunidad Valenciana, según el estudio realizado por Eustaquio y colaboradores en 2010, la prevalencia de caries en adultos de 35-44 años es del 92.2% y en los de 65-74 años del 98.3%.

1.3.1.2. Histopatología

La caries, aunque tiene varias formas de presentación, en general evoluciona siguiendo un patrón común:

- I. **Lesión inicial o caries del esmalte:** en una primera fase, la caries afecta al tejido más superficial, el esmalte. Inicialmente se observa una desmineralización subsuperficial que con el tiempo se hace más grande y profunda. La destrucción de la matriz mineral continúa hasta que la lesión finalmente se cavita al colapsarse la capa superficial, lo que la deja expuesta a la invasión bacteriana.
- II. **Caries de la dentina:** al avanzar el proceso cariogénico se produce una afectación de la dentina mucho antes de que se produzca la cavitación del esmalte. Una vez la caries alcanza la dentina, en ella se observa una zona de dentina infectada por las bacterias de la placa, seguida de una zona de

dentina afectada que sufre una desmineralización parcial pero que mantiene su morfología intacta (Massler, 1967). Más en profundidad normalmente se observa una zona hipermineralizada.

- III. **Afectación pulpar:** las toxinas producidas por las bacterias, al penetrar por los túbulos dentinarios, pueden desencadenar un proceso inflamatorio en el tejido pulpar. Estas mismas toxinas pueden estimular a los odontoblastos a producir dentina terciaria. La agudización del proceso inflamatorio pulpar puede llegar a desencadenar una necrosis, con la consiguiente destrucción de todo el tejido pulpar. Finalmente, la progresión de la destrucción del tejido dentinario puede alcanzar a la cámara pulpar, con su consiguiente exposición a la cavidad bucal e invasión por la placa bacteriana oral.

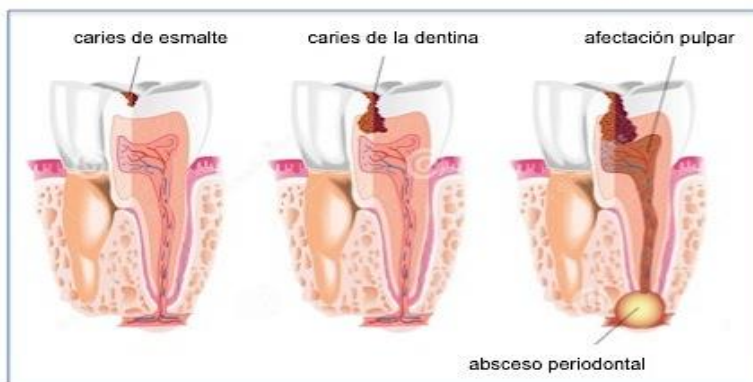


Figura 14. Histopatología de la caries. De Dreamstime.com.

1.3.2. La enfermedad periodontal destructiva

La enfermedad periodontal destructiva o periodontitis es una enfermedad infecciosa inducida por bacterias que se acumulan en el margen gingival, en la cual determinadas bacterias gram-negativas provocan una serie de respuestas inflamatorias aberrantes en los tejidos periodontales. Estos microorganismos poseen numerosos y potentes factores patógenos dirigidos a neutralizar los mecanismos de defensa del huésped y a destruir los tejidos periodontales (Amano, 2010).

1.3.2.1. Epidemiología

Según publicó la Organización Mundial de la Salud en su boletín sobre enfermedades orales en 2005, los datos recopilados sobre la salud oral global indican que las manifestaciones de la enfermedad periodontal tienen una alta prevalencia en todo el mundo. La enfermedad periodontal en su forma más avanzada (periodontitis severa), que puede ocasionar la pérdida del diente, se observa en el 5-20% de adultos en muchas poblaciones de todo el mundo (Petersen *et al.* 2005).

En la Comunidad Valenciana, según el estudio realizado por Eustaquio y colaboradores en 2010, en adultos de 35-44 años el porcentaje de individuos sin afectación

periodontal (en cualquiera de sus grados) es del 13%, mientras que en los de 65-74 años es únicamente del 5.5%.

1.3.2.2. Histopatología

La evolución de la periodontitis comprende una serie de estadios:

- I. **Lesión gingival inicial:** a las 24 horas de la acumulación de placa bacteriana en el surco gingival ya son evidentes cambios en la encía derivados del inicio del proceso inflamatorio. Se aprecia una dilatación vascular que conlleva un incremento de la permeabilidad vascular y un aumento del líquido crevicular, así como un aumento de la población de neutrófilos y linfocitos atraídos por la liberación de factores quimiotácticos.
- II. **Lesión gingival temprana:** se observa siete días aproximadamente después de la acumulación de placa bacteriana en el surco gingival y se caracteriza por un aumento del lecho microvascular del corion gingival y del infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente por neutrófilos y linfocitos. Paralelamente se produce una degeneración de los fibroblastos que permite

una mayor infiltración leucocitaria, así como una proliferación de las células basales de los epitelios del surco y de unión. La duración de esta fase de la patología es variable (Takahashi *et al.*, 1995).

- III. **Lesión gingival establecida:** se produce un aumento del proceso inflamatorio, con incremento del exudado líquido y del infiltrado leucocitario en el que se observa la presencia de plasmocitos, y que clínicamente se traduce en un tejido gingival con una tumefacción edematosa. El epitelio de unión continúa proliferando y se rompe su unión con la superficie dentaria y en él se observa una fuerte infiltración de neutrófilos. Este tipo de lesión puede mantenerse estable durante meses e incluso años, o evolucionar a lesiones periodontales más destructivas (Lijlberg *et al.*, 1994).
- IV. **Lesión gingival/periodontal avanzada:** en esta lesión el infiltrado inflamatorio se extiende lateral y apicalmente y en él se observa un predominio de plasmocitos. Además se aprecia una destrucción tisular que afecta al epitelio de unión, el cual migra apicalmente, al corion, que pierde gran parte de las fibras, e incluso al hueso alveolar (Lindhe *et al.*, 2009).

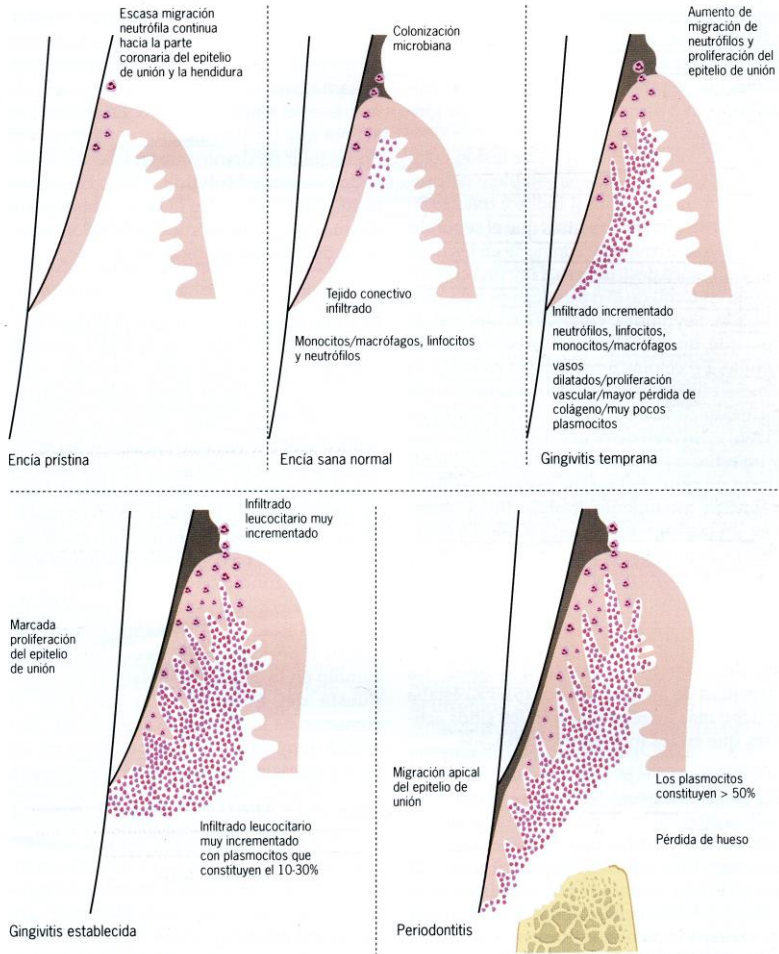


Figura 15. Representación esquemática de los cambios que aparecen en los tejidos gingivales durante la evolución de la enfermedad periodontal. De Lindhe et al., 2009.

1.4. Terapéutica odontológica: estado actual

Como se ha explicado anteriormente, las dos patologías más frecuentes en la clínica odontológica, la caries y la enfermedad periodontal, cursan con afectación y destrucción de los tejidos. Tras estos procesos, patológicos los tejidos dentarios y peridentarios poseen una escasa o nula capacidad de cicatrización/regeneración, lo que condiciona enormemente el enfoque terapéutico.

1.4.1. Tratamiento de la caries dental

Debido a que el proceso carioso cursa con la destrucción de los tejidos dentarios y a la nula capacidad intrínseca de cicatrización o regeneración de éstos tejidos, la terapéutica actual se centra en la eliminación de los tejidos dañados e infectados y en la reconstrucción de la morfología original del diente mediante materiales sintéticos como la amalgama de plata o las resinas compuestas.

En caso de que el proceso carioso afecte no sólo a los tejidos duros del diente, sino también a la pulpa dentaria, y esta afectación produzca una lesión irreversible en este tejido, el tratamiento habitual es la eliminación de todo el tejido pulpar afectado, la desinfección de la cámara pulpar

y los conductos radiculares y el posterior sellado de éstos mediante un material plástico (gutapercha) y un cemento biocompatible (Barrancos Mooney, 2006).

Así pues, actualmente la imposibilidad de generar de nuevo los tejidos duros dentarios, ya sea de forma natural o de forma artificial, limita las posibilidades terapéuticas e impide la restitución de la arquitectura original del diente.

1.4.2. Tratamiento de la enfermedad periodontal

Puesto que la enfermedad periodontal es un proceso fundamentalmente infeccioso, la terapéutica inicialmente se centra en la eliminación del foco infeccioso, es decir, la placa bacteriana y el cálculo.

Una vez eliminado el foco infeccioso, el periodonto posee una gran capacidad de cicatrización, desapareciendo el proceso inflamatorio generado alrededor del surco gingival, y generándose un nuevo anclaje dentogingival. Sin embargo, la capacidad intrínseca de regeneración de los tejidos periodontales es muy desigual, siendo muy reducida en el caso del hueso alveolar.

Teniendo en cuenta que las lesiones derivadas de la enfermedad periodontal desencadenan una destrucción del hueso alveolar, el gran objetivo de la terapéutica

periodontal actual es conseguir la regeneración de esta parte del periodonto. Para ello, se están desarrollando y aplicando una serie de técnicas que se aprovechan de los avances conseguidos en materia de ingeniería de tejidos.

La estrategia utilizada en la llamada Regeneración Tisular Guiada (RTG) consiste en el uso de membranas biocompatibles reabsorbibles (colágeno) o no reabsorbibles (Gore-tex®), como elemento barrera que impide la invasión de las células epiteliales de la encía, y biomateriales que estimulen la osteosíntesis en la zona periodontal, lo que está dando buenos resultados en algunos casos (Lindhe *et al.*, 2009).

Otra de las técnicas empleadas actualmente es el uso de proteínas del esmalte como elemento inductor de la cementogénesis, lo que permite el anclaje de nuevas fibras de colágeno sobre la raíz dentaria, lo que a su vez estimula la neoformación de hueso alveolar (Bosshardt, 2008).

Ambas estrategias están dando buenos resultados pero únicamente en casos determinados, limitando en gran medida las posibilidades terapéuticas aplicables a la gran mayoría de las lesiones periodontales.

1.5. Ingeniería tisular

El desarrollo de las técnicas necesarias para la extracción, caracterización y cultivo de las células madre del organismo se ha venido realizando desde hace décadas. Un ejemplo es el trabajo realizado por Friedenstein y colaboradores, quienes ya en 1976 estudiaron el comportamiento in vitro de células madre mesenquimáticas provenientes de la médula ósea y el bazo de cobayas en cultivos monocapa.

El descubrimiento y caracterización en la década de 1980 de las células madre embrionarias de ratón y posteriormente de otras especies, incluida la humana, abrió un gran abanico de posibilidades en cuanto a la investigación en biología celular (Notarianni y Evans, 2006).

Esto condujo al desarrollo de diferentes procedimientos para poder estimular y dirigir artificialmente el proceso de diferenciación de las distintas células madre descubiertas. Por ejemplo, Bennet y colaboradores (1991) cultivaron células de la médula ósea y modificando el medio de cultivo consiguieron dos tipos de colonias: fibroblásticas y adipocíticas. Ambos tipos celulares, al ser implantados en ratones formaron, tras cuatro semanas, núcleos de tejido osteogénico.

Concretamente en el diente, como ya se ha expuesto anteriormente, en el tejido pulpar, entre las diversas poblaciones celulares que lo forman, encontramos células ectomesenquimáticas de reserva. Estas células provienen del ectomesénquima embrionario y durante el desarrollo fetal migran desde las crestas neurales hacia el primer arco branquial, previo al inicio de la odontogénesis. Allí inician la formación del germen dentario induciendo al ectodermo a diferenciarse y formar la lámina dentaria que da origen al órgano del esmalte. Estas células ectomesenquimáticas por su parte dan origen al complejo pulpodentinario, diferenciándose en los principales tipos celulares que forman estos tejidos: odontoblastos que producen la dentina y fibroblastos que producen las fibras y la sustancia fundamental de la pulpa. En el diente adulto, a pesar del paso de los años, encontramos una población residual de estas células ectomesenquimáticas pluripotenciales con capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares, que permite cierta capacidad de reparación y/o regeneración del tejido pulpar y de la dentina. Actualmente estas células se denominan DPSC (*dental pulp stem cells* o células madre de la pulpa dental) (D'Aquino *et al.*, 2008; Casagrande *et al.*, 2011).

Esto quedó demostrado por Gronthos y colaboradores (2000), quienes a partir de tejido pulpar de terceros molares

exodonciados aislaron, caracterizaron y cultivaron las DPSC con éxito. A continuación, implantaron estas DPSC con gránulos de hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP) en ratones inmunodeprimidos y, paralelamente, implantaron BMSC (*bone marrow stem cells* o células madre de la médula ósea) también con HA y TCP en ratones inmunodeprimidos. A las 6 semanas observaron que en las muestras con DPSC aparecieron células con morfología similar a odontoblastos y que habían formado una matriz similar a la dentina sobre los gránulos de HA/TCP, mientras que en las muestras con BMSC las células habían tomado una morfología similar a los osteoblastos y habían formado osteoide.

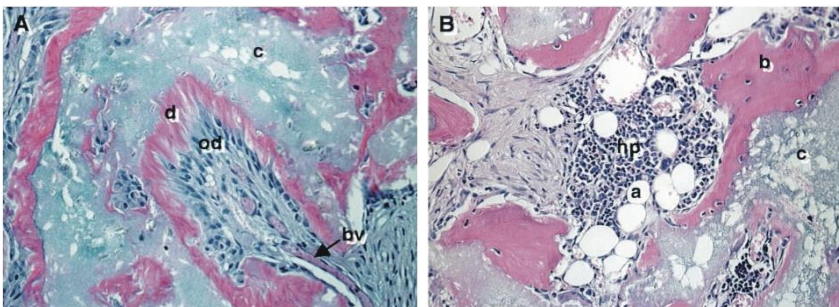


Figura 16. A: Muestra con DPSC; c: HA/TCP; d: matriz dentinaria; bv: vasos sanguíneos; od: células odontoblásticas. B: muestra con BMSC; b: hueso; c: HA/TCP; a: adipocitos; hp: tejido hematopoyético. De Gronthos et al., 2000.

Las DPSC han demostrado una gran capacidad de diferenciación en función del entorno biológico en el que se

han cultivado. Zhang y colaboradores publicaron en 2006 un estudio en el que observaron la diferenciación neuronal, osteogénica, condrogénica, muscular y adiposa de las DPSC. En la tabla 1 se refleja diferentes medios en los que se han cultivado las DPSC para inducir su diferenciación a distintos tipos celulares.

Diferenciación	Medio	Suero	Suplementos
Neurogénica	α -MEM	-	Mercaptoetanol 10 nM, dimetilsulfóxido al 2%, hidroxibutilanisol 200 μ M
Osteogénica	α -MEM	10% FCS	Fosfato potásico 5mM/L, dexametasona 0.1 μ M, ácido ascórbico 50 μ g/mL, gentamicina 50 μ g/mL
Adipogénica	α -MEM	10% FCS	Isobutil-metilxantina 0.5 mM, dexametasona 1 μ M, insulina 10 μ M, indometacina 200 μ M, gentamicina 50 μ g/mL
Miogénica	α -MEM	10% FCS	dexametasona 0.1 μ M, hidrocortisona 50 μ M, gentamicina 50 μ g/mL

Tabla 1. Se representan los diferentes suplementos añadidos al medio de cultivo para inducir la diferenciación de las DPSC. α -MEM: α - Minimum Essential Medium de Eagle. FCS: Suero fetal bovino. De Zhang et al., 2006.

La presencia de diferentes poblaciones de células madre en los distintos tejidos dentarios y peridentarios quedó patente en el estudio publicado por Jo y colaboradores

(2007). En este estudio, a partir de terceros molares incluidos extraídos por motivos ortodóncicos a individuos jóvenes (18-35 años), en los que la formación de la raíz no se había completado, se separaron los restos de tejido periodontal adherido a la raíz dentaria, la papila apical de la raíz en formación y el tejido pulpar de estos dientes. A partir de estos tejidos se consiguió aislar, cultivar y caracterizar las células madre del ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells* o PDLSC), de la papila apical (PAFSC) y de la pulpa dental (DPSC).

En la actualidad, la capacidad de las células madre para formar de nuevo los tejidos dentarios es uno de los aspectos que despierta más interés en su estudio.

Por ejemplo, Cordeiro y colaboradores en 2008, a partir de dientes caducos exfoliados, consiguieron aislar, cultivar y caracterizar las células madre de la pulpa dental de dientes deciduos (SHED), y estudiar su capacidad para regenerar el tejido pulpar sembradas con células endoteliales (HDMEC) en matrices de PLLA (ácido poliláctico) implantándolos en el dorso de ratones inmunodeprimidos. A los 14-28 días se observó un tejido similar a la pulpa dental, con una capa de células similares a odontoblastos en contacto con la preentina. En las muestras control (sólo SHED) se observó un tejido conjuntivo con algunas células

similares a odontoblastos, pero con un menor grado de diferenciación. Sin embargo, las muestras con SHED y HDMEC no presentaron un tejido con mayor densidad vascular capilar que las de SHED sólo (figura 18).

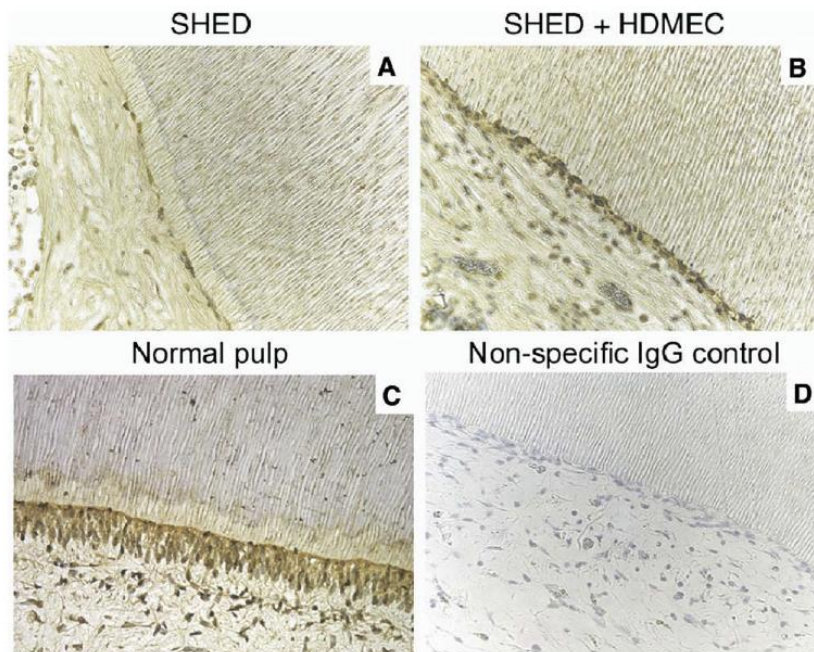


Figura 17. Organización de la capa de células odontoblásticas en las muestras y los controles. A: muestra con SHED; B: muestra con SHED y HDMEC; C: pulpa normal; D: muestra con SHED y HDMEC teñida con el anticuerpo inespecífico. Detección inmunohistoquímica de sialoproteína dentinaria. De Cordeiro et al., 2008.

Otro trabajo que demostró la potencialidad de las DPSC es el publicado por Ferroni y colaboradores en 2015. En él se cultivaron *in vitro* DPSC en matrices de hialuronato

impregnadas con factores inductores neurogénicos, gliales, endoteliales y osteogénicos, El análisis inmunohistoquímico de las muestras reveló que tras tres semanas de cultivo las DPSC expresaron marcadores celulares típicamente endoteliales, gliales, neuronales y osteo/odontogénicos, lo que confirmó la capacidad de las DSPC de diferenciarse hacia cualquiera de las principales tipos celulares que encontramos en el tejido conjuntivo pulpar.

Así pues, en los últimos años han sido múltiples los trabajos publicados en los que se ha estudiado el comportamiento en diferentes entornos biológicos de las células madre presentes en los tejidos dentarios y peridentarios y su capacidad para regenerar los tejidos dañados, así como distintas vías para inducir su diferenciación y estimular su actividad secretora.

Poder entender los mecanismos celulares implicados en los procesos de regeneración tisular del organismo es crucial para poder desarrollar alternativas terapéuticas seguras, predecibles y efectivas que nos permitan mejorar las empleadas actualmente en las patologías que afectan al diente y a los tejidos periodontales.

1.6. Hipótesis

Las células madre de la pulpa dental (DPSC) han demostrado, en los estudios en los que se han empleado, una gran capacidad proliferativa y la posibilidad de diferenciarse en distintos linajes celulares en función de las condiciones del cultivo, lo que las sitúa como una alternativa válida para la regeneración de diversos tejidos.

En el organismo los tejidos dentarios mineralizados, por su composición y estructura tridimensional, podrían actuar como agentes inductores de la proliferación y la diferenciación de las células madre presentes en los tejidos que los rodean, estimulando los procesos regenerativos cuando se produce un daño tisular.

En el presente trabajo hemos estudiado el comportamiento de las DPSC humanas en contacto con matrices tridimensionales de tejido dentario acelular y no desmineralizado, compuestas por dentina y cemento.

El propósito de la investigación fue valorar la capacidad inductora de la dentina y el cemento sobre la diferenciación de las DPSC humanas, así como la potencialidad de dichas células para diferenciarse en células formadoras de estos tejidos.

1.7. Objetivos

Para la realización de nuestro modelo experimental se han establecido los siguientes objetivos:

- I. Obtener, cultivar y caracterizar células madre de la pulpa dental (DPSC) humanas.
- II. Estudiar la proliferación, organización y diferenciación *in vitro* de las DPSC humanas en presencia de matrices de origen dentario.
- III. Desarrollar un protocolo de estudio y procesado de las muestras que nos permita el análisis a microscopía óptica y a microscopía electrónica de la proliferación y la diferenciación de las DPSC en contacto con las matrices dentarias.
- IV. Analizar la influencia sobre el comportamiento y la diferenciación de las DPSC del empleo de un medio de cultivo enriquecido con ácido ascórbico.
- V. Estudiar las consecuencias del tratamiento de la superficie de las matrices dentarias mediante hipoclorito sódico en la proliferación y diferenciación de las DPSC.

- VI. Valorar la proliferación y la diferenciación de las DPSC en función del tiempo que han sido cultivadas en presencia de matrices de origen dentario.

- VII. Analizar la influencia de la composición y la estructura tridimensional de las diferentes superficies que presentan las matrices dentarias sobre la proliferación y la diferenciación de la DPSC.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se emplearon dos poblaciones de células madre de la pulpa dental (DPSC), obtenidas cada una de ellas a partir del tejido conjuntivo pulpar de un tercer molar exodonciado diferente. Las muestras de tejido conjuntivo pulpar extraído de estos dos terceros molares se denominaron pulpa 1 y pulpa 2 respectivamente.

Las células obtenidas se cultivaron en presencia de matrices de origen dentario, realizándose estos cultivos en dos fases. En un primer estudio, denominado Estudio Preliminar, se hizo una primera aproximación en la que se probó una metodología y se estudiaron una serie de parámetros por primera vez.

Una vez analizados los resultados obtenidos en el Estudio Preliminar se realizó un nuevo estudio, denominado Ensayo Optimizado, donde se introdujeron algunas modificaciones en la metodología y en los parámetros estudiados con el fin de confirmar los hallazgos observados y optimizar los resultados obtenidos en el Estudio Preliminar.

Tanto en el Estudio Preliminar como en el Ensayo Optimizado la población de DPSC empleada en los cultivos celulares fue la obtenida a partir de la pulpa 1. Sin embargo

se llevó a cabo el proceso de obtención, cultivo y caracterización de las DPSC una segunda vez a partir de la pulpa 2, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos con la pulpa 1.

La caracterización mediante citometría de flujo de las células obtenidas de la primera muestra de tejido conjuntivo pulpar se realizó tras su crioconservación, mientras que la de la segunda se realizó antes de crioconservarlas. De esta manera se pudo comprobar si el proceso de crioconservación alteró o no su potencialidad y su expresión genética.

2.1. Células madre de la pulpa dental

2.1.1. Obtención

Para la obtención de las DPSC se extrajo el tejido pulpar de un tercer molar inferior exodonciado por motivos ortodóncicos de un varón de 32 años de edad. Se eligió esta pieza dentaria debido a que presenta con frecuencia una cámara pulpar muy voluminosa con gran cantidad de tejido conjuntivo de la pulpa dentaria y a que son piezas que se extraen habitualmente en la clínica dental. El tejido conjuntivo pulpar obtenido se denominó como pulpa 1.

Se obtuvo una segunda muestra de tejido conjuntivo pulpar a partir de un tercer molar superior extraído de un varón de 23 años, que fue denominada como pulpa 2.

El procedimiento seguido en ambos casos fue el mismo. Tras exodonciar el diente, se lavó la superficie de la corona y las raíces con suero fisiológico, eliminando los restos de sangre y saliva. Mediante una fresa fina de diamante y una turbina con refrigeración, se hizo un corte a nivel de la línea amelocementaria perpendicular al eje mayor del diente, sin llegar a alcanzar la cámara pulpar pero dejando un espesor fino de dentina remanente. Se separó la corona de la raíz mediante una gubia, con lo que quedó la cámara pulpar al

descubierto. El acceso a la cámara pulpar se completó eliminando los restos del techo de la cámara pulpar mediante una pinza. Utilizando una cucharilla y un tiranervios se extrajo el tejido pulpar de la cámara y los conductos pulpares (ver figura 18). El tejido pulpar obtenido se conservó en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) conteniendo estreptomicina y penicilina a 4°C hasta su procesado.



Figura 18. Obtención de la pulpa 18. A: tercer molar inferior exodonciado. B: se limpió la superficie de la corona y la raíz, y se realizó un corte transversal a la altura de la línea amelocementaria. C: se separó la corona del resto del diente, dejando al descubierto la cámara pulpar. D: se extrajo el tejido conjuntivo pulpar mediante una cucharilla.

Para aislar las DPSC se procesó el tejido pulpar siguiendo la siguiente secuencia. Se centrifugó la muestra (100×g, a 18°C, 10 minutos) y, realizando las manipulaciones en condiciones de asepsia dentro de una cabina de flujo laminar, se retiró el sobrenadante y se añadió a la muestra presente en el sedimento 1 mL de colagenasa tipo I (6 mg/mL en HBSS a 20°C) y 1 mL de dispasa (8 mg/mL en HBSS a 20°C), previamente esterilizadas por filtración. La suspensión se trasvasó a un tubo de 15 mL estéril y se incubó durante 60 minutos a 37°C, agitándolo ligeramente cada 15 minutos. Tras la incubación, la suspensión de la pulpa digerida se pasó por un filtro celular “*cell strainer*” de 70 µm de tamaño de poro con el fin de separar las células liberadas de los otros componentes fibrosos de la matriz conjuntiva. El material retenido en el filtro se lavó añadiendo medio de cultivo base, a fin de maximizar la cantidad de células recogidas en el fluido filtrado. La suspensión de células recogidas tras la filtración del tejido pulpar digerido se sembró en placas de 60 mm de diámetro a una dilución 1% en un volumen final de 4 mL de medio de cultivo. A continuación las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, saturada con vapor de agua (humedad relativa del 100%). El medio de cultivo se renovó cada 2-3 días, para eliminar los restos fibrosos y celulares necróticos presentes en las placas, así como mantener la

concentración óptima de los nutrientes necesarios para el crecimiento y la proliferación celular.

2.1.2. Cultivo

Las placas sembradas alcanzaron un 80-90% de estado de confluencia tras 12 días de incubación, momento en el cual se realizó el pase 1.

Tras retirar el medio de las placas, se les añadió 1.5 mL de tripsina-EDTA a cada una. Se retiró y se añadió 0.5 mL de tripsina-EDTA a cada pocillo, incubándose 3 minutos a 37°C. Las células resuspendidas se recogieron en 10 mL de medio de cultivo y se centrifugó la suspensión (100×g, a 18°C, durante 10 minutos). Tras retirar el sobrenadante, las células resuspendidas en nuevo medio se sembraron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro a una dilución 1/4.

Tras 7 días de cultivo, se realizó el pase 2 de la placa siguiendo el proceso anteriormente descrito para el pase 1. Las células resuspendidas se sembraron en placas de 100 mm a una dilución 1/4.

2.1.3. Caracterización celular

2.1.3.1. **Morfología**

El aspecto, adhesión y morfología de las células cultivadas se controló rutinariamente mediante microscopía de contraste de fases empleando un microscopio invertido.

2.1.3.2. **Citometría de flujo**

Se determinó la presencia de los siguientes marcadores mediante citometría de flujo (se especifica el fluoróforo conjugado al correspondiente anticuerpo utilizado): CD29 (Alexa Fluor® 488), CD31 (PE/Cy7), CD44 (PE/Cy5), CD45 (Pacific Blue™), CD105 (APC) y CD146 (PE).

Como controles negativos de los marcadores detectados (especificados entre paréntesis) se utilizaron los siguientes anticuerpos inespecíficos de ratón (todos del isotipo κ): IgG1 conjugado a Alexa Fluor® 488 (anti-CD29), IgG1 conjugado a PE/Cy7 (anti-CD31), IgG2b conjugado a PE/Cy5 (anti-CD44), IgG1 conjugado a Pacific Blue™ (anti-CD45), IgG1 conjugado a APC (anti-CD-105) e IgG2a conjugado a PE (anti-CD146).

2.1.4. Conservación

Alícuotas de células del pase 2 de las DPSC fueron crioconservadas. Para ello, las células de cultivos subconfluentes (al 90-95% de la densidad de confluencia) fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo según la secuencia anteriormente descrita. La suspensión se centrifugó a 100xg, a 18°C durante 10 minutos. El sedimento de células se resuspendió en 9 mL de suero fetal bovino conteniendo un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), a una densidad de 10⁶ células/mL y se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos de crioconservación de 1.5 mL. Los tubos se colocaron en un recipiente conteniendo isopropanol para facilitar la bajada gradual de la temperatura y se mantuvieron durante 36 horas en un congelador a -80°C. Finalmente las alícuotas se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido donde se mantuvieron hasta su uso.

2.2. Matrices de tejido dentario

A partir de dientes exodonciados, se obtuvieron fragmentos de tejido dentario que presentaban diferentes superficies de dentina y cemento dental. Los dientes seleccionados fueron dientes no endodonciados, con la cámara pulpar intacta, sin caries y con la corona y las raíces en buenas condiciones. Se utilizaron 6 incisivos inferiores, 2 premolares inferiores, 4 molares superiores y 3 molares inferiores.

Una vez exodonciado el diente, se conservó a 4°C en DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) conteniendo antibióticos (penicilina 100 u/mL, estreptomomicina 100 µg/mL) y Fungizona (0.25 µg/mL) hasta su procesado.

Para preparar las muestras de tejido dentario los dientes fueron lavados con una disolución de clorhexidina y se eliminaron los restos de ligamento periodontal, de placa bacteriana y cálculo dental que pudieran cubrir la raíz dentaria utilizando un aparato de ultrasonidos (Cavitron®) y una cureta Gracey 7/8 de periodoncia. Una vez hecho esto, mediante una pieza de mano y un disco diamantado se separó la corona de la raíz realizando un corte transversal a nivel de la línea amelocementaria. También se eliminaron los ápices realizando un corte transversal a 2 mm del extremo de cada raíz. Utilizando una fresa de diamante y

una turbina se completó el acceso a la cámara pulpar. Se eliminaron los restos de tejido conjuntivo pulpar mediante un tiranervios y limas de endodoncia de calibre 30 (figura 19).

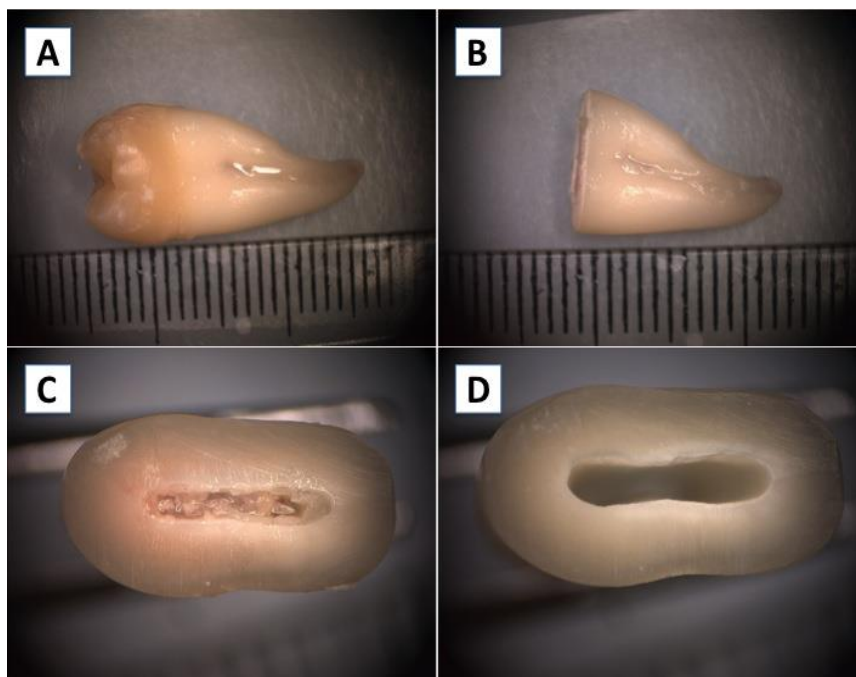


Figura 19. Preparación del diente para la obtención de las matrices dentarias. A: premolar superior exodonciado, en el que se han eliminado los restos de placa bacteriana, cálculo y ligamento periodontal de la superficie radicular. B: se separa la corona realizando un corte transversal a la altura de la línea amelocementaria. C: acceso a la cámara pulpar, donde se observa el tejido conjuntivo pulpar. D: tras limpiar la cámara pulpar y los conductos radiculares se ha procedido a eliminar todo el tejido conjuntivo pulpar.

Para eliminar los restos más finos de tejido pulpar así como la capa de predentina que recubre la cámara pulpar, se

realizó un proceso similar al de tratamiento de conductos. Comenzando con limas de endodoncia de calibre 15, con las que se recorrió todo el canal radicular hasta el ápice del diente, se fueron introduciendo secuencialmente limas de mayor calibre, ensanchando el canal radicular y eliminando el tejido que recubría las paredes. Para arrastrar los restos de tejido desprendido tras pasar cada lima, y según a qué grupo de estudio iban destinadas las muestras, se limpió irrigando con una disolución de hipoclorito sódico al 5.25% (matrices HS) o con una disolución de clorhexidina al 0.12% (matrices CL). Dependiendo del tamaño del conducto radicular del diente, se utilizaron limas con un calibre comprendido entre el 15 y el 40.

Una vez preparada la superficie dentinaria, se realizaron secciones de la raíz efectuando cortes cada 1-1.5 mm, perpendiculares al eje mayor de la raíz, mediante una pieza de mano y un disco diamantado. Las secciones resultantes fueron partidas en dos o tres fragmentos, en función de su tamaño, utilizando una gubia (figura 20).

Los fragmentos de tejido radicular fueron lavados durante 1 hora, las matrices HS con suero fisiológico y las matrices CL con solución de clorhexidina. Tras este tiempo, en el Estudio Preliminar las muestras empleadas se conservaron a 4°C en DPBS conteniendo antibióticos y Fungizona

durante 24 horas, mientras que en el Ensayo Optimizado las muestras empleadas fueron mantenidas a 4°C y lavadas 5 veces con DPBS conteniendo antibióticos y Fungizona, a lo largo de 72 horas.

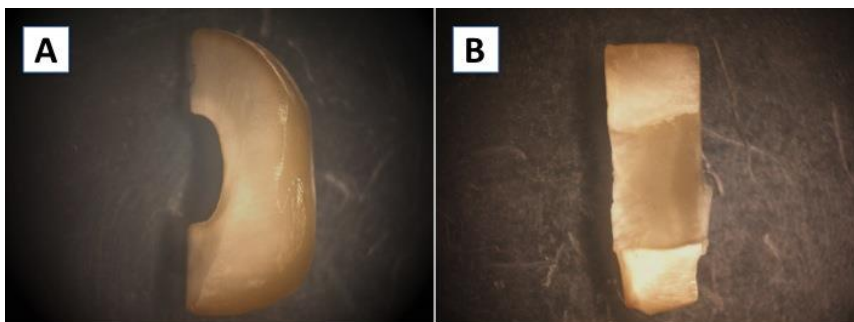


Figura 20. Obtención de las matrices dentarias. A: se realizaron secciones transversales de la raíz del diente preparado y se cortaron por la mitad. B: el grosor de estas secciones fue de 1-1.5 mm.

2.3. Cultivo de DPSC con muestras de tejido dentario

2.3.1. Estudio Preliminar

En este estudio se cultivaron DPSC con las matrices de tejido dentario obtenidas según el proceso descrito en el apartado anterior.

Se consideraron cuatro condiciones de cultivo diferentes:

- HS-s: DPSC cocultivadas con matrices de tejido dentario tratado con hipoclorito sódico (matrices HS), empleando medio de cultivo sin ácido ascórbico.
- CL-s: DPSC cocultivadas con matrices de tejido dentario tratado con clorhexidina (matrices CL), empleando medio de cultivo sin ácido ascórbico.
- HS-aa: DPSC cocultivadas con matrices de tejido dentario tratado con hipoclorito sódico (matrices HS), empleando medio de cultivo enriquecido con ácido ascórbico.
- CL-aa: DPSC cocultivadas con matrices de tejido dentario tratado con clorhexidina (matrices CL), empleando medio de cultivo enriquecido con ácido ascórbico.

Cada uno de los grupos constó de 32 muestras, las cuales a su vez se separaron en cuatro subgrupos de 8 réplicas cada uno en función del tiempo que se mantuvieron en cultivo: 1 semana, 2 semanas, 4 semanas y 6 semanas. En total se procesaron, por tanto, 128 muestras.

Para realizar los cultivos se emplearon placas de 24 pocillos, colocándose en cada una de ellas dos subgrupos de 8 muestras (ver tabla 2).

	Tiempo de cultivo (semanas)	HS-s	CL-s	HS-aa	CL-aa
Placa 1	1	8	8		
Placa 2	1			8	8
Placa 3	2	8	8		
Placa 4	2			8	8
Placa 5	4	8	8		
Placa 6	4			8	8
Placa 7	6	8	8		
Placa 8	6			8	8

Tabla 2. Se muestra el número y el tipo de muestras dispuestas en cada una de las placas utilizadas.

El medio de cultivo utilizado en esta fase del estudio fue el siguiente:

- **Grupos HS-s y CL-s:** α -MEM enriquecido con suero fetal bovino (FCS) al 10%, glutamina (2 mM),

penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y fungizona (0.25 µg/mL).

- **Grupos HS-aa y CL-aa:** α-MEM enriquecido con FCS al 10%, glutamina (2 mM), ácido ascórbico (ácido-L-ascórbico-2-fosfato) (100 µM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y fungizona (0.25 µg/mL).

Tras descongelar las DPSC, se mantuvieron 7 días en cultivo. Una vez las DPSC alcanzaron una densidad del 90-95% de la confluencia, se procedió al sembrado de las placas del estudio.

Las células se resuspendieron mediante tripsinización, se estimó la densidad de la suspensión celular mediante conteo de una alícuota con un hemocitómetro y se diluyeron con el medio de cultivo de forma que en cada pocillo se depositaron 1.5 mL conteniendo un total de 5000 células aproximadamente. Las placas se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, saturada con vapor de agua (humedad relativa del 100%). El medio de cultivo se renovó cada 2/3 días.

Al finalizar el tiempo de cultivo establecido para cada uno de los subgrupos de 8 muestras, 6 de ellas se fijaron con formaldehído para su estudio a microscopia óptica y las otras 2 con glutaraldehído para su análisis ultraestructural.

En cada uno de los tiempos establecidos (1, 2, 4 y 6 semanas) cada una de las muestras que se mantuvieron en cultivo fue clasificada en función de la proliferación celular y la interacción de las DPSC con las matrices dentarias en una de las siguientes 5 categorías:

- M: Cuando la proliferación celular observada fue muy baja y únicamente se observaban células aisladas o en pequeños grupos.
- R: Cuando la proliferación celular observada fue moderada, sin que las células alcanzasen a contactar con la superficie de la matriz dentaria.
- B: Cuando la proliferación celular observada fue buena, llegando las células a contactar con la superficie de la matriz dentaria.
- MB: Cuando la proliferación celular observada fue muy buena, formando las células capas sobre alguna de las superficies de la matriz dentaria.
- E: Cuando la proliferación celular observada fue muy buena, llegando las células a formar múltiples capas celulares que envolvían por completo la matriz dentaria.

2.3.2. Ensayo Optimizado

Tras analizar los resultados obtenidos en el Estudio Preliminar, se realizó un nuevo estudio en el que se

optimizaron los procedimientos y la metodología empleados.

En este estudio se cultivaron nuevamente DPSC con matrices de tejido dentario obtenidas según el proceso descrito en el apartado anterior.

Se realizaron dos grupos de cultivos diferentes:

- HS: DPSC cocultivadas con matrices de tejido dentario tratado con hipoclorito sódico (matrices HS), empleando medio de cultivo enriquecido con ácido ascórbico.
- CL: DPSC cocultivadas con matrices de tejido dentario tratado con clorhexidina (matrices CL), empleando medio de cultivo enriquecido con ácido ascórbico.

De cada uno de los grupos se cultivaron 64 muestras, las cuales a su vez se separaron en cuatro subgrupos de 16 réplicas cada uno en función del tiempo que se mantuvieron en cultivo: 1 semana, 2 semanas, 4 semanas y 6 semanas. En total se procesaron, por tanto, 128 muestras.

Para realizar los cultivos se emplearon placas de 24 pocillos, colocándose en cada una de ellas un subgrupos de 16 muestras (ver tabla 3).

El medio de cultivo utilizado en todas las muestras fue: α -MEM enriquecido con FCS al 10%, glutamina (2 mM), ácido ascórbico (ácido-L-ascórbico-2-fosfato) (100 μ M), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 μ g/mL) y fungizona (0.25 μ g/mL).

Tras descongelar las DPSC, se mantuvieron 7 días en cultivo. Una vez las DPSC alcanzaron una densidad del 90-95% de la confluencia, se procedió al sembrado de las placas del ensayo empleando un protocolo análogo al descrito en el apartado anterior.

	Tiempo de cultivo (semanas)	HS	CL
Placa 1	1	16	
Placa 2	1		16
Placa 3	2	16	
Placa 4	2		16
Placa 5	4	16	
Placa 6	4		16
Placa 7	6	16	
Placa 8	6		16

Tabla 3. Se muestra el número y el tipo de muestras colocadas en cada una de las placas utilizadas.

Al finalizar el tiempo de cultivo establecido para cada uno de los subgrupos de 16 muestras, 12 de ellas se fijaron con formaldehído para el análisis a microscopía óptica y las

otras 4 con glutaraldehído para su posterior estudio a microscopía electrónica.

Al igual que en el Estudio Preliminar, en cada uno de los tiempos establecidos (1, 2, 4 y 6 semanas) se empleó el mismo sistema de clasificación (M, R, B, MB y E) para valorar la proliferación celular y la interacción de las DPSC con las matrices dentarias en cada una de las muestras que se mantuvieron en cultivo.

2.4. Estudio a microscopía óptica

Al finalizar el tiempo de cultivo establecido para cada uno de los subgrupos, una parte de las muestras se procesaron para su estudio a microscopía óptica. En el Estudio Preliminar, de cada subgrupo de 8 muestras se procesaron 6, mientras que en el Ensayo Optimizado, de cada subgrupo de 16 muestras se procesaron 12.

Para ello, se lavaron con PBS durante 1 minuto y se fijaron con formaldehído comercial durante 3 horas a 4°C. A continuación las muestras se descalcificaron introduciéndolas en una mezcla de Osteosoft (90%) y formaldehído comercial (10%) durante 21 días. Los procesos de fijado y descalcificación de las muestras se realizaron en el propio pocillo donde se realizó el cultivo.

Tras este tiempo las muestras se sacaron de los pocillos de cultivo, se deshidrataron, y se incluyeron en parafina para la realización de cortes seriados con el micrótopo.

Los cortes del micrótopo se colocaron en portas y se tiñeron con hematoxilina-eosina, con tricrómico de Masson o con la técnica del ácido periyódico de Schiff (PAS), siguiendo el protocolo convencional.

Para la detección inmunohistoquímica se empleó el kit Universal LSABtm 2/HRP y el anticuerpo primario anti-DSPP, según las instrucciones recomendadas por el fabricante. Así, los cortes del micrótopo se colocaron en los portas, se trataron con disolución para bloqueo de la peroxidasa endógena durante 10 minutos mediante la disolución suministrada en el kit, se incubaron con el anticuerpo primario anti-DSPP (a dilución 1/50 sobre la concentración suministrada por la casa comercial) durante 16 horas en cámara húmeda, se lavaron con TBS (*Tris-Buffered Saline*), se incubaron con el anticuerpo secundario (streptavidin-HRP) durante 30 minutos, se lavaron con TBS, se incubaron con el sustrato-cromógeno DAB (diaminobencidina) durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con hematoxilina ácida. Todo el protocolo se llevó a cabo a temperatura ambiente.

2.5. Estudio a microscopía electrónica de transmisión (MET)

Al finalizar el tiempo de cultivo establecido para cada uno de los subgrupos, una parte de las muestras se procesaron para su estudio a microscopía electrónica de transmisión. En el Estudio Preliminar, de cada subgrupo de 8 muestras se procesaron 2, mientras que en el Ensayo Optimizado, de cada subgrupo de 16 muestras se procesaron 4.

Para ello, se lavaron con PBS durante 1 minuto y se fijaron con glutaraldehído durante 3 horas a 4°C. A continuación las muestras se descalcificaron introduciéndolas en EDTA al 4% durante 21 días. Los procesos de fijado y descalcificación de las muestras se realizaron en el propio pocillo donde se realizó el cultivo.

Tras este tiempo las muestras se retiraron de los pocillos y se lavaron durante 48 horas a 4°C con una disolución compuesta por tampón Milloning (90%), cloruro cálcico (9%) y glucosa (1%). A continuación se fijaron con tetraóxido de osmio al 2% durante 2 horas a 4°C, tras lo cual fueron deshidratadas mediante acetonas de concentración creciente, e incluidas en bloques de resina Epon calentando la muestra durante 24 horas a 40°C y otras 24 horas a 60°C.

Tras su inclusión en resina Epon, las muestras se dejaron enfriar varios días hasta la realización de los cortes semifinos y ultrafinos.

Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina y los ultrafinos, siguiendo el protocolo convencional, con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio JEOL JEM 1010 a 60 kV.

2.6. Materiales y reactivos empleados

2.6.1. Obtención y cultivo de las DPSC

Para la conservación y procesado de las muestras de tejido pulpar, así como para la obtención y posterior cultivo de las DPSC, los productos utilizados fueron los siguientes:

- α - *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) enriquecido con suero fetal bovino (FCS) (10%), L-glutamina (2mM), penicilina y estreptomina (penicilina 100 u/mL; estreptomina 100 μ g/mL), Fungizona® (anfotericina B, 0.25 μ g/mL), tripsina-EDTA (1x) 0.25%, *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) y *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) de Gibco® - Life Technologies™.
- Ácido ascórbico (ácido-L-ascórbico-2-fosfato) y dimetil sulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich.
- Colagenasa tipo I y dispasa de Boehringer.
- El material estéril de plástico desechable empleado en los cultivos celulares (placas y placas multipocillos de cultivos tratadas para favorecer la adherencia de las células, tubos, pipetas serológicas y puntas de pipetas automáticas con filtro) fue de Corning.

- Los filtros celulares, *cell strainer*, fueron suministrados por Becton Dickinson (BD).

El medio base empleado para la obtención y el cultivo de las DPSC fue el siguiente: α -MEM enriquecido con FCS (10%), glutamina (2mM), penicilina (100 μ M) y estreptomycin (100 μ g/mL), y Fungizona (0.25 μ g/mL).

2.6.2. Caracterización de las DPSC

Para la citometría de flujo los antígenos estudiados como marcadores de células madre humanas fueron los siguientes (se indica tras cada uno el fluoróforo al que estaba conjugado el correspondiente anticuerpo): CD29 (Alexa Fluor® 488), CD31 (PE/Cy7), CD44 (PE/Cy5), CD45 (Pacific Blue™), CD105 (APC) y CD146 (PE).

Para estimar la posible unión inespecífica de los anticuerpos anteriores se utilizaron las siguientes inmunoglobulinas como controles (todos del isotipo *k*): IgG1 conjugado a Alexa Fluor® 488 (anti-CD29), IgG1 conjugado a PE/Cy7 (anti-CD31), IgG2b conjugado a PE/Cy5 (anti-CD44), IgG1 conjugado a Pacific Blue™ (anti-CD45), IgG1 conjugado a APC (anti-CD-105) e IgG2a conjugado a PE (anti-CD146).

Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BioLegend.

2.6.3. Obtención de las matrices de tejido dentario

Para obtener y acondicionar las matrices utilizadas como andamiaje se emplearon las siguientes disoluciones:

- Perio-aid® (Clorhexidina 0.12%) de Dentaaid.
- Hipoclorito sódico (NaClO) al 5.25% de Dentaflux.

2.6.4. Procesado de las muestras para su estudio microscópico

Como paso previo al procesado histológico habitual, las muestras fueron desmineralizadas empleando las siguientes disoluciones:

- Titriplex III (EDTA), de Merck.
- Osteosoft® de Merck.

En el procesado de las muestras para su estudio a microscopía electrónica de transmisión, se emplearon las siguientes disoluciones:

- Tampón Milloning: fosfato monosódico al 2.26% e hidróxido de sodio al 2.52%.
- Kit de resina Epon Poly/Bed®812 *Embedding Media*//DMP-30 de Polysciences, Inc.

- Tetraóxido de osmio de Electron Microscopy Sciences.

Para la realización de las técnicas de detección inmunohistoquímica se emplearon los siguientes productos:

- Anticuerpo anti-DSPP de Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Kit Universal LSABtm 2/HRP, Rabbit/Mouse de Dako.

El resto de reactivos empleados fueron del grado de pureza adecuado para el uso empleado y obtenidos de casas comerciales reconocidas.

3. RESULTADOS

3.1. Células madre de la pulpa dental (DPSC)

3.1.1. Obtención y sembrado inicial

Tal y como se describe en Material y Métodos, las células obtenidas tras el procesado de la muestra de tejido conjuntivo de la pulpa dentaria fueron sembradas en placas de 6 pocillos.

A las 24 horas tras el sembrado, se observaron células adheridas al fondo de la placa aisladas o en pequeños grupos, con morfología típicamente fibroblástica, además de células no adheridas, esféricas, y algunos restos tisulares.

A las 48 horas de incubación se comenzó a observar cierta proliferación celular, y a partir de los 5 días de incubación comenzaron a distinguirse las primeras colonias formadas por varias decenas de células con un aspecto homogéneo.

A los 12 días de incubación las células alcanzaron un 80-90% de confluencia, momento en el que se realizó el pase 1 según el proceso anteriormente descrito en el capítulo de Material y Métodos.

3.1.2. Cultivo

Tras el pase 1 las células mostraron una gran capacidad de proliferación. Las células subcultivadas a una dilución 1/4 alcanzaron un 90% de la densidad de confluencia ($1-1.2 \times 10^5$ células/cm²) a los 5 días de cultivo.

3.1.3. Caracterización

3.1.3.1. Morfología

Tras los primeros días de cultivo de las células obtenidas a partir de la muestra de tejido pulpar, se observaron poblaciones homogéneas de células cuya morfología y comportamiento coincidían con los descritos para las DPSC. Así, las células subconfluentes presentaron un aspecto fusiforme típicamente mesenquimático, un núcleo voluminoso y centrado con abundante cromatina dispersa, y una morfología citoplasmática irregular con múltiples y cortas expansiones. Además mostraron gran capacidad de adherencia a la superficie de la placa y una elevada tasa de proliferación (figura 21).

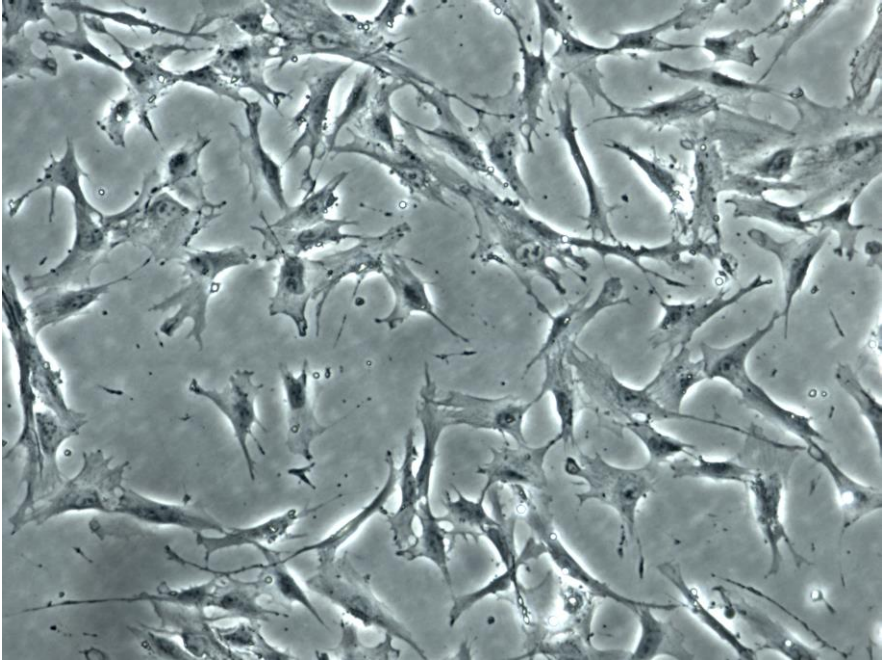


Figura 21. DPSC procedentes de la pulpa 1 tras cinco días de cultivo. Las células se adhieren a la superficie de la placa y proliferan activamente presentando una morfología típicamente mesenquimática. Microscopio invertido de contraste de fases, 40x.

3.1.3.2. Citometría de flujo

Se caracterizaron mediante citometría de flujo las células obtenidas tras el pase 8, después de haber sido sometidas al proceso de crioconservación y su posterior descongelación previos a la realización del presente trabajo. Esta población

fue denominada como pulpa 1. A su vez, también se caracterizó mediante citometría de flujo una segunda población de células obtenidas tras el procesado de otra muestra diferente de tejido conjuntivo de la pulpa dentaria (denominada como pulpa 2), tras su pase 2 y que no fueron sometidas al proceso de crioconservación, con el objetivo de comprobar si las DPSC tras la crioconservación seguían manteniendo la expresión de marcadores descritos para estas células.

Se estudiaron los marcadores CD29, CD44, CD105 y CD146, asociados a células madre mesenquimales, así como el marcador CD31, asociado a células endoteliales y de la estirpe hematopoyética, y CD45, asociado a leucocitos.

Los resultados de la citometría de flujo mostraron que más del 95% de las células estudiadas presentaron unión a los anticuerpos específicos de los marcadores CD29, CD44, CD105 y CD146, mientras que fue minoritario el número de células que exhibieron unión a los marcadores CD31 y CD45 (tabla 4).

	CD29	CD44	CD105	CD146	CD31	CD45
Pulpa 1	97.74 %	98.13 %	96.44 %	97.58 %	0.16 %	0.27 %
Pulpa 2	98.34 %	99.14 %	94.82 %	98.45 %	0,14%	0.50 %

Tabla 4. Se muestra el porcentaje de células que presentaron unión del anticuerpo específico de cada uno de los marcadores celulares indicados.

Además, las células analizadas no presentaron unión a los anticuerpos inespecíficos empleados como control dirigidos frente a antígenos irrelevantes (tabla 5).

	Control anti-CD29	Control anti-CD44	Control anti-CD105	Control anti-CD146	Control anti-CD31	Control anti-CD45
Pulpa 1	99.74 %	99.01 %	98.69 %	99.28 %	99.09 %	99.64 %
Pulpa 2	99.44 %	98.78 %	99.50 %	99.19 %	98.84 %	99.60 %

Tabla 5. Se muestra el porcentaje de células que no presentaron unión a cada uno de los anticuerpos inespecíficos empleados como control.

Los resultados de la citometría de flujo mostraron que no existían diferencias significativas en la expresión de los marcadores estudiados entre las poblaciones celulares obtenidas a partir de las dos muestras de tejido conjuntivo pulpar procesados, lo que supone que esta expresión se mantuvo tras la crioconservación y al menos hasta el pase 8.

En las gráficas que se muestran a continuación se representan las células de las poblaciones estudiadas, colocadas en relación con el sistema de coordenadas en función de si presentaron o no interacción con los anticuerpos específicos e inespecíficos (empleados como control) de los marcadores celulares estudiados (figuras 22 y 23).

Figura 22. Análisis mediante citometría de flujo de las células de la pulpa 1. Panel A: en cada una de las gráficas cada punto representa una célula (evento) de la que se deduce la intensidad de fluorescencia debida a la unión del anticuerpo específico del marcador correspondiente (eje de ordenadas) y la intensidad de fluorescencia debida a la unión del anticuerpo específico del marcador CD45 (eje de abscisas). Panel B: en cada una de las gráficas cada punto representa una célula (evento) de la que se deduce la intensidad de fluorescencia debida a la unión del anticuerpo inespecífico empleado como control del marcador correspondiente (eje de ordenadas) y la intensidad de fluorescencia debida a la unión del anticuerpo inespecífico conjugado al fluoróforo Pacific Blue, empleado como control del marcador CD45 (eje de abscisas). →

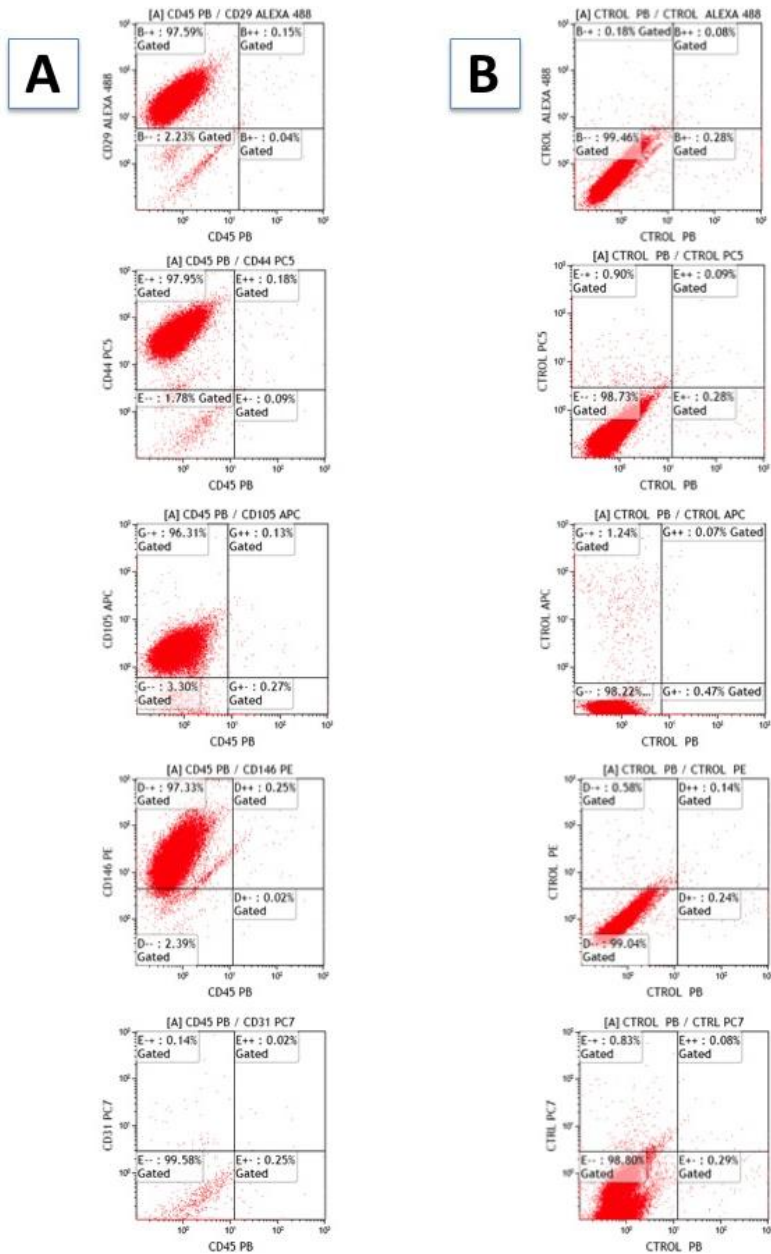


Figura 22. Ver leyenda en página anterior.

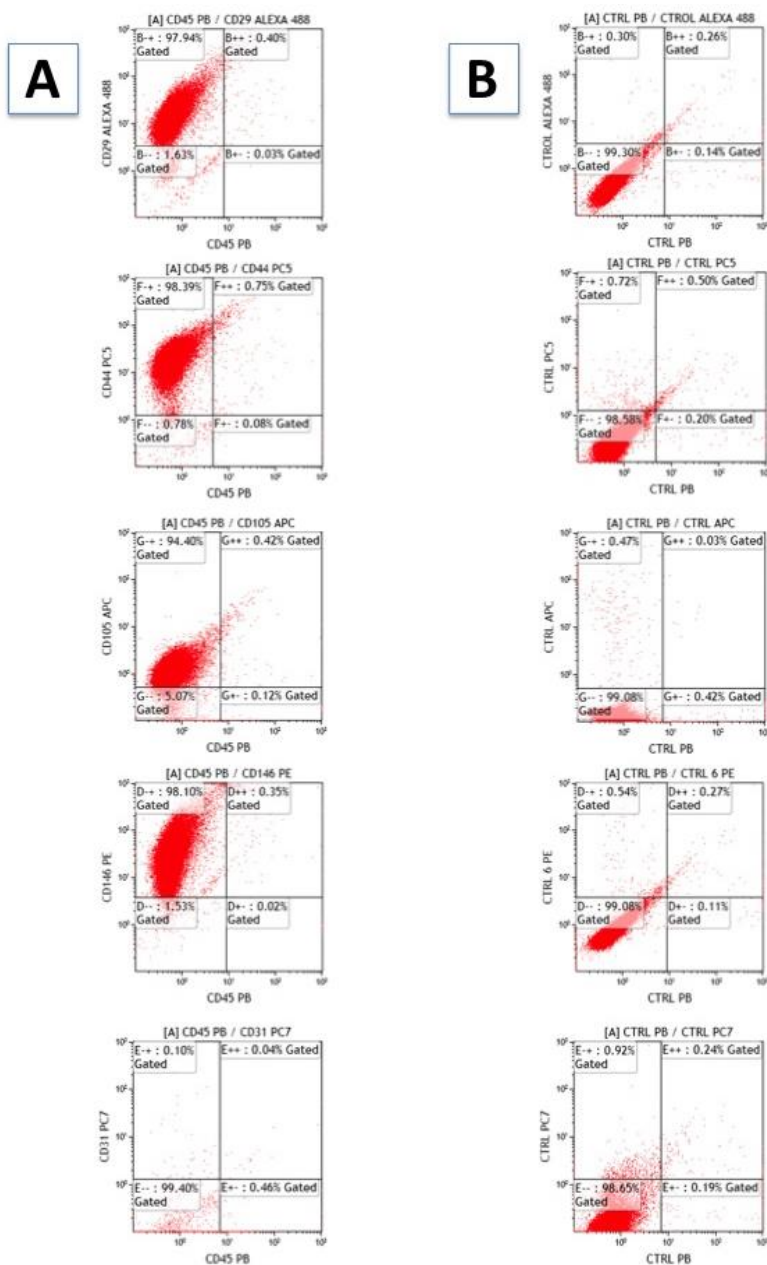


Figura 23. Análisis mediante citometría de flujo de las células de la pulpa 2. Ver la leyenda de la Figura 22 relativa a la descripción de las gráficas de los paneles A y B.

3.2. Cultivo de DPSC con matrices de tejido dentario

3.2.1. Estudio Preliminar

3.2.1.1. Proliferación

Tras una semana de cultivo, las DPSC sembradas con las matrices dentarias en los diferentes pocillos presentaron una proliferación desigual (tabla 6). Tanto de las muestras del grupo HS-aa (cultivo con ácido ascórbico sobre matrices tratadas con hipoclorito sódico), como de las del grupo HS-s (cultivo sin ácido ascórbico sobre matrices tratadas con hipoclorito sódico) solo un 3.1% mostraron una muy buena proliferación (MB), llegando las células a formar capas sobre la matriz dentaria, mientras que de los grupos CL-aa (cultivo con ácido ascórbico sobre matrices tratadas con clorhexidina) y CL-s (cultivo sin ácido ascórbico sobre matrices tratadas con clorhexidina) fueron un 28.1% y un 25.0% respectivamente los que alcanzaron dicho grado de proliferación (figura 24, C y D).

En cuanto a las muestras que mostraron una buena proliferación celular y en las que las células llegaron a contactar con la matriz dentaria pero sin formar capas celulares (B), en los grupos HS-aa y HS-s fueron el 12.5% y

el 6.3% respectivamente, mientras que en los grupos CL-aa y CL-s fueron el 15.6% y el 21.9% respectivamente.

En relación a las muestras que mostraron una proliferación celular moderada y en las que las células no llegaron a contactar con la matriz dentaria (R), en los grupos HS-aa y HS-s fueron el 40.6% y 46.9% respectivamente (figura 24, A y B), mientras que en los grupos CL-aa y CL-s fueron el 21.9% y el 28.1% respectivamente.

Grupo	n	M		R		B		MB		E	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HS-aa	32	14	43.8	13	40.6	4	12.5	1	3.1	0	0
HS-s	32	14	43.8	15	46.9	2	6.3	1	3.1	0	0
CL-aa	32	11	34.4	7	21.9	5	15.6	9	28.1	0	0
CL-s	32	8	25	9	28.1	7	21.9	8	25	0	0

Tabla 6. Proliferación celular en el Estudio Preliminar tras una semana de cultivo. HS-aa y HS-s: cultivos en medio con o sin ácido ascórbico, respectivamente, sobre matrices tratadas con NaClO; CL-aa y CL-s: cultivos en medio con o sin ácido ascórbico, respectivamente, sobre matrices tratadas con clorhexidina; M: muestras con baja proliferación celular; R: muestras con proliferación celular intermedia y en las que las células no contactan con la matriz dentaria; B: muestras con buena proliferación celular y en las que las células contactan con la matriz dentaria; MB: muestras con muy buena proliferación celular y en las que las células forman capas sobre la matriz dentaria; E: muestras con muy buena proliferación celular y en las que las células envuelven por completo la matriz dentaria. n: número de muestras.

Las muestras que mostraron una baja proliferación celular (M), tanto en el grupo HS-aa como en el HS-s fueron un 43.8%, mientras que en los grupos CL-aa y CL-s fueron un 34.4% y un 25.0% respectivamente.

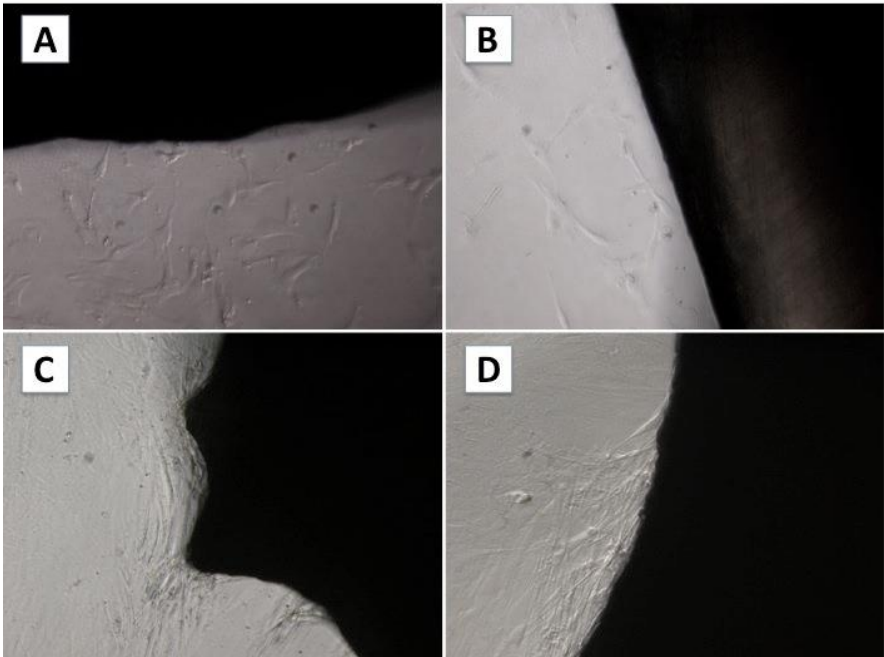


Figura 24. Muestras tras una semana de cultivo. Muestras del grupo HS-aa (A) y del grupo HS-s (B), clasificadas como R (20x). Muestra del grupo CL-aa (C) y del grupo CL-s (D), clasificadas como MB (10x). Microscopio invertido de contraste de fases.

Tras dos semanas de cultivo, en los grupos CL-aa y CL-s encontramos que un 58.3% y un 54.2% de las muestras, respectivamente, mostraron una muy buena proliferación

celular (MB), formando las células capas sobre la superficie dentaria (figura 25, C y D), mientras que en los grupos HS-aa y HS-s solo se observó este comportamiento en el 33.3% y en el 25.0% de las muestras, respectivamente (figura 25, A y B).

Las muestras que presentaron una buena proliferación celular y en las que las células llegaron a contactar con la matriz dentaria pero sin formar capas celulares (B), en los grupos HS-aa y HS-s fueron el 25.0% y el 29.2%, mientras que en los grupos CL-aa y CL-s fueron el 4.2% y el 16.7%, respectivamente.

En cuanto a las muestras que mostraron una moderada (R) o baja proliferación celular (M), en el grupo HS-aa fueron en ambos casos el 20.8%, en el HS-s fueron el 29.2% y el 16.7%, en el CL-aa fueron el 16.7% y el 20.8%, y en el CL-s fueron el 4.2% y el 25.0% respectivamente (tabla 7).

Grupo	n	M		R		B		MB		E	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HS-aa	24	5	20.8	5	20.8	6	25	8	33.3	0	0
HS-s	24	4	16.7	7	29.2	7	29.2	6	25	0	0
CL-aa	24	5	20.8	4	16.7	1	4.2	14	58.3	0	0
CL-s	24	6	25	1	4.2	4	16.7	13	54.2	0	0

Tabla 7. Proliferación celular en el Estudio Preliminar a las dos semanas de cultivo. El significado de las abreviaturas está descrito en la leyenda de la tabla 6.

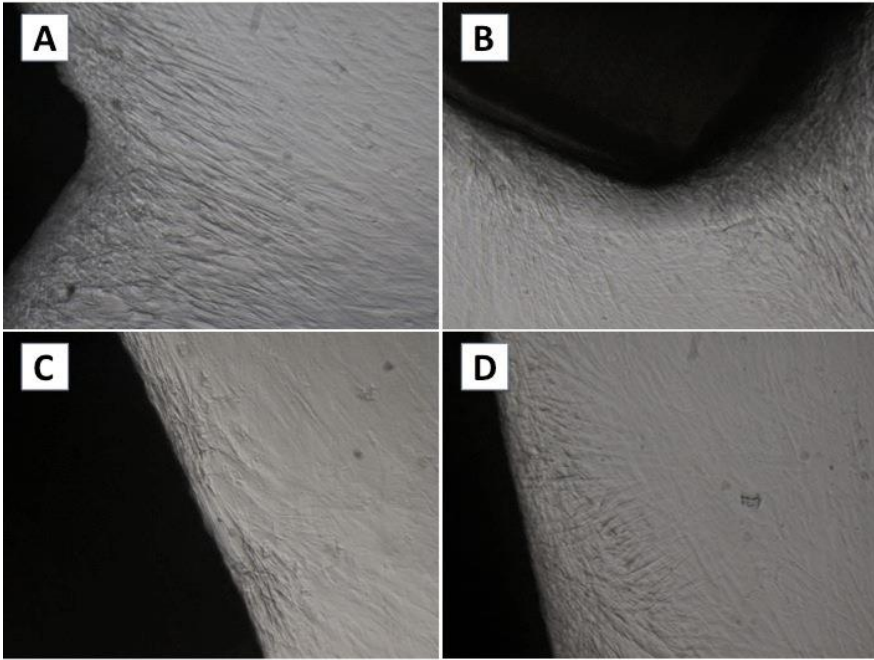


Figura 25. Muestras tras dos semanas de cultivo. Muestras del grupo HS-aa (A), del grupo HS-s (B), del grupo CL-aa (C) y del grupo CL-s (D), todas clasificadas como MB. Microscopio invertido de contraste de fases, 10x.

Tras cuatro semanas de cultivo, la proliferación celular observada en las muestras del grupo HS-aa fue en un 25.0% buena, llegando las células a contactar con la matriz dentaria, en un 56.3% muy buena llegando las células a formar capas sobre la matriz (figura 26A), y en un 18.8% las células presentaron una gran proliferación envolviendo completamente la matriz. Las muestras del grupo HS-s presentaron globalmente una menor proliferación que el grupo HS-aa. Así, un 12.5% presentaron una proliferación moderada, sin llegar las células a contactar con la matriz, un

37.5% una buena proliferación, un 43.8% una muy buena proliferación (figura 26B) y en un 6.3% las células llegaron a envolver totalmente la matriz.

Las muestras de los grupos CL-aa y CL-s mostraron globalmente una proliferación mayor que los grupos anteriormente descritos, pues en el 25.0% y en el 18.8% de las muestras, respectivamente, las células llegaron a envolver totalmente la matriz dentaria. En estos grupos el 68.8% y el 62.5%, respectivamente, mostraron una proliferación muy buena formando las células capas sobre la matriz (figura 26, C y D), y sólo un 6.3% en ambos grupos presentó una proliferación moderada sin llegar las células a contactar con la matriz dentaria (tabla 8).

Grupo	n	M		R		B		MB		E	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HS-aa	16	0	0	0	0	4	25	9	56.3	3	18.8
HS-s	16	0	0	2	12.5	6	37.5	7	43.8	1	6.3
CL-aa	16	0	0	1	6.3	0	0	11	68.8	4	25
CL-s	16	0	0	1	6.3	2	12.5	10	62.5	3	18.8

Tabla 8. Proliferación celular en el Estudio Preliminar a las cuatro semanas de cultivo. El significado de las abreviaturas está descrito en la tabla 6.

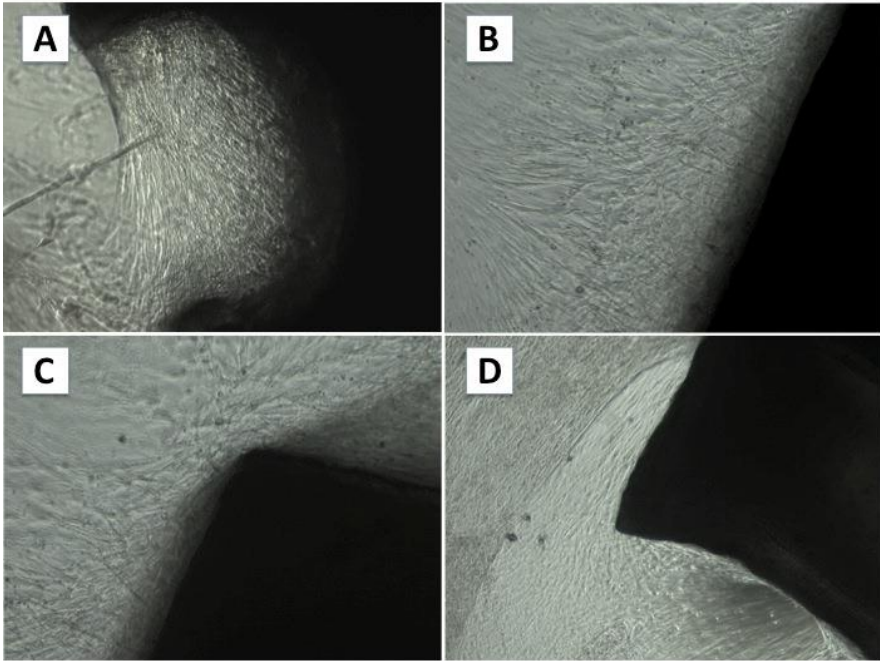


Figura 26. Muestras tras cuatro semanas de cultivo. Muestras del grupo HS-aa (A), del grupo HS-s (B), del grupo CL-aa (C) y del grupo CL-s (D), todas clasificadas como MB. Microscopio invertido de contraste de fases, 10x.

Tras seis semanas de cultivo, todas las muestras de los cuatro grupos mostraron una proliferación muy buena, formando las DPSC capas sobre la matriz dentaria. De los grupos HS-aa y CL-aa, en el 75.0% de las muestras las células proliferaron llegando a envolver completamente la matriz dentaria (figura 27, A y C), mientras que en los grupos HS-s y CL-s, fue en el 50.0% y el 62.5% de las muestras, respectivamente (figura 27, B y D), (tabla 9).

Grupo	n	M		R		B		MB		E	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HS-aa	8	0	0	0	0	0	0	2	25	6	75
HS-s	8	0	0	0	0	0	0	4	50	4	50
CL-aa	8	0	0	0	0	0	0	2	25	6	75
CL-s	8	0	0	0	0	0	0	3	37.5	5	62.5

Tabla 9. Proliferación celular en el Estudio Preliminar a las seis semanas de cultivo. El significado de las abreviaturas está descrito en la tabla 6.

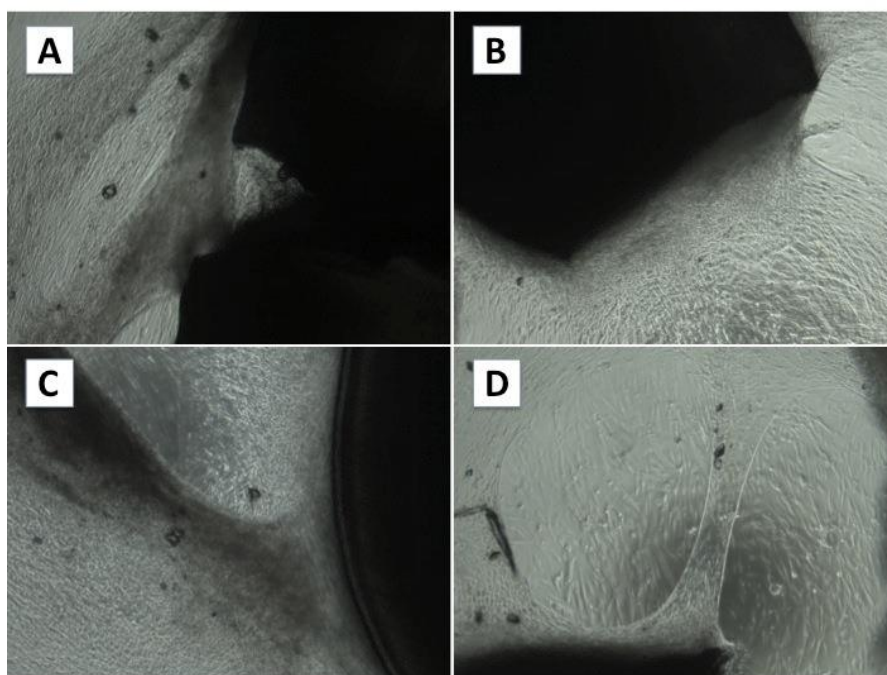


Figura 27. Muestras tras seis semanas de cultivo. Muestras del grupo HS-aa (A), del grupo HS-s (B), del grupo CL-aa (C) y del grupo CL-s (D), todas clasificadas como E. Microscopio invertido de contraste de fases, 10x.

Con el fin de facilitar la visión en su conjunto de los resultados descritos anteriormente, a continuación se incluye una tabla comparativa donde se refleja la proliferación celular

observada durante el Estudio Preliminar en los diferentes grupos de muestras estudiados (tabla 10).

Tiempo de cultivo	Grupo	n	M		R		B		MB		E	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 semana	HS-aa	32	14	43.8	13	40.6	4	12.5	1	3.1	0	0
	HS-s	32	14	43.8	15	46.9	2	6.3	1	3.1	0	0
	CL-aa	32	11	34.4	7	21.9	5	15.6	9	28.1	0	0
	CL-s	32	8	25.0	9	28.1	7	21.9	8	25.0	0	0
2 semanas	HS-aa	24	5	20.8	5	20.8	6	25.0	8	33.3	0	0
	HS-s	24	4	16.7	7	29.2	7	29.2	6	25.0	0	0
	CL-aa	24	5	20.8	4	16.7	1	4.2	14	58.3	0	0
	CL-s	24	6	25.0	1	4.2	4	16.7	13	54.2	0	0
4 semanas	HS-aa	16	0	0	0	0	4	25.0	9	56.3	3	18.8
	HS-s	16	0	0	2	12.5	6	37.5	7	43.8	1	6.3
	CL-aa	16	0	0	1	6.3	0	0	11	68.8	4	25.0
	CL-s	16	0	0	1	6.3	2	12.5	10	62.5	3	18.8
6 semanas	HS-aa	8	0	0	0	0	0	0	2	25.0	6	75.0
	HS-s	8	0	0	0	0	0	0	4	50.0	4	50.0
	CL-aa	8	0	0	0	0	0	0	2	25.0	6	75.0
	CL-s	8	0	0	0	0	0	0	3	37.5	5	62.5

Tabla 10. Proliferación celular en el Estudio Preliminar en todos los tiempos estudiados. El significado de las abreviaturas está descrito en la leyenda de la tabla 6.

Al analizar globalmente estos resultados se observó que inicialmente en las muestras tratadas con hipoclorito sódico (grupos HS-aa y HS-s) la proliferación fue marcadamente más lenta que en las muestras tratadas con clorhexidina (grupos CL-aa y CL-s). Sin embargo, a medida que se

aumentó el tiempo de cultivo, la proliferación observada en los distintos grupos de muestras fue igualándose, siendo similar en las muestras cultivadas durante seis semanas. Este hecho pudo deberse a que en las matrices dentarias empleadas en estos grupos de muestras quedaban restos en los túbulos dentinarios del hipoclorito sódico usado para el tratamiento de su superficie, lo que habría dificultado la proliferación celular. Puesto que el medio de cultivo fue cambiado cada 2 ó 3 días, estos restos de hipoclorito sódico se fueron diluyendo progresivamente hasta desaparecer, lo que permitió la proliferación normal de las DPSC. Por este motivo, en la realización del Ensayo Optimizado se modificó el protocolo, aumentando los lavados de las matrices dentarias previos a su empleo en los cultivos celulares, tras su tratamiento con hipoclorito sódico.

También se observó que las muestras cultivadas con ácido ascórbico (grupos HS-aa y CL-aa) presentaron una proliferación ligeramente superior que las muestras cultivadas sin ácido ascórbico (grupos HS-s y CL-s). Debido a esto, en el Ensayo Optimizado se realizó el cultivo de todas las muestras empleando un medio con ácido ascórbico.

3.2.1.2. Cambios morfológicos

Se tomaron muestras de los diferentes tiempos de cultivo con el fin de incluirlas tanto en parafina como en resina Epon, y realizar posteriormente cortes seriados para su estudio microscópico. El criterio que se empleó para decidir qué muestras se fijarían en cada uno de los tiempos de estudio fue su distribución en las placas de cultivo, independientemente del grado de proliferación alcanzado por las DPSC en dichas muestras. Así, tal y como se indicó en Material y Métodos, las muestras de las placas 1 y 2 se fijaron tras una semana de cultivo, las de las placas 3 y 4 tras dos semanas, las de las placas 5 y 6 tras cuatro semanas, y las de las placas 7 y 8 tras seis semanas.

Para una mejor comprensión de los cambios morfológicos observados, éstos se valoraron en relación a cuatro parámetros:

- Relativos al medio de cultivo: se valoraron en función de si el medio de cultivo contenía o no ácido ascórbico.
- Relativos al tratamiento de la matriz: se valoraron en función de si la matriz dentaria empleada había sido tratada con hipoclorito sódico o con clorhexidina.
- Relativos al tiempo de cultivo: se valoraron en función del tiempo que permanecieron las muestras en cultivo.

- Relativos a la superficie: se valoraron en función de la superficie de la matriz dentaria sobre la que proliferaron las DPSC.

Relativos al medio de cultivo

Al procesar las muestras para su inclusión en bloques de parafina y resina Epon, en general se observó que la unión de las capas celulares formadas con la matriz dentaria era más estable y se conservó mejor en las muestras de los grupos en las que el medio de cultivo empleado contenía ácido ascórbico (grupos HS-aa y CL-aa) que en las que no lo contenía (grupos HS-s y CL-s).

Asimismo, al realizar el estudio microscópico de las muestras se observó que el volumen de las capas celulares y de la matriz intercelular sintetizada era mayor en las muestras en las que el medio de cultivo empleado contenía ácido ascórbico

Estas diferencias fueron más evidentes al estudiar las muestras tras cuatro semanas de cultivo, y se redujeron en las muestras correspondientes a las seis semanas de cultivo.

Relativos al tratamiento de la matriz

Con respecto a la influencia sobre la morfología de las células del tratamiento al que había sido sometida la matriz dentaria, tanto en los primeros tiempos estudiados (una y dos semanas), como en tiempos de cultivo más largos (cuatro y seis semanas), prácticamente no se observaron diferencias entre las muestras con matrices dentarias tratadas con clorhexidina (grupos CL-aa y CL-s) y las muestras con matrices dentarias tratadas con hipoclorito sódico (grupos HS-aa y HS-s).

Únicamente, en algunas de las muestras con matrices tratadas con clorhexidina (grupos CL-aa y CL-s) se observaron restos tisulares sobre la superficie de la matriz dentaria que parecían dificultar la formación de nuevas capas celulares (figura 28). Esto solo se observó en tres de las muestras, pues en general la morfología de las DPSC y de las capas celulares que formaron sobre ambos grupos de matrices dentarias fue similar.

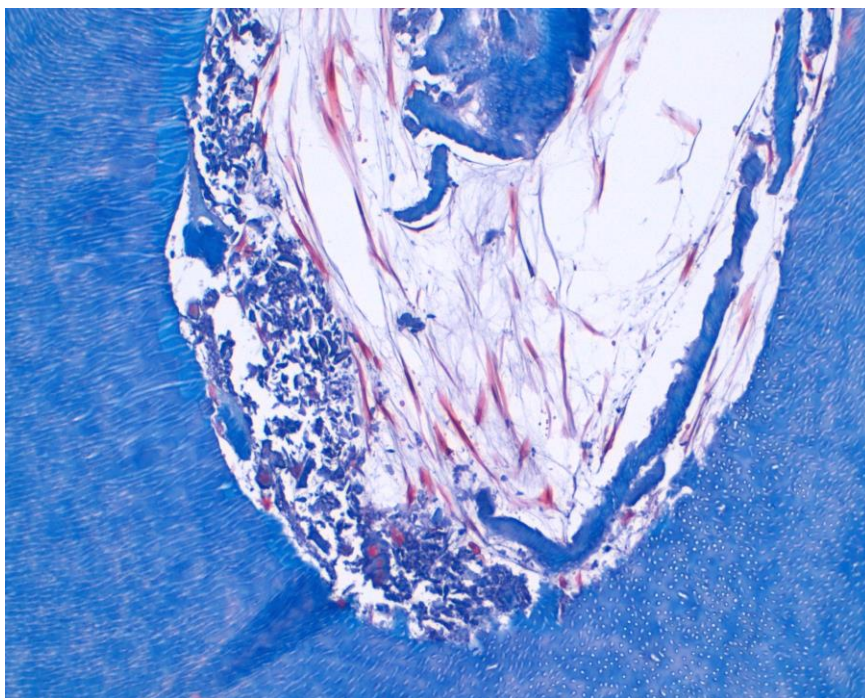


Figura 28. Sección de una muestra del grupo CL-aa a las seis semanas de cultivo. Sobre la dentina se observaron restos tisulares que pudieron dificultar la formación de capas celulares en esa zona. Tricrómico de Masson, 20x.

Relativos al tiempo de cultivo

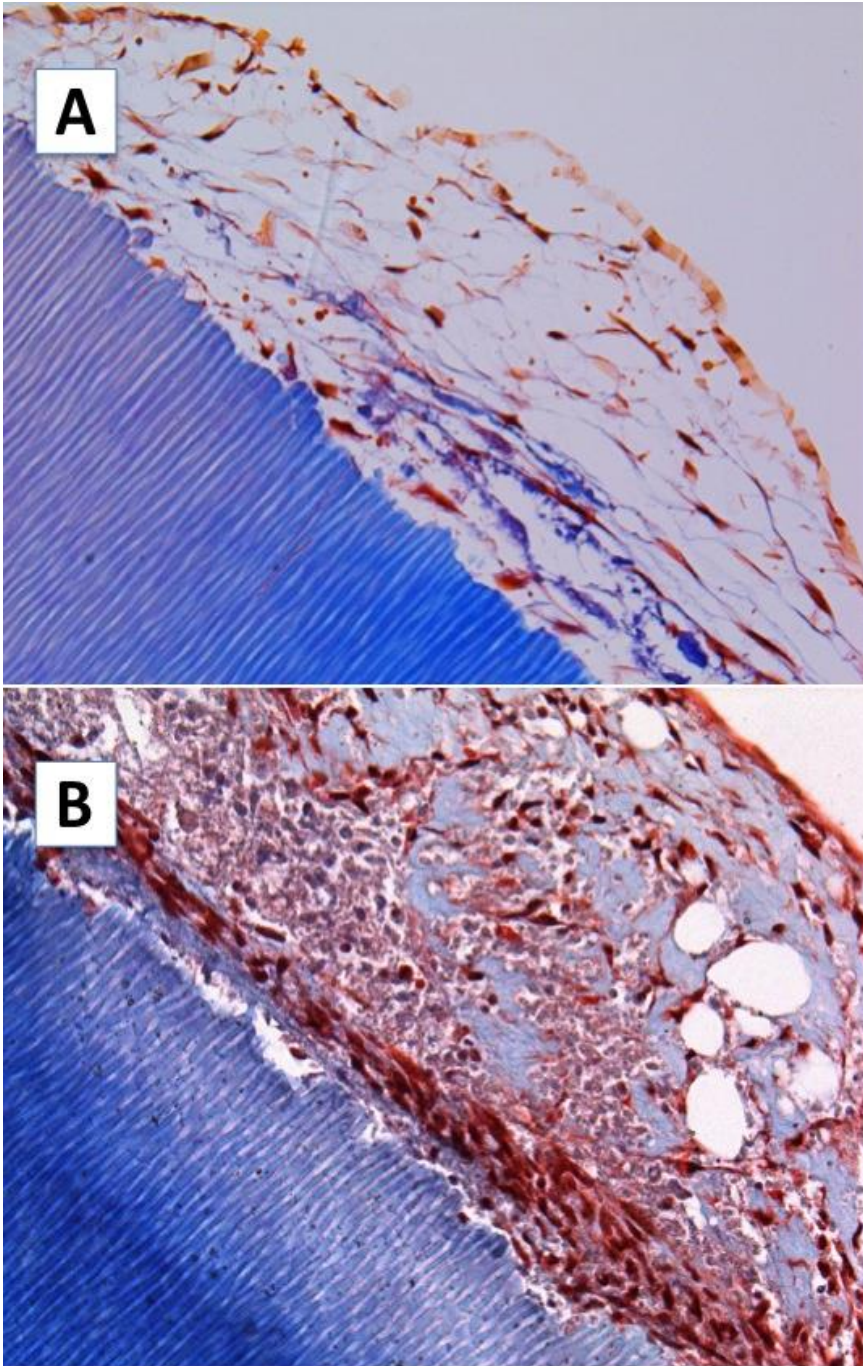
En el caso de las muestras correspondientes a una y dos semanas de cultivo la interacción de las células con la superficie de la matriz dentaria no fue estable. Es por ello que durante el procesamiento de las muestras para su inclusión en parafina y resina Epon, la unión de las capas celulares formadas con la matriz dentaria no se conservó, lo

que hizo que no fuera posible realizar el estudio histológico de las mismas.

A partir de las cuatro semanas de cultivo, al procesar las muestras para su inclusión en parafina o resina Epon se observó que la unión de las DPSC con las matrices dentarias en la mayoría de los casos era estable y resistente, lo que nos permitió realizar cortes seriados para su estudio a microscopía óptica y electrónica. En este tiempo, las DPSC formaron capas celulares estables y bien cohesionadas sobre la superficie de las matrices dentarias (figura 29A).

A las seis semanas de cultivo, en general el aspecto de las capas celulares y de la matriz intercelular formadas por las DPSC fue similar al observado a las 4 semanas, pero con un mayor volumen tisular.

Sin embargo en algunas muestras se pudo observar que sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie se produjo una compactación de las capas celulares, con un gran aumento de la densidad celular, apareciendo en las zonas más profundas de las capas más voluminosas áreas de apariencia necrótica (figura 29B).



← *Figura 29. A: Sección de una muestra del grupo HS-aa a las cuatro semanas de cultivo. en la mayor parte de la muestras, sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC formaron capas celulares de aspecto reticular. B: Sección de una muestra del grupo HS-aa a las seis semanas de cultivo. En algunas muestras, como la mostrada aquí, se observó una condensación de las capas celulares, con aumento de la celularidad y de las fibras colágenas, apareciendo también áreas de aspecto necrótico con restos celulares. Tricrómico de Masson, 20x.*

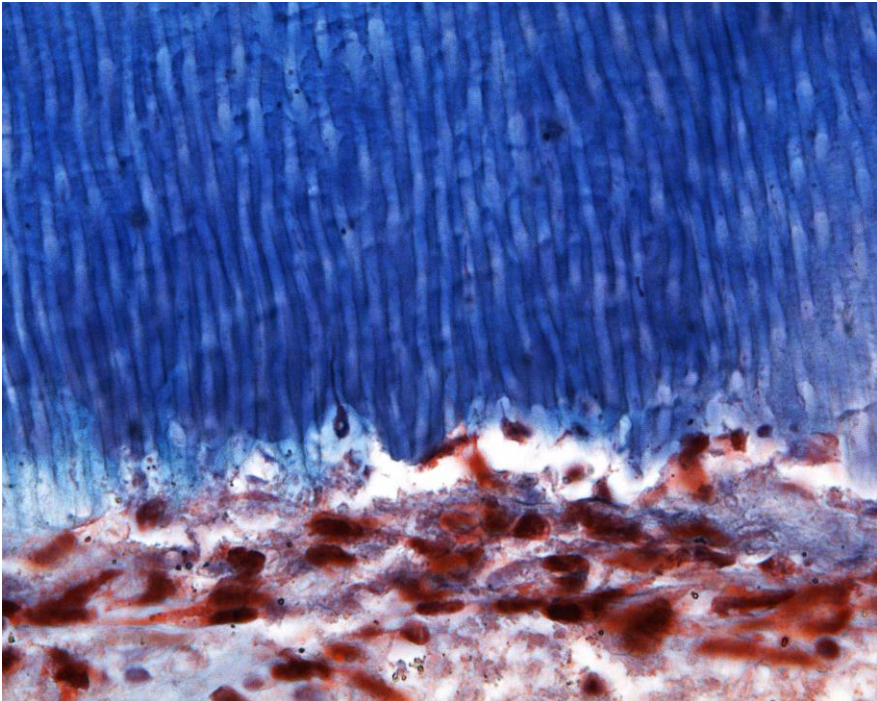


Figura 30. Sección de una muestra del grupo CL-aa a las seis semanas de cultivo. Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC mantienen un aspecto odontoblástico, pero en este caso se ha producido una densificación de la capas celulares y de la matriz intercelular, apareciendo áreas de aspecto necrótico con restos celulares. Tricrómico de Masson, 40x.

Al estudiar estas muestras a mayores aumentos se observó que, en lugar del entramado de fibras reticulares y células de tipo estrellado que se encontraron en las muestras de 4 semanas de cultivo y en la mayoría de las muestras de 6 semanas de cultivo, las DPSC formaron capas celulares más compactas con densos depósitos de fibras de colágeno. Las células próximas a la dentina presentaban el mismo aspecto odontoblástico que se observó en otras muestras, emitiendo una o varias prolongaciones celulares dentro de los túbulos dentinarios. Sin embargo, en contacto con estas células se encontró una matriz intercelular más densa, rica en fibras de colágeno, y varias capas de células fusiformes con una abundante celularidad (figura 30).

Relativos a la superficie

Al estudiar las muestras se observó un comportamiento diferente de las DPSC en función del tipo de superficie dentaria sobre la que estaban adheridas. Considerando este criterio, se diferenciaron cuatro situaciones:

- I. Sin contacto con la matriz dentaria.
- II. Dentina con los túbulos perpendiculares u oblicuos a la superficie. En ella se pueden observar los orificios correspondientes a los túbulos dentinarios.
- III. Dentina con los túbulos paralelos a la superficie. Es más o menos lisa, pues no presenta los orificios

correspondientes a los túbulos dentinarios. En esta categoría también se incluye la superficie externa de la dentina en la que la capa de cemento ha sido eliminada, y en la que, aunque puede presentar túbulos perpendiculares a la superficie, la entrada a dichos túbulos está parcialmente obliterada.

IV. Cemento.

A continuación se muestra un esquema de las diferentes superficies de la dentina, en relación a la orientación de los túbulos dentinarios (figura 31).

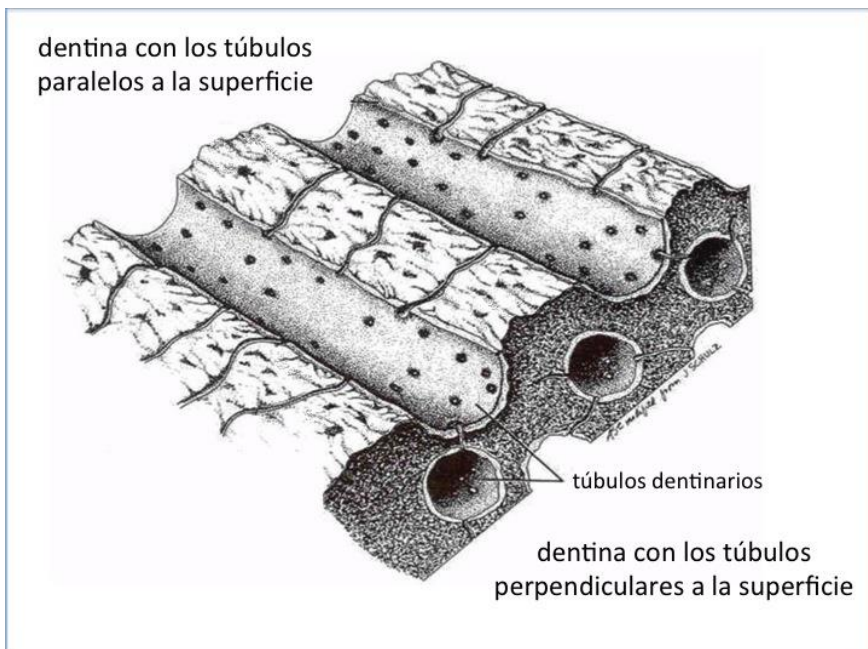


Figura 31. Representación de las diferentes superficies de la dentina en función de la orientación de los túbulos dentinarios.

I. Sin contacto con la matriz dentaria

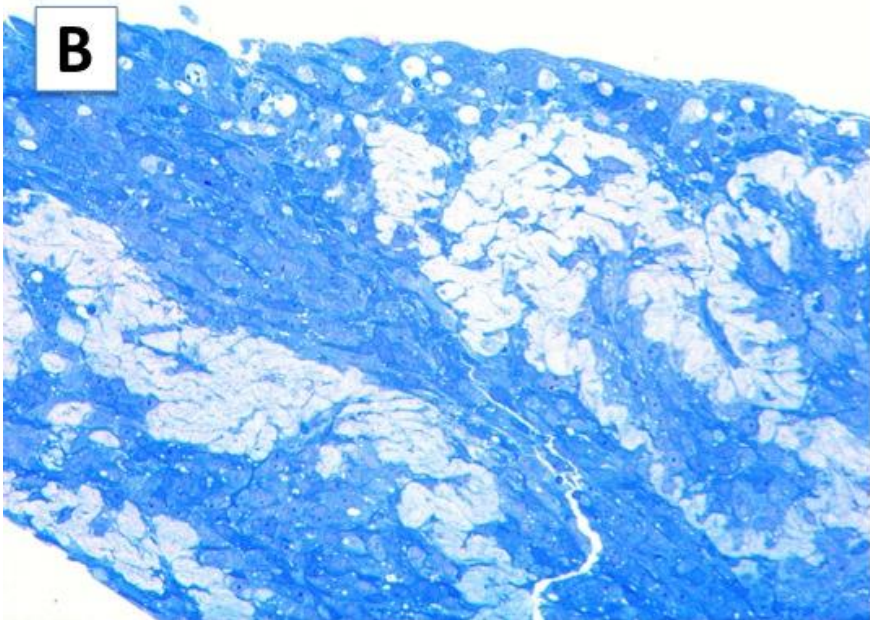
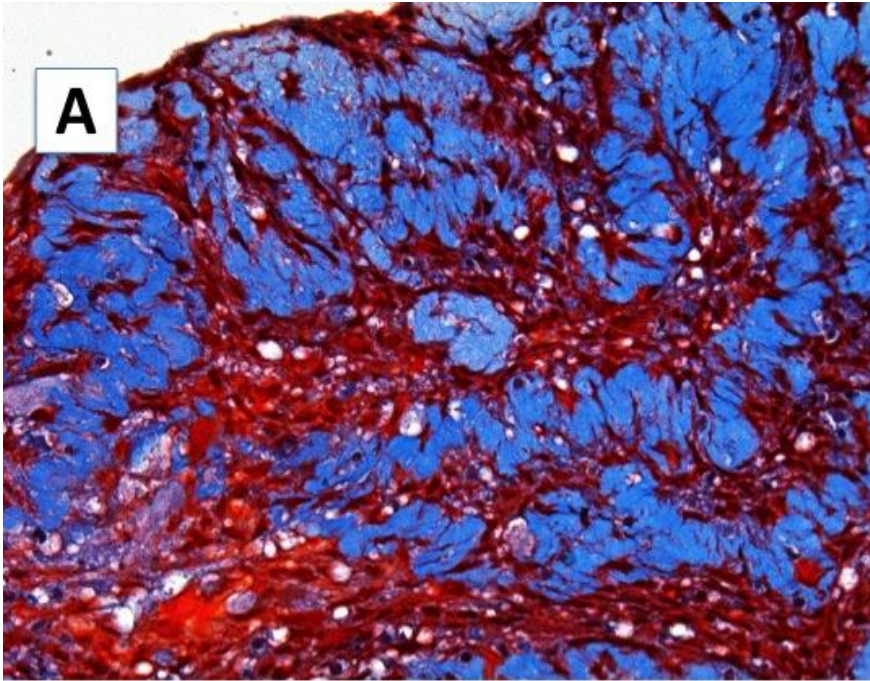
En las zonas sin contacto directo con las superficies dentarias las DPSC formaron gruesas capas celulares organizadas con abundante producción de matriz intercelular. Al teñir las muestras con tricrómico de Masson se observó que esta matriz era rica en fibras de colágeno (figura 32A). En los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina se observó que las DPSC se organizaron formando capas de un espesor más o menos constante alternando con capas de matriz intercelular también de espesor constante (figura 32B).

II. Dentina con los túbulos perpendiculares u oblicuos a la superficie

Cuando las células crecieron adheridas sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC adquirieron un aspecto estrellado produciendo una matriz intercelular de aspecto reticular (figura 33).

Figura 32. Secciones de dos muestras del grupo HS-aa a las cuatro semanas de cultivo. En las zonas alejadas de la matriz dentaria las DPSC forman capas celulares regulares, produciendo abundante matriz intercelular de espesor constante. A: Tricrómico de Masson. 20x. B: Corte semifino, azul de toluidina, 20x.





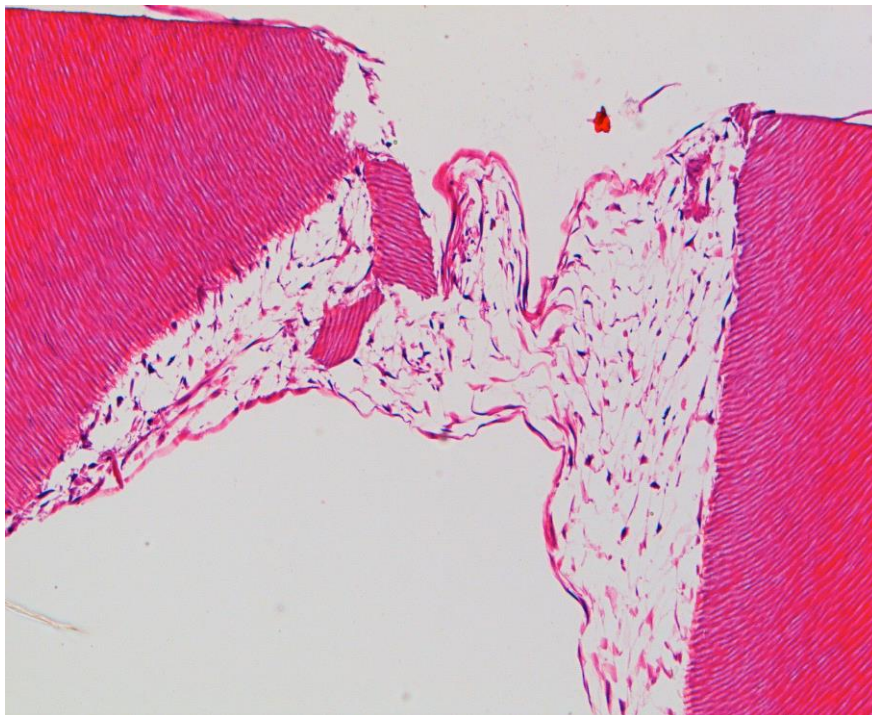


Figura 33. Sección de una muestra del grupo HS-s a las cuatro semanas de cultivo. Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC adoptaron una forma estrellada, rodeadas de una matriz de tipo reticular. Hematoxilina-Eosina, 10x.

Al estudiar las muestras a mayor aumento se observó que las células en contacto con la dentina presentaban una morfología odontoblástica, con un citoplasma alargado y una o varias prolongaciones citoplasmáticas, a modo de proceso odontoblástico, alojadas cada una de ellas en un túbulo dentinario. Mostraron además una discreta producción de matriz intercelular (figura 34).

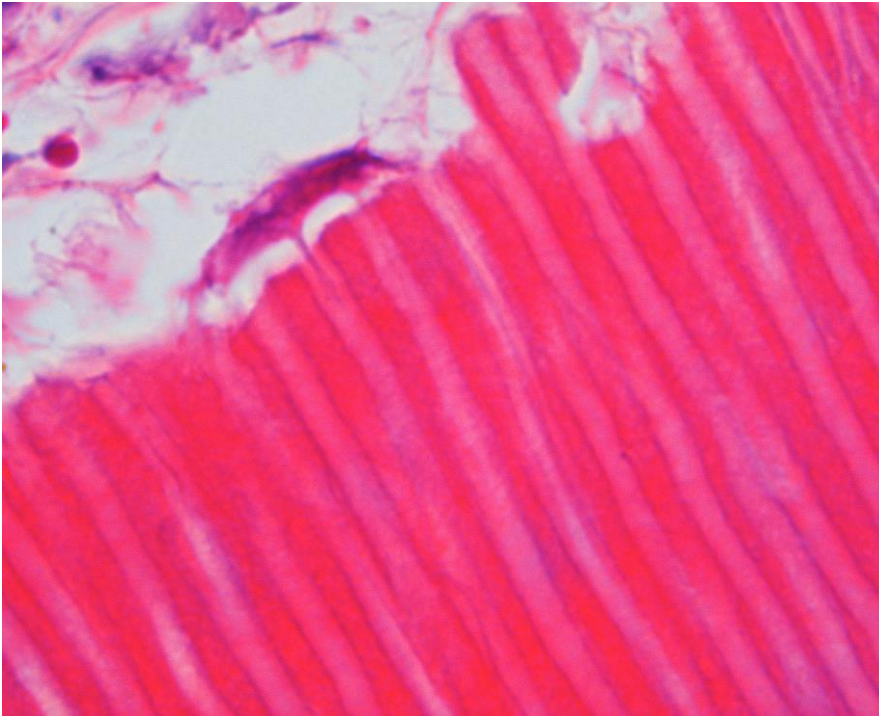
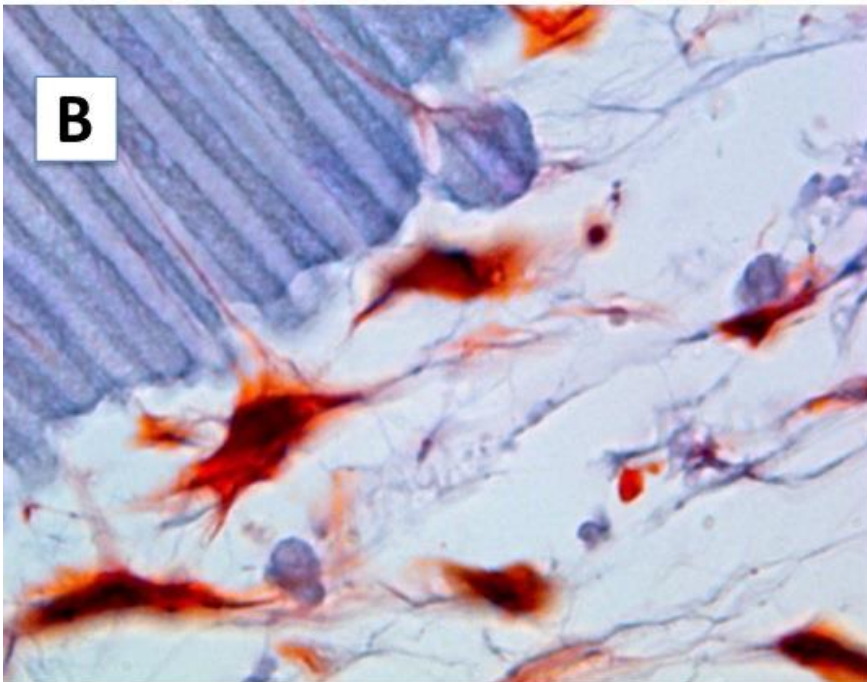
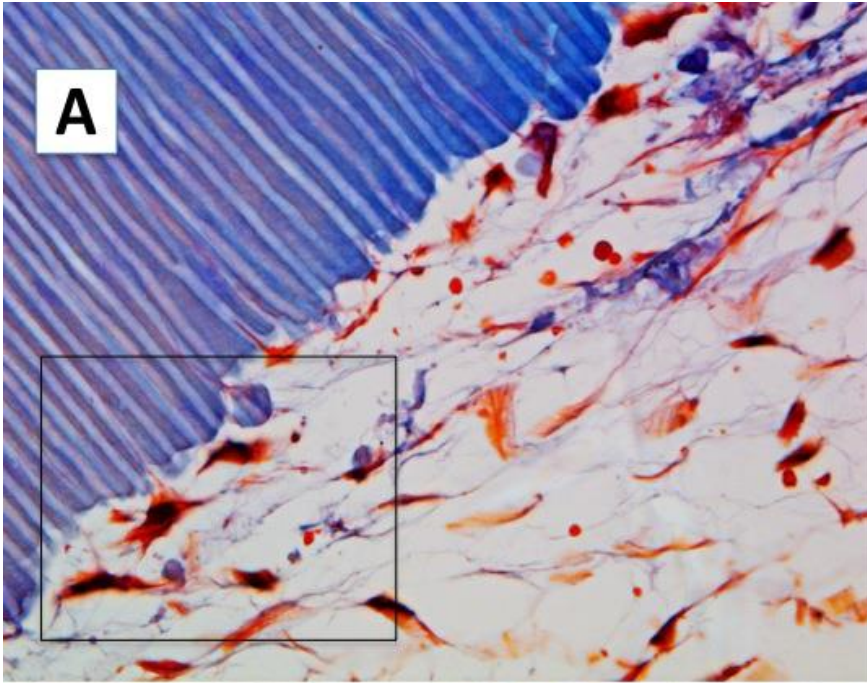


Figura 34. Sección de una muestra del grupo CL-aa a las cuatro semanas de cultivo. Célula odontoblástica sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie emitiendo varias prolongaciones que discurren dentro de túbulos dentinarios. Hematoxilina-Eosina, 100x.

Tras teñir las muestras con tricrómico de Masson se ratificó que la matriz intercelular sintetizada era de tipo reticular, con escasas y finas fibras de colágeno formando una malla laxa, similar a la que se encuentra en el tejido conjuntivo de la pulpa dental (figuras 35 y 36).

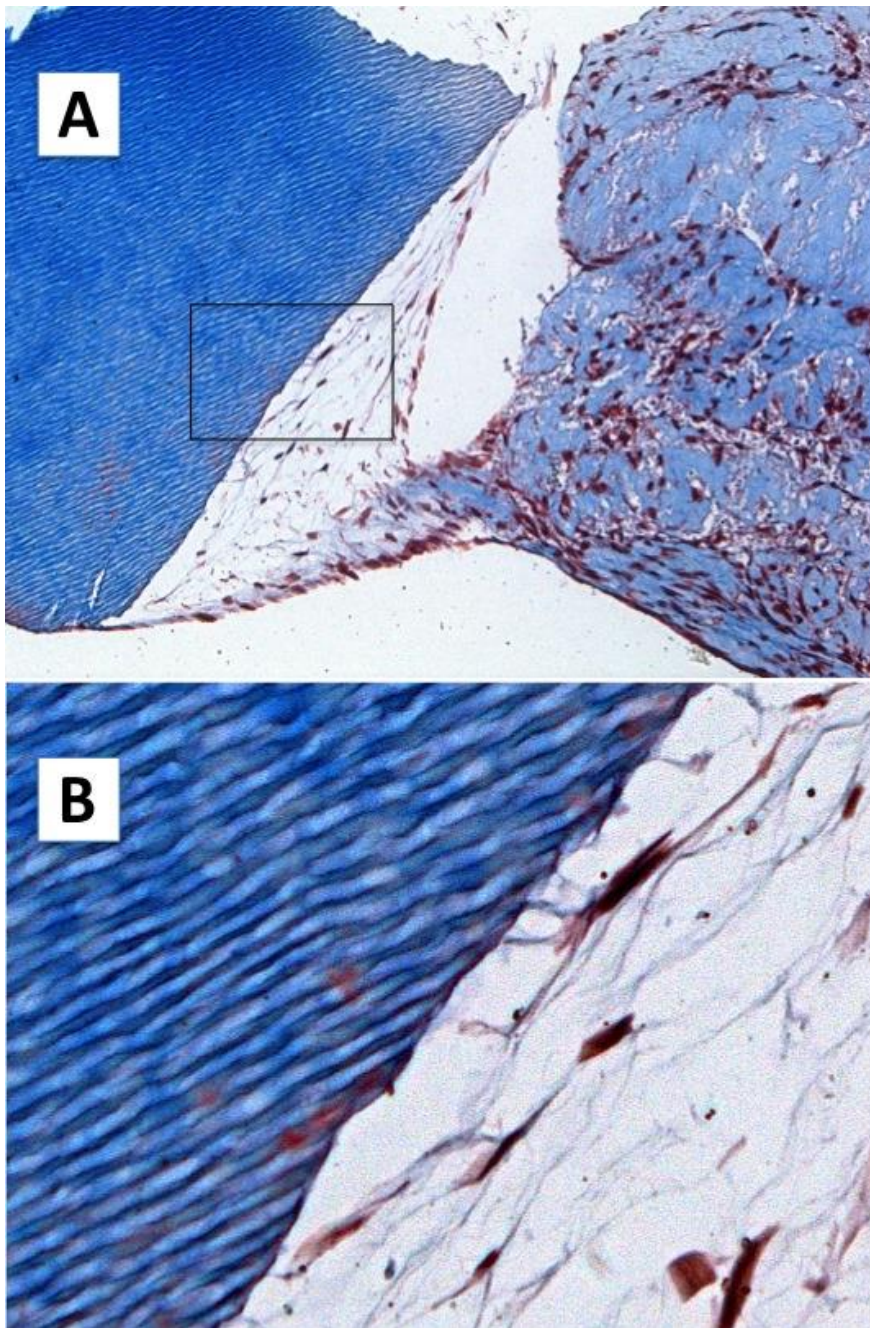


← *Figura 35. Sección de una muestra del grupo HS-aa tras cuatro semanas de cultivo. A: Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC adoptaron una morfología odontoblástica, emitiendo prolongaciones dentro de los túbulos, y estando rodeadas por una matriz intercelular de aspecto reticular con finas fibras de colágeno. Tricrómico de Masson. 40x. B: Detalle de la región recuadrada en A. Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie algunas DPSC emitieron varias prolongaciones dentro de los túbulos, siendo la matriz extracelular pobre en colágeno. Tricrómico de Masson. 100x.*

Esta matriz extracelular de aspecto reticular presentaba un aspecto muy diferente de la que las DPSC habían sintetizado en otras zonas, en las que dicha matriz era mucho más densa.

Al realizar el estudio de las muestras a MET, los cortes obtenidos no permitieron confirmar los hallazgos observados a microscopía óptica. Aunque se realizaron múltiples cortes de cada una de las muestras incluidas en resina Epon variando la orientación del bloque, no se obtuvo ninguno que permitiera estudiar esta superficie.

Al ser éste un Estudio Preliminar, el número de muestras que se destinaron al estudio a MET fue limitado, lo que redujo las probabilidades de conseguir la orientación deseada del bloque al realizar los cortes. Esto fue corregido en el Ensayo Optimizado, pues se incrementó el número de muestras destinadas a este tipo de estudio.



← *Figura 36. Sección de una muestra del grupo HS-aa a las seis semanas de cultivo. A: Se observa la diferencia tanto en la morfología que adoptan las DPSC como en la matriz intercelular sintetizada, en la zona próxima a la dentina con los túbulos oblicuos a la superficie y en zonas más alejadas de la superficie dentaria. Tricrómico de Masson. 10x. B: Detalle de la región recuadrada en A. Las células próximas a la dentina con los túbulos oblicuos a la superficie emitían prolongaciones dentro de los túbulos. Alrededor de la superficie se observa una matriz intercelular con finas fibras de colágeno en forma reticular. Tricrómico de Masson, 40x.*

III. Dentina con los túbulos paralelos a la superficie

Sobre la dentina con túbulos paralelos a la superficie y la superficie externa de la dentina en la que se eliminó el cemento, las DPSC formaron capas celulares aplanadas y bien cohesionadas, produciendo abundante matriz entre ellas y sobre la superficie dentaria.

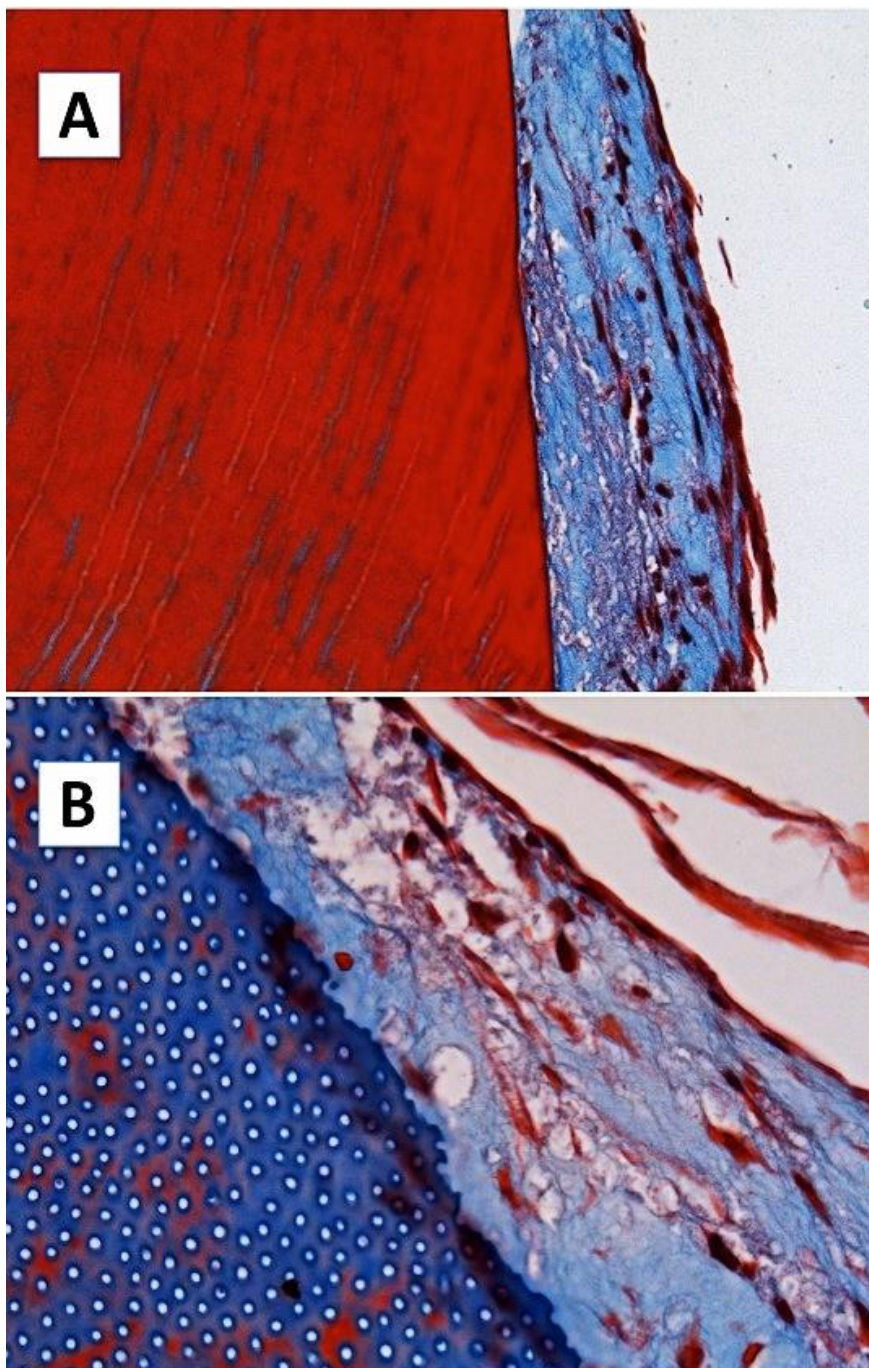
Cuando se realizó la tinción de las preparaciones mediante tricrómico de Masson se observó que la matriz sintetizada presentaba un alto contenido en colágeno. Aquí las fibras de colágeno eran de aspecto denso y no reticular, a diferencia de los observado sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie (figura 37).

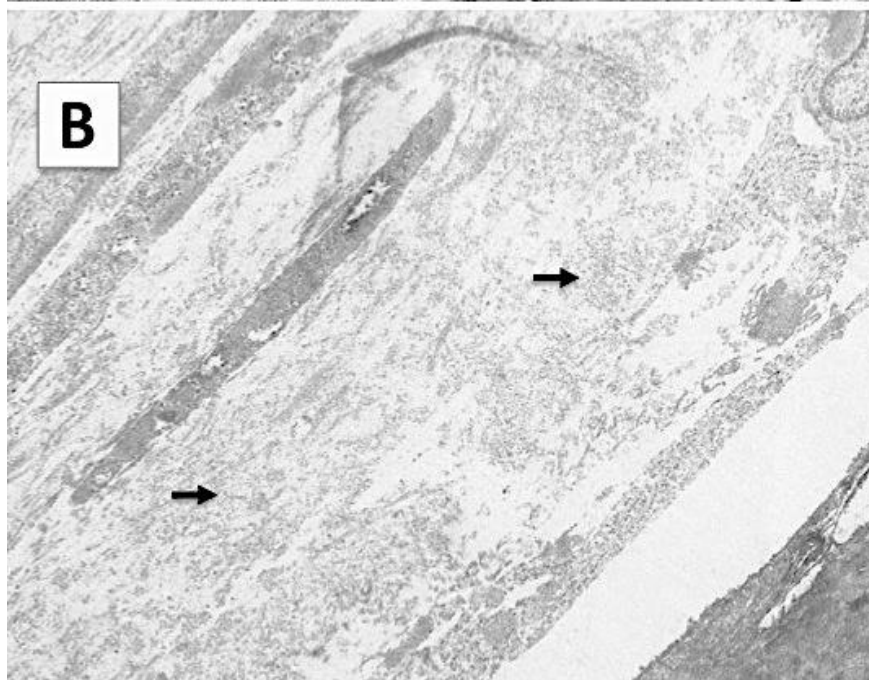
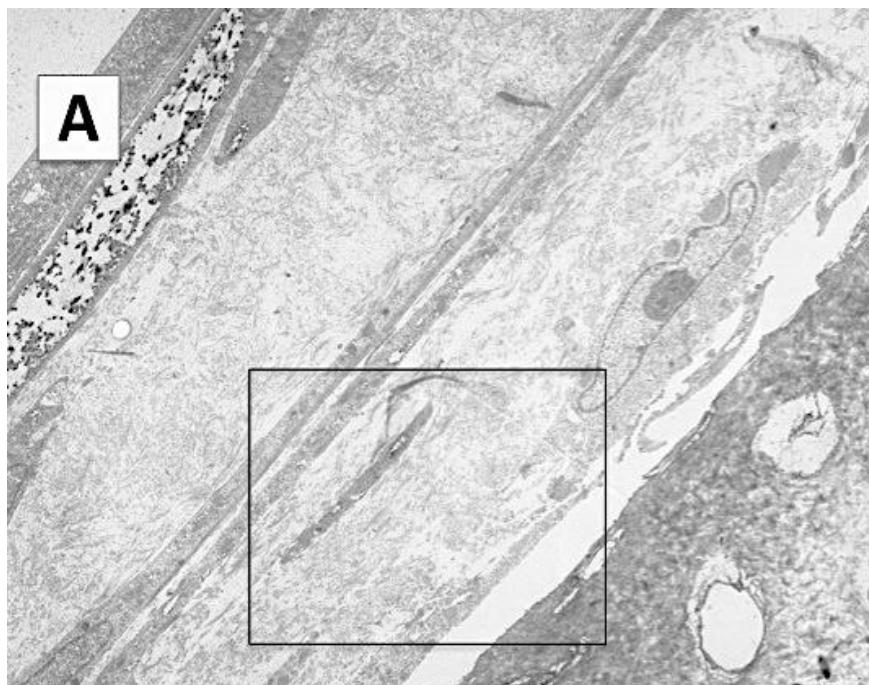
Figura 37. A: Sección de una muestra del grupo CL-aa a las cuatro semanas de cultivo. Sobre la superficie externa de la dentina las DPSC formaron capas aplanadas, produciendo una matriz rica en colágeno. Tricrómico de Masson. 20x. B: Sección de una muestra del grupo HS-aa a las seis semanas de cultivo. Sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie las DPSC formaron capas aplanadas, produciendo abundante matriz intercelular rica en fibras de colágeno. Tricrómico de Masson, 40x. →

El análisis de las muestras mediante MET confirmó que sobre estas superficies dentinarias las DPSC forman capas de células aplanadas con abundante matriz colágena entre dichas capas. Las DPSC presentaron una morfología típicamente mesenquimática, con abundancia de organelas y un núcleo voluminoso con la cromatina dispersa, rasgos que evidencian una gran actividad secretora. Las fibras de colágeno de la matriz sintetizada no presentaban una orientación definida (figura 38).

IV. Cemento

A nivel de la superficie del cemento las DPSC formaron capas celulares aplanadas, con abundante síntesis de matriz rica en colágeno depositada sobre la superficie de la matriz dentaria, similar a lo observado en la dentina con los túbulos paralelos a la superficie (figuras 39 y 40).





← *Figura 38. Sección de una muestra del grupo CL-s a las seis semanas de cultivo. A: Sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie las DPSC forman capas aplanadas con secreción de abundante matriz intercelular. B: Detalle de la región recuadrada en A. Se observa una matriz intercelular rica en fibras de colágeno (flechas), en la que estas fibras no presentan una orientación definida. MET. A: 2500x. B: 6000x.*

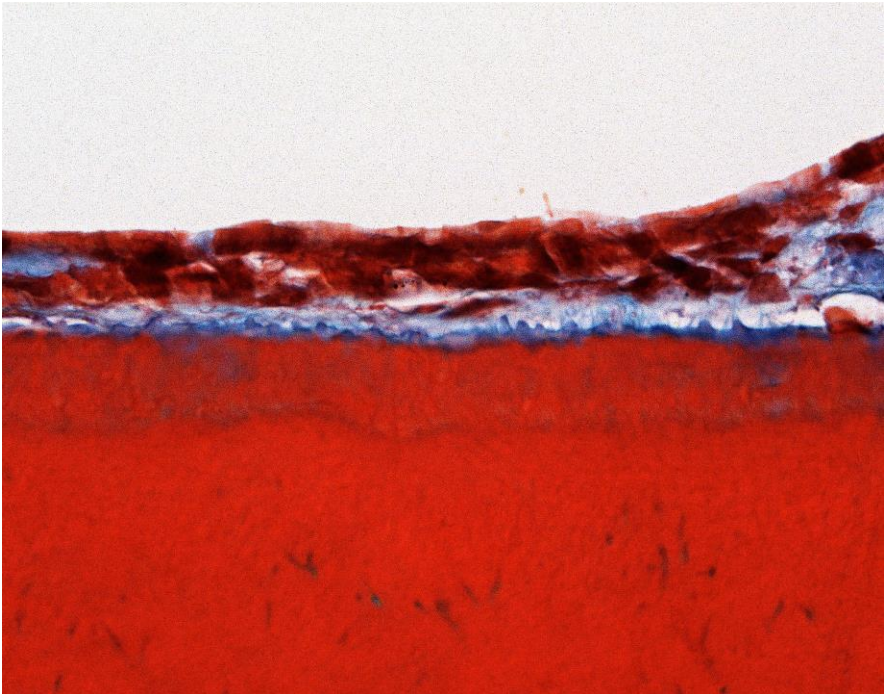


Figura 39. Sección de una muestra del grupo CL-s a las cuatro semanas de cultivo. Sobre el cemento las DPSC adoptan una morfología aplanada, produciendo una matriz rica en fibras colágenas. Tricrómico de Masson, 40x.



Figura 40. Sección de una muestra del grupo CL-aa a las seis semanas de cultivo. Sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie y sobre el cemento las DPSC forman capas aplanadas, produciendo abundante matriz intercelular rica en fibras de colágeno. Tricrómico de Masson, 10x.

El estudio de las muestras a mayores aumentos puso de relieve que la orientación de las fibras colágenas sintetizadas por las DPSC parecía no ser aleatoria, sino perpendicular a la superficie del cemento (figura 41).

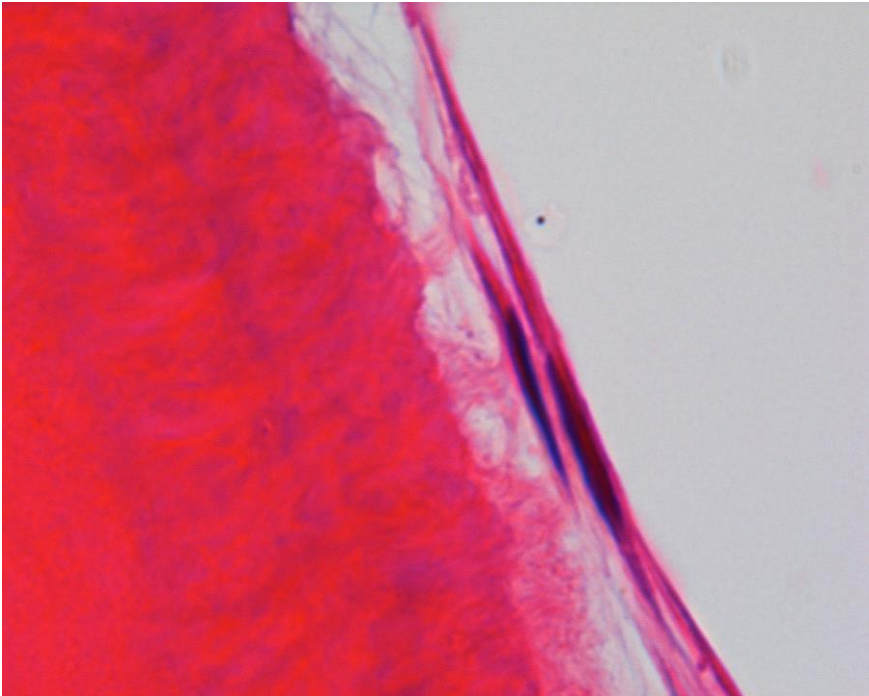
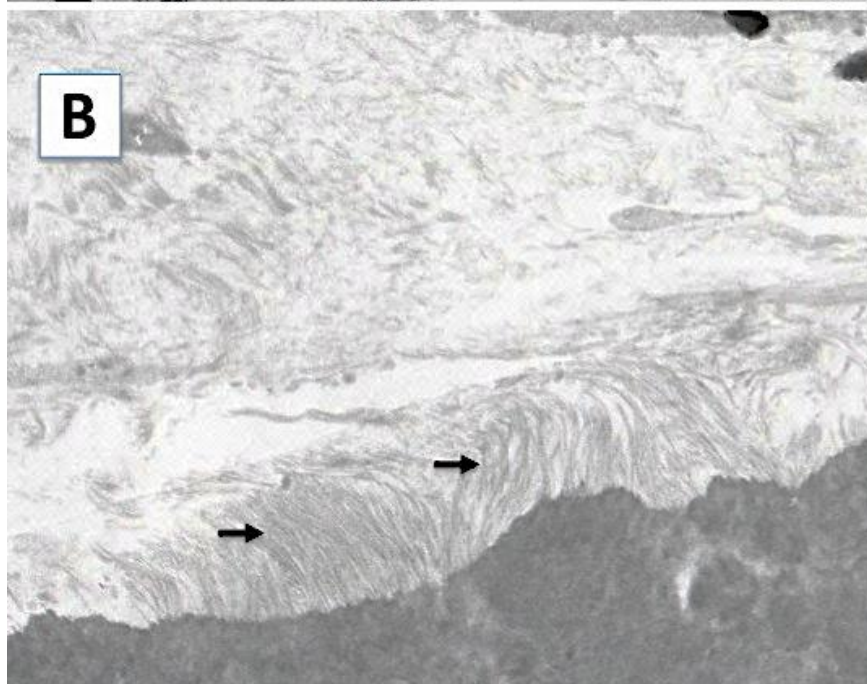
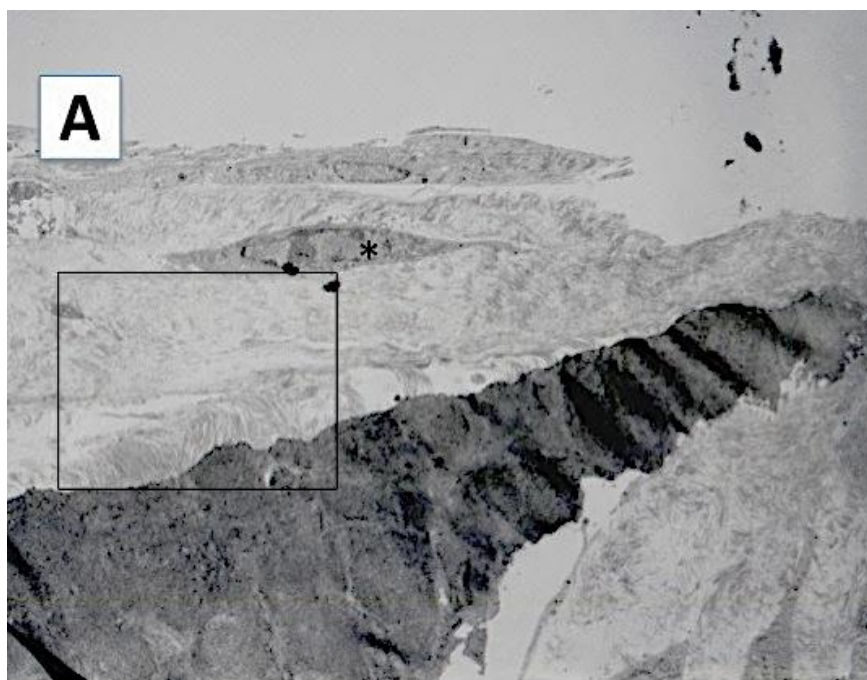


Figura 41. Sección de una muestra del grupo HS-aa a las cuatro semanas de cultivo. Sobre el cemento las DPSC forman capas celulares aplanadas, produciendo una matriz rica en fibras colágenas dispuestas preferentemente de forma perpendicular a la superficie dentaria. Hematoxilina-Eosina, 100x.

En el estudio a MET se confirmaron los hallazgos realizados a microscopía óptica, pues se observó que las DPSC habían adoptado una morfología aplanada, produciendo una abundante matriz intercelular rica en fibras de colágeno (figura 42A). A mayores aumentos se comprobó que la orientación de las fibras colágenas sintetizadas directamente sobre la superficie del cemento era perpendicular a la misma (figura 42B).



← *Figura 42. Sección de una muestra del grupo HS-aa a las seis semanas de cultivo. A: Sobre el cemento las DPSC forman capas de células aplanadas (asterisco), con abundante producción de matriz intercelular. MET. 1500x. B: Detalle de la región recuadrada en A. Se observa que las fibras colágenas sintetizadas sobre el cemento son perpendiculares a la superficie dentaria (flechas). MET, 8000x.*

3.2.2. Ensayo Optimizado

Una vez analizados los resultados obtenidos en el Estudio Preliminar, se realizó un nuevo estudio al que se denominó Ensayo Optimizado. Para este ensayo se introdujeron diversas modificaciones sobre el protocolo empleado en el Estudio Preliminar (ver Material y Métodos), con el objetivo de optimizar los procedimientos y, en su caso, confirmar los hallazgos obtenidos. En este ensayo en todas las muestras las DPSC se cultivaron empleando un medio enriquecido con ácido ascórbico.

3.2.2.1. Proliferación

Tras 1 semana de cultivo, en el grupo con matrices tratadas con hipoclorito sódico (matrices HS), el porcentaje de muestras en el que las DPSC presentaron una buena proliferación celular llegando las células a contactar con la superficie de la matriz dentaria (B), y en el que presentaron una muy buena proliferación (MB) llegando las células a

formar capas sobre la matriz dentaria (figuras 43, A y C), fue en ambos casos del 42.2%. En este mismo grupo, el porcentaje de las muestras en las que las DPSC presentaron una baja proliferación (M) y una proliferación moderada (R), en ambos casos fue del 7.8%. En los cultivos con matrices tratadas con clorhexidina (muestras CL), en el 31.3% de las muestras las DPSC presentaron una baja proliferación celular (M), en el 26.6% una proliferación moderada (R), en el 28.1% una buena proliferación (B) llegando las células a contactar con la matriz dentaria (figura 43, B y D), y solo en el 14.1% presentaron una muy buena proliferación celular (MB) llegando a formar capas celulares sobre la superficie de la matriz (tabla 11).

Grupo	n	M		R		B		MB		E	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HS	64	5	7.8	5	7.8	27	42.2	27	42.2	0	0
CL	64	20	31.3	17	26.6	18	28.1	9	14.1	0	0

Tabla 11. Proliferación celular en el Ensayo Optimizado tras una semana de cultivo. HS: matrices tratadas con NaClO; CL: matrices tratadas con clorhexidina; M: muestras con baja proliferación celular; R: muestras con proliferación celular intermedia y en las que las células no contactan con la matriz dentaria; B: muestras con buena proliferación celular y en las que las células contactan con la matriz dentaria; MB: muestras con muy buena proliferación celular y en las que las células forman capas sobre la matriz dentaria; E: muestras con muy buena proliferación celular y en las que las células envuelven por completo la matriz dentaria. n: número de muestras.

Tras dos semanas de cultivo, el 85.4% de las muestras con matrices HS presentaron una muy buena proliferación celular (MB), llegando las DPSC a formar capas celulares sobre la superficie de la matriz dentaria (figura 44, A y C).

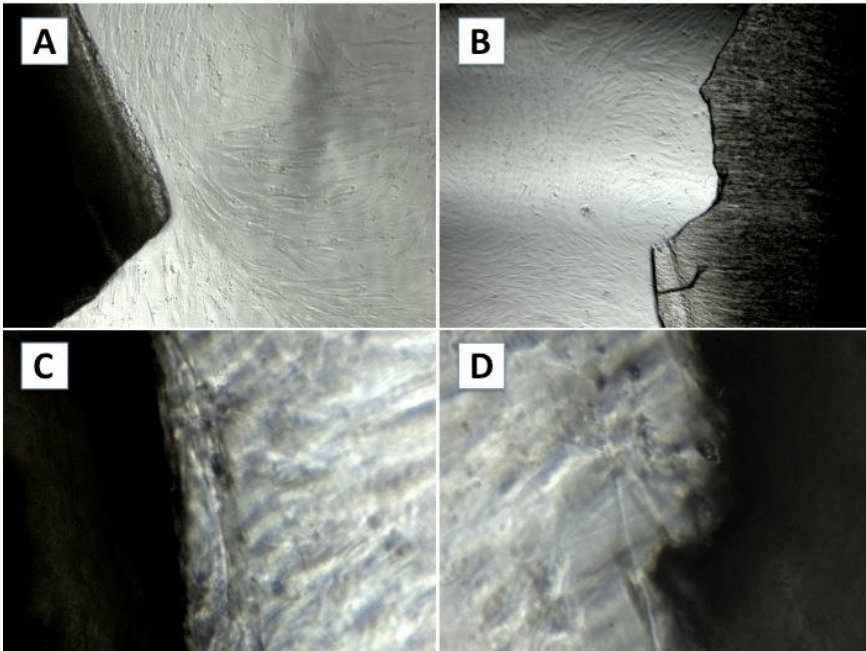


Figura 43. Muestras tras una semana de cultivo. A: Muestra del grupo HS, clasificada como MB (10x). B: Muestra del grupo CL, clasificada como B (10x). C: Muestra del grupo HS, clasificada como MB (40x). D: Muestra del grupo CL, clasificada como B (40x). Microscopio invertido de contraste de fases.

El 2.1% de las muestras mostraron una buena proliferación (B) llegando las células a contactar con la matriz dentaria, mientras que el 4.2% y el 6.3% presentaron una proliferación

baja (M) y moderada (R), respectivamente. En el caso de las muestras con matrices CL, el 64.6% alcanzó una muy buena proliferación (MB), llegando las células a formar capas celulares sobre la matriz dentaria (figuras 44, B y D), el 18.8% una buena proliferación (B) llegando las células a contactar con la matriz dentaria, mientras que el 10.4% y el 4.2% presentaron una proliferación baja (M) y moderada (R), respectivamente (tabla 12).

Grupo	n	M		R		B		MB		E	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HS	48	2	4.2	3	6.3	1	2.1	41	85.4	1	2.1
CL	48	5	10.4	2	4.2	9	18.8	31	64.6	1	2.1

Tabla 12. Proliferación celular en el Ensayo Optimizado tras dos semanas de cultivo. El significado de las abreviaturas es el mismo descrito en la leyenda de la tabla 11.

Tras cuatro semanas de cultivo, todas las muestras con matrices HS presentaron una proliferación celular muy alta, llegando las células a envolver completamente la matriz dentaria (figura 45, A y C), mientras que de las muestras con matrices CL solo fue el 78.1% el que alcanzó este grado de proliferación (tabla 13; figura 45, B y D).

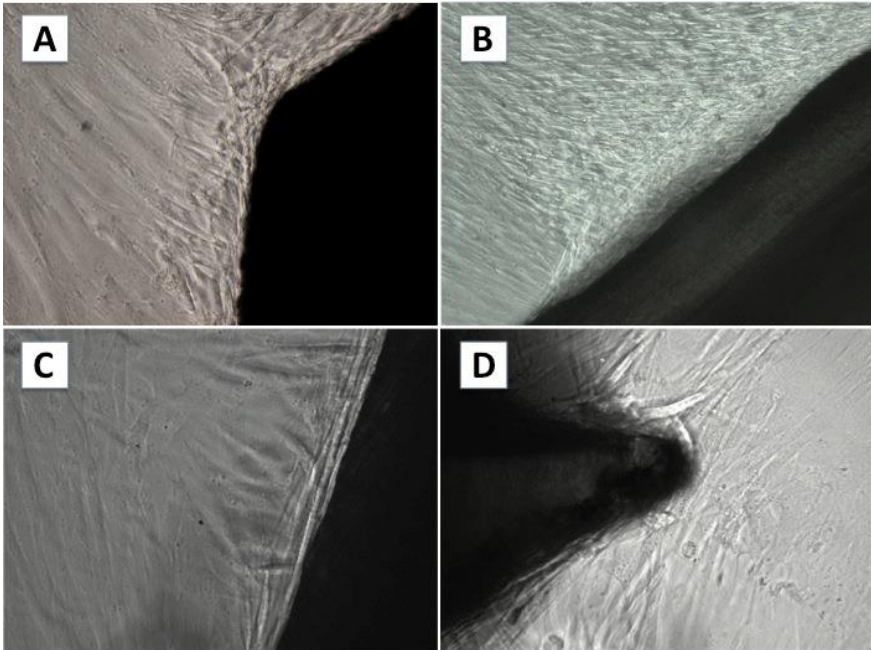


Figura 44. Muestras a las dos semanas de cultivo, todas clasificadas como MB. A: Muestra del grupo HS (10x). B: Muestra del grupo CL (10x). C: Muestra del grupo HS (40x). D: Muestra del grupo CL (40x). Microscopio invertido de contraste de fases.

Grupo	n	M		R		B		MB		E	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HS	32	0	0	0	0	0	0	0	0	32	100
CL	32	0	0	0	0	1	3.1	6	18.8	25	78.1

Tabla 13. Proliferación celular en el Ensayo Optimizado tras cuatro semanas de cultivo. El significado de las abreviaturas es el mismo descrito en la leyenda de la tabla 11.

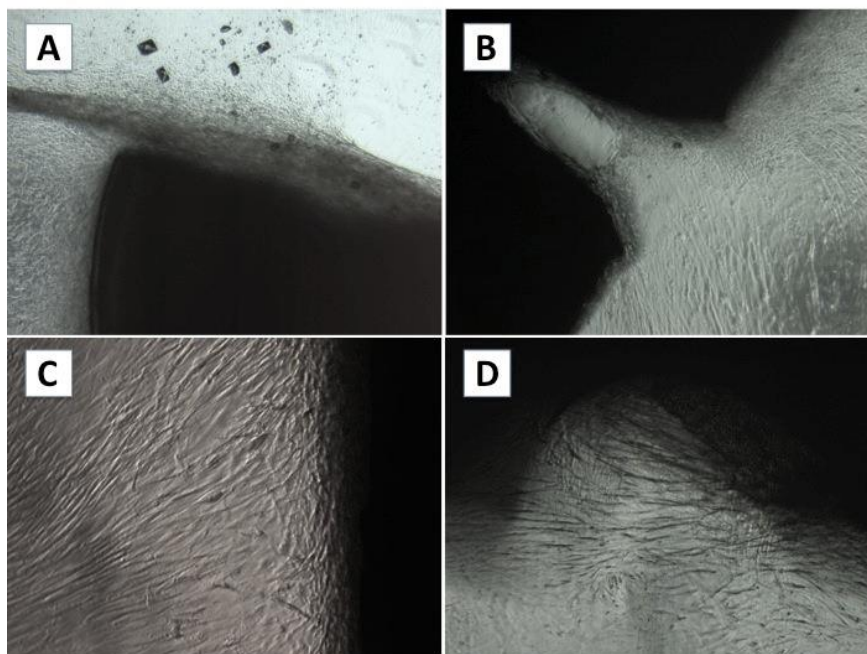


Figura 45. Muestras a las cuatro semanas de cultivo, todas clasificadas como E. A: Muestra del grupo HS (10x). B: Muestra del grupo CL (10x). C: Muestra del grupo HS (40x). D: Muestra del grupo CL (40x). Microscopio invertido de contraste de fases.

Tras seis semanas de cultivo, todas las muestras, tanto con matrices HS como con las matrices CL, presentaron una excelente proliferación llegando las células a formar gruesas capas celulares envolviendo completamente a la matriz dentaria (tabla 14; figura 46).

Grupo	n	M		R		B		MB		E	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HS	16	0	0	0	0	0	0	0	0	16	100
CL	16	0	0	0	0	0	0	0	0	16	100

Tabla 14. Proliferación celular en el Ensayo Optimizado tras seis semanas de cultivo. El significado de las abreviaturas es el mismo descrito en la leyenda de la tabla 11.

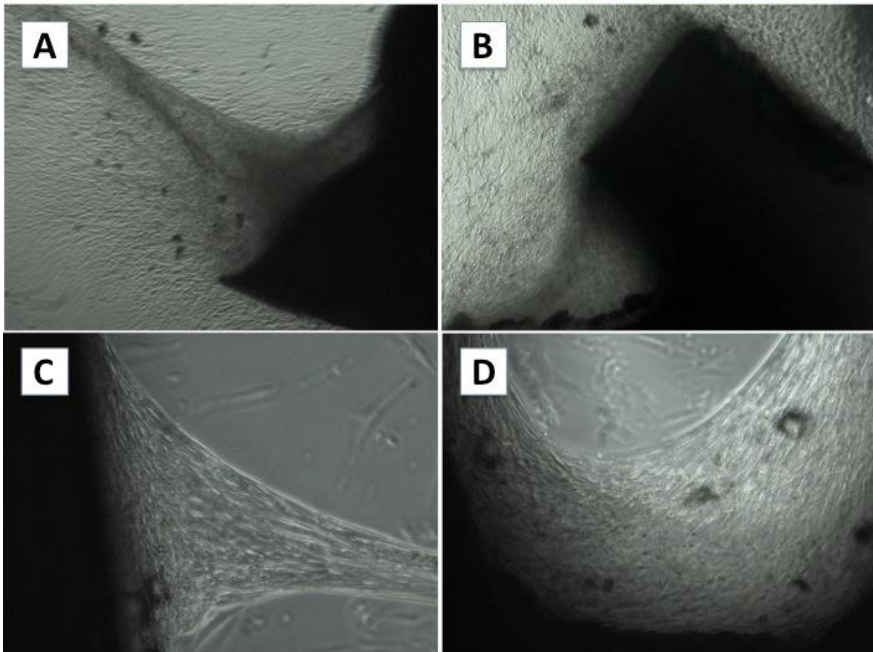


Figura 46. Muestras a las seis semanas de cultivo, todas clasificadas como E. A: Muestra del grupo HS (10x). B: Muestra del grupo CL (10x). C: Muestra del grupo HS (40x). D: Muestra del grupo CL (40x). Microscopio invertido de contraste de fases.

Con el fin de facilitar la visión en su conjunto de los resultados descritos anteriormente, a continuación se incluye una tabla comparativa donde se refleja la proliferación celular observada durante el Ensayo Optimizado en los diferentes grupos de muestras estudiados (tabla 15).

Tiempo de cultivo	Grupo	n	M		R		B		MB		E	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 semana	HS	64	5	7.8	5	7.8	27	42.2	27	42.2	0	0
	CL	64	20	31.3	17	26.6	18	28.1	9	14.1	0	0
2 semanas	HS	48	2	4.2	3	6.3	1	2.1	41	85.4	1	2.1
	CL	48	5	10.4	2	4.2	9	18.8	31	64.6	1	2.1
4 semanas	HS	32	0	0	0	0	0	0	0	0	32	100
	CL	32	0	0	0	0	1	3.1	6	18.8	25	78.1
6 semanas	HS	16	0	0	0	0	0	0	0	0	16	100
	CL	16	0	0	0	0	0	0	0	0	16	100

Tabla 15. Proliferación celular en el Ensayo Optimizado en todos los tiempos estudiados. El significado de las abreviaturas es el mismo descrito en la leyenda de la tabla 11.

Al analizar estos resultados globalmente se observó que inicialmente la proliferación celular en las muestras tratadas con hipoclorito sódico (grupo HS) fue mayor que en las muestras tratadas con clorhexidina (grupo CL), a diferencia

de los resultados obtenidos en el Estudio Preliminar. Esto confirmó la hipótesis formulada tras el análisis de los resultados obtenidos en el Estudio Preliminar, en la que la lenta proliferación inicial observada en las muestras con matrices dentarias tratadas con hipoclorito sódico se atribuyó a la posible presencia de esta sustancia en los túbulos dentinarios de dichas matrices, y apoyó las variaciones introducidas en el protocolo realizado en el Ensayo Optimizado.

Al igual que ocurriera en el Estudio Preliminar, al aumentar el tiempo de cultivo la proliferación celular en los diferentes grupos de muestras se fue igualando, siendo muy similar a las seis semanas de cultivo.

3.2.2.2. Cambios morfológicos

Se tomaron muestras de los diferentes tiempos de cultivo con el fin de incluirlas tanto en parafina como en resina Epon, y realizar posteriormente cortes seriados para su estudio microscópico. Al igual que en el Estudio Preliminar, el criterio que se empleó para decidir qué muestras se fijarían en cada uno de los tiempos de estudio fue su distribución en las placas de cultivo, independientemente del grado de proliferación alcanzado por las DPSC en dichas muestras. Así, tal y como se indicó en Material y Métodos, las muestras de las placas 1 y 2 se procesaron tras una

semana de cultivo, las de las placas 3 y 4 tras dos semanas, las de las placas 5 y 6 tras cuatro semanas, y las de las placas 7 y 8 tras seis semanas.

Para una mejor comprensión de los cambios morfológicos observados, éstos se valoraron en relación a tres parámetros:

- Relativos al tratamiento de la matriz: se valoraron en función de si la matriz dentaria empleada había sido tratada con hipoclorito sódico o con clorhexidina.
- Relativos al tiempo de cultivo: se valoraron en función del tiempo que permanecieron en cultivo.
- Relativos a la superficie: se valoraron en función de la superficie de la matriz dentaria sobre la que proliferaron las DPSC.

Relativos al tratamiento de la matriz

En general no se observaron diferencias destacables entre las muestras con matrices tratadas con hipoclorito sódico (grupo HS) y las muestras con matrices tratadas con clorhexidina (grupo CL). Sin embargo, al igual que ocurriera en el Ensayo Preliminar, en algunas de las muestras con matrices tratadas con clorhexidina (grupo CL) se observaron restos tisulares sobre algunas zonas de la superficie de la

matriz dentaria que parecían dificultar la formación de nuevas capas celulares (figura 26).

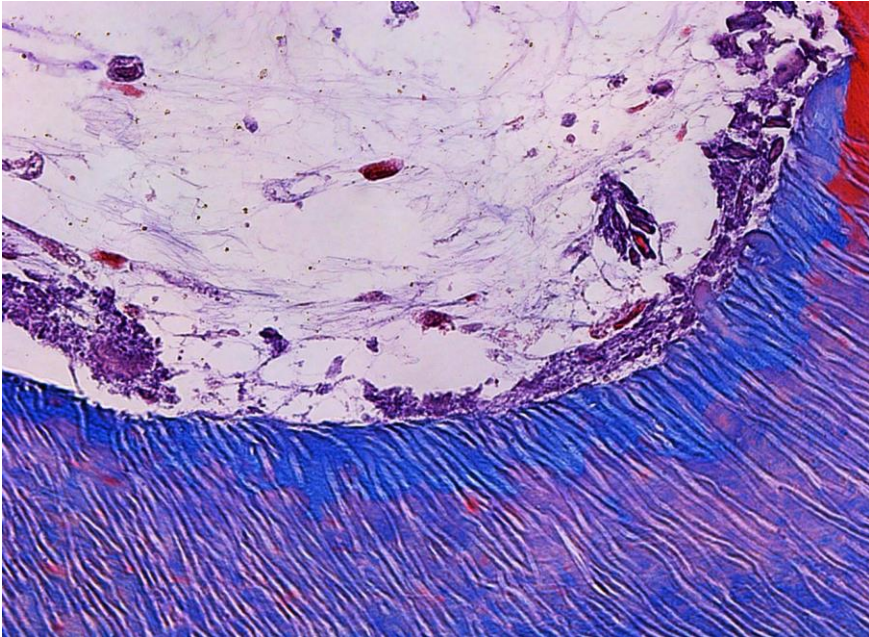


Figura 47. Sección de una muestra del grupo CL a las seis semanas de cultivo. Sobre la dentina se observaron restos tisulares que dificultaron la formación de capas celulares sobre esta superficie. Tricómico de Masson, 40x.

Relativos al tiempo de cultivo

Tras una semana de cultivo, y al igual que ocurriera en el Estudio Preliminar, al procesar las muestras para su inclusión en parafina y resina Epon se observó que la unión

entre las capas celulares formadas por las DPSC y las matrices dentarias era muy débil y poco estable, desprendiéndose con facilidad e imposibilitando el análisis a microscopía óptica y electrónica mediante la realización de cortes seriados.

A las dos semanas de cultivo, al procesar las muestras para su inclusión en parafina y resina Epon, se observó que la unión entre las capas celulares formadas por las DPSC y las matrices dentarias seguía siendo débil y poco estable.

A pesar de esto, en 4 de las muestras estudiadas las DPSC permanecieron unidas a la matriz dentaria, lo que permitió el estudio a microscopía óptica mediante la realización de cortes seriados.

Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC comenzaron a adoptar un aspecto estrellado produciendo una matriz intercelular de tipo reticular, aunque no se pudo observar si las células en contacto con la matriz de dentina emitían prolongaciones celulares dentro de los túbulos dentinarios (figura 48).

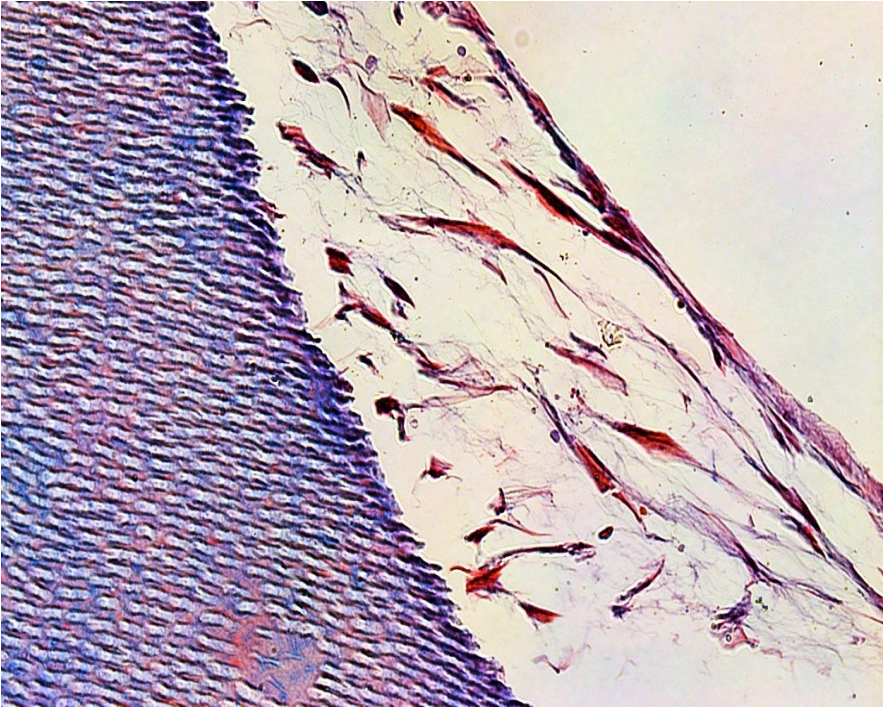


Figura 48. Sección de una muestra del grupo HS a las dos semanas de cultivo. Las DPSC crecidas sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie comenzaron a adoptar un aspecto estrellado rodeadas de una matriz intercelular de tipo reticular. Tricrómico de Masson, 40x.

Sobre el resto de las superficies, dentina con los túbulos paralelos a la superficie y cemento, las DPSC adoptaron una morfología aplanada sobre la matriz dentaria y comenzaron a formar capas celulares cohesionadas (figuras 49 y 50).

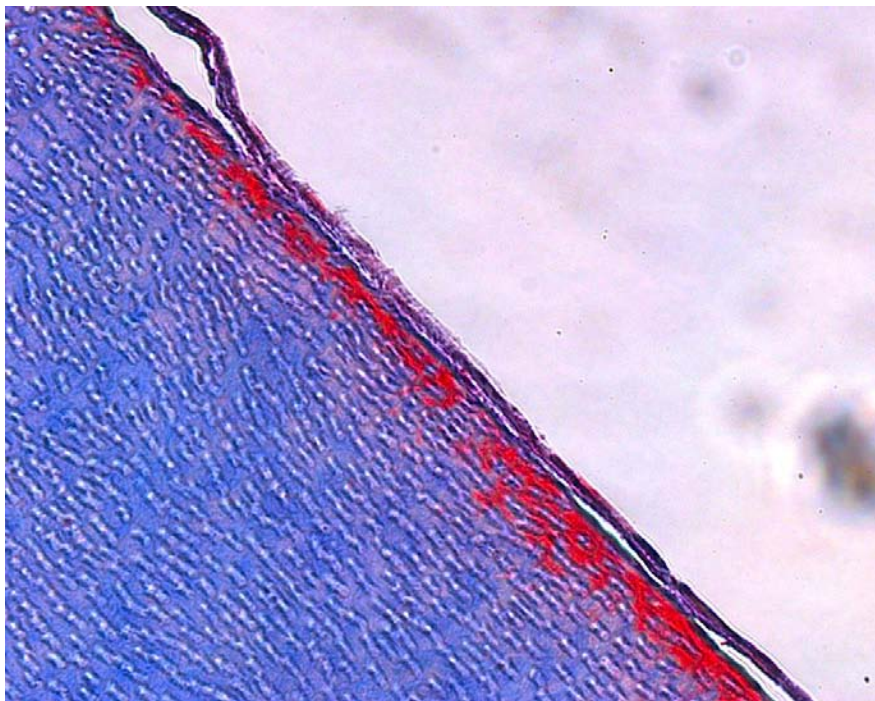


Figura 49. Sección de una muestra del grupo HS a las dos semanas de cultivo. Las DPSC crecidas sobre la dentina con los túbulos paralelos a la adoptaron un aspecto aplanado, formando una capa continua. Tricrómico de Masson, 40x.

A partir de las cuatro semanas de cultivo, al procesar las muestras para su inclusión en parafina y resina Epon se observó que la unión de la capa celular formada por las DPSC sobre las matrices dentarias era fuerte y estable en la mayoría de los casos, lo que posibilitó la realización de cortes seriados para su análisis a microscopías óptica y electrónica.

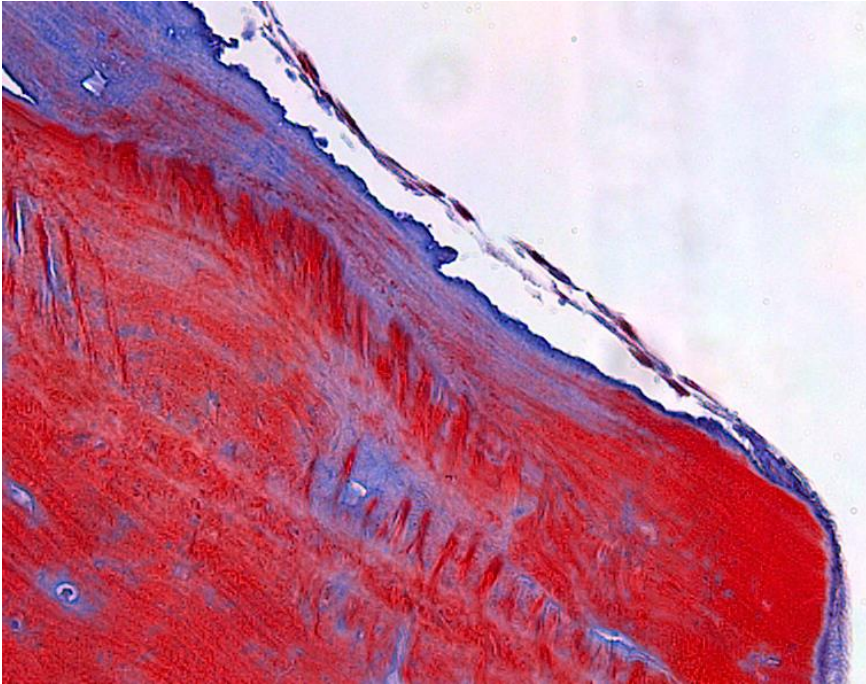


Figura 50. Sección de una muestra del grupo HS a las dos semanas de cultivo. Sobre el cemento las DPSC formaron capas celulares aplanadas. Tricrómico de Masson, 20x.

En general, a partir de este tiempo de cultivo, las estructuras tisulares formadas por las DPSC sobre las diferentes superficies de las matrices dentarias, fueron aumentando en grosor a medida que se incrementó el tiempo de cultivo, pero no variaron sustancialmente su aspecto y sus características histológicas. En especial, en la mayoría de las muestras se evidenció un gran aumento de la matriz intercelular sintetizada (figura 51).

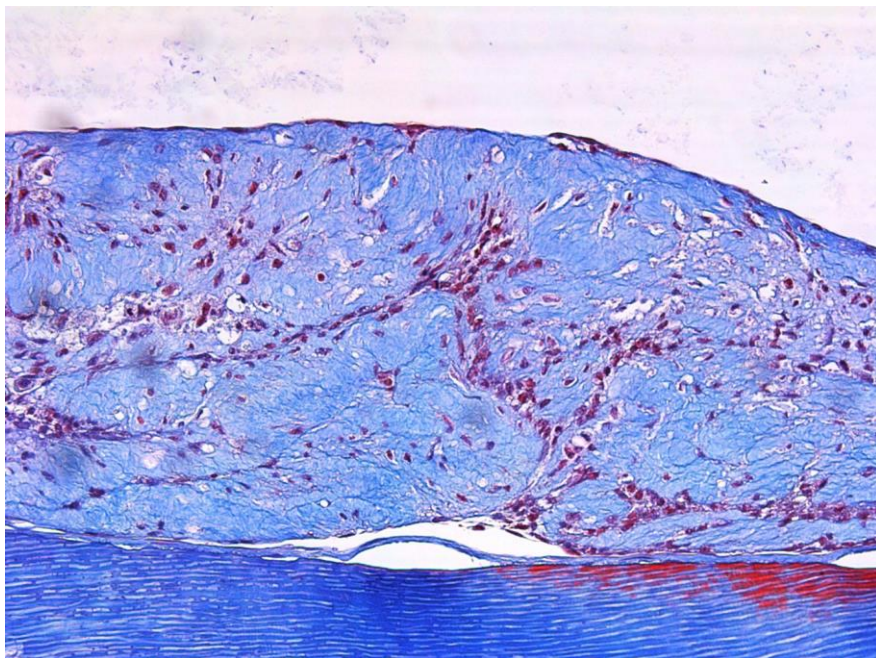


Figura 51. Sección de una muestra del grupo CL a las seis semanas de cultivo. Sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie las DPSC forman capas aplanadas, produciendo abundante matriz intercelular rica en fibras de colágeno. Tricrómico de Masson, 40x.

Sin embargo, al igual que se observó en el Estudio Preliminar, en algunos casos, al aumentar el tiempo de cultivo, sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie se produjo una condensación de las capas celulares, sustituyéndose el entramado de aspecto reticular que encontramos en otras muestras por una matriz intercelular densa rica en fibras de colágeno y mucopolisacáricos. En estos casos las capas celulares formadas por las DPSC fueron más compactas, con un gran

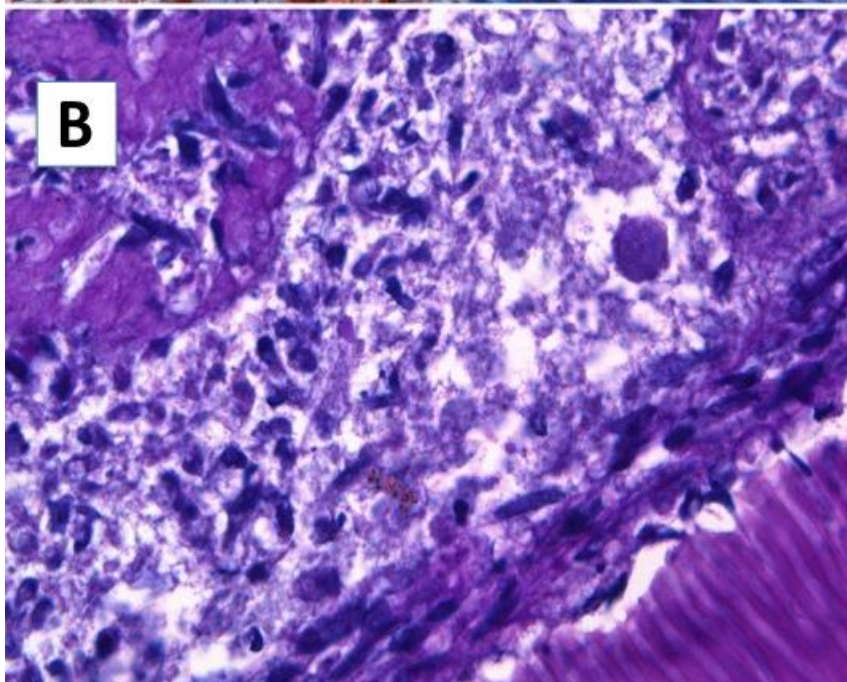
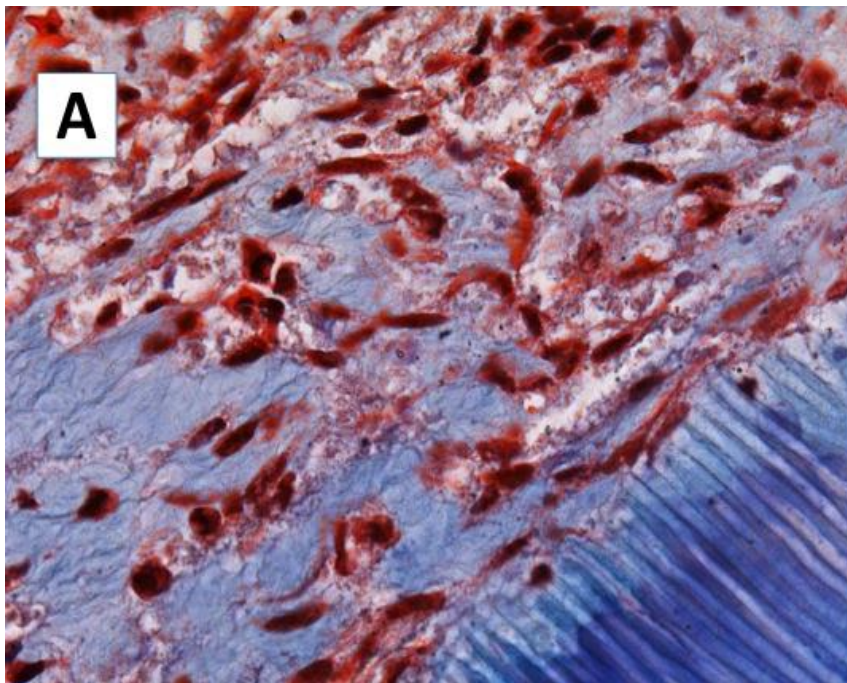
aumento de la celularidad, y se observaron zonas de aspecto necrótico con restos celulares y fibrosos en las zonas más profundas (figura 52).

Relativos a la superficie

Confirmando los resultados obtenidos en el Estudio Preliminar, se observó un comportamiento diferente de las DPSC en función del tipo de superficie dentaria sobre la que estaban adheridas.

En base a este hecho se diferenciaron tres tipos de superficie:

- I. Sin contacto con la matriz dentaria.
- II. Dentina con los túbulos perpendiculares u oblicuos a la superficie. En ella se pueden observar los orificios correspondientes a las entradas de los túbulos dentinarios.
- III. Dentina con los túbulos paralelos a la superficie. Es más o menos lisa, pues no presenta los orificios correspondientes a las entradas de los túbulos dentinarios. En esta categoría también se incluye la superficie externa de la dentina en la que se ha eliminado la capa de cemento ya que, aunque puede presentar túbulos perpendiculares a la superficie, la entrada a dichos túbulos está parcialmente obliterada.



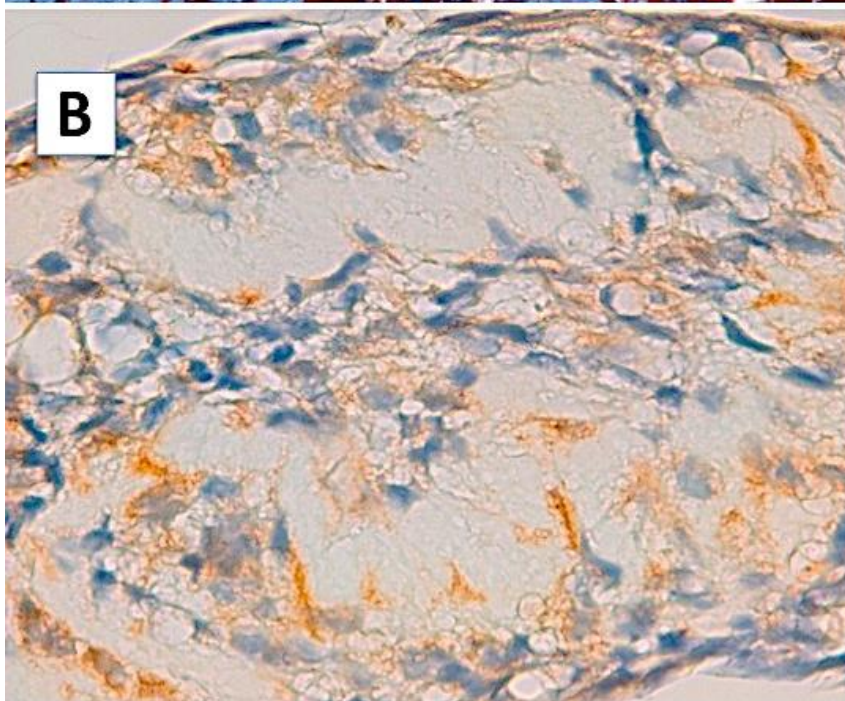
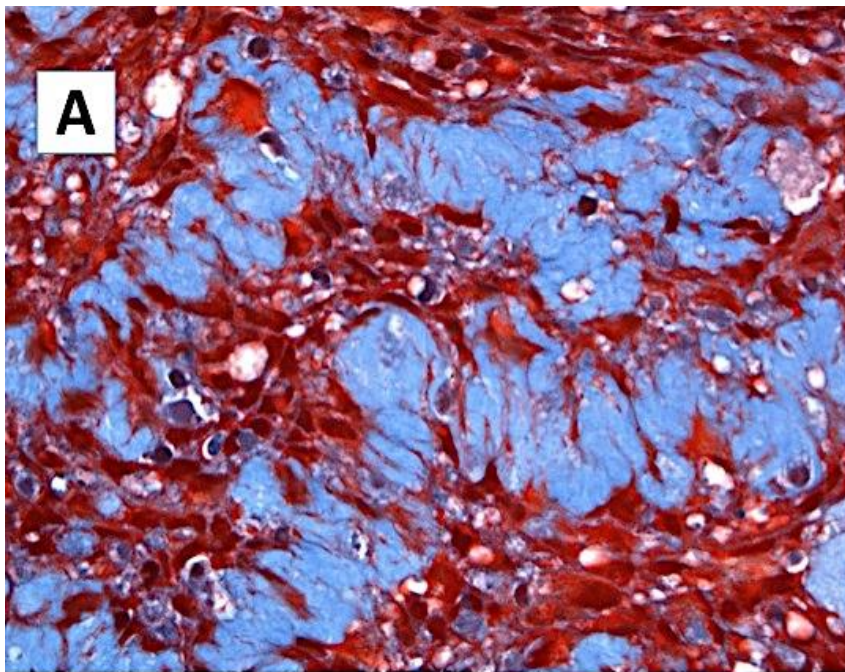
← *Figura 52. Secciones de una muestra del grupo HS a las seis semanas de cultivo. A: se observa una matriz intercelular densa con abundante colágeno. Tricrómico de Masson. 40x. B: la capa celular sobre la dentina es compacta, y se observa una matriz rica en mucopolisacáridos. PAS, 40x, aumentos originales.*

IV. Cemento.

I. Sin contacto con la matriz dentaria

En las zonas alejadas de la matriz dentaria las DSPC formaron capas celulares bien cohesionadas con gran producción de matriz intercelular rica en densas fibras de colágeno. Asimismo, se observó cierto grado de organización en el conjunto, pues las DPSC formaban capas de gran densidad celular, alternándose con capas casi acelulares de matriz neoformada, de un espesor más o menos constante (figura 53A).

La detección inmunohistoquímica de sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) en cortes seriados de las muestras incluidas en bloques de parafina, puso de manifiesto abundantes depósitos de esta proteína tanto en el citoplasma de las DPSC como en la matriz intercelular. Estos depósitos parecían especialmente abundantes en la zona periférica a la matriz, lo que podría indicar el inicio del proceso de mineralización de dicha matriz (figura 53B).

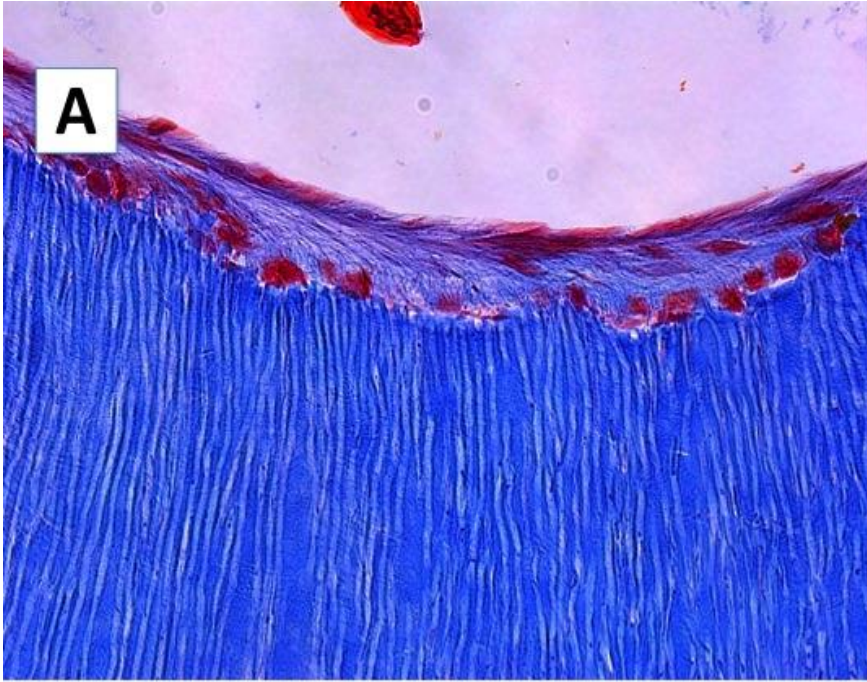


← *Figura 53. Secciones de una muestra del grupo HS a las cuatro semanas de cultivo. A: Las DPSC formaron gruesas capas celulares, con abundante producción de matriz rica en colágeno. Tricómico de Masson. 40x. B: Se observaron depósitos de DSPP intracelulares y en la matriz sintetizada. Detección inmunohistoquímica de DSPP, 40x.*

II. Dentina con los túbulos perpendiculares u oblicuos a la superficie

Al igual que en el Estudio Preliminar, cuando las DPSC crecieron adheridas a la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie, las situadas en contacto con la matriz formaron una capa poco cohesionada, adoptando una morfología aplanada paralela a la superficie y rodeándose de matriz extracelular rica en colágeno (figura 54A).

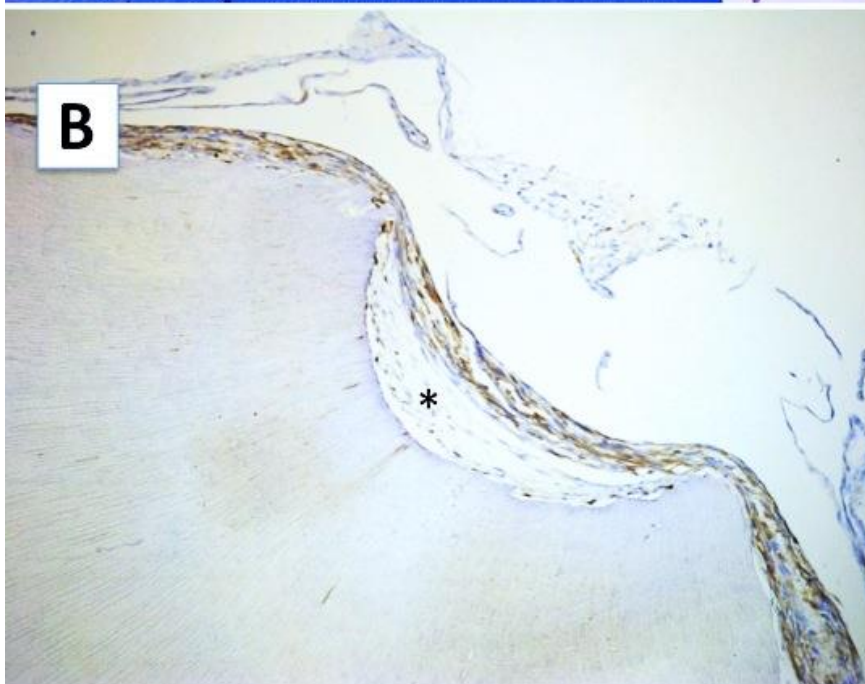
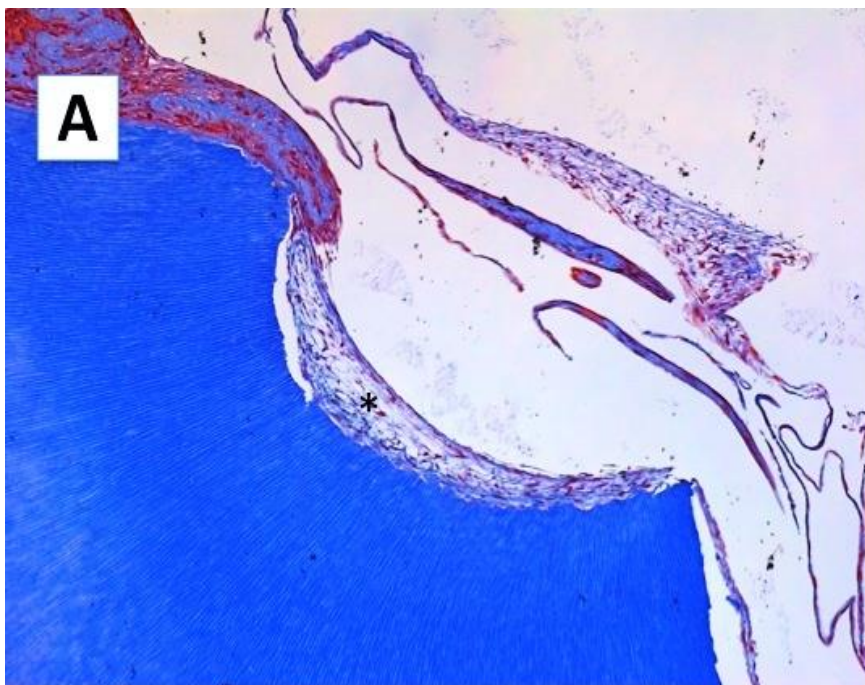
La detección inmunohistoquímica de DSPP en cortes seriados de las muestras incluidas en bloques de parafina, mostró la presencia de esta proteína en el citoplasma de gran parte de las células, así como en la prolongación citoplasmática que emitían hacia el interior de los túbulos dentinarios (figura 54B).



← *Figura 54. Secciones de una muestra del grupo HS a las cuatro semanas de cultivo. A: Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC adoptan una morfología odontoblástica, emitiendo prolongaciones celulares dentro de los túbulos dentinarios. Tricrómico de Masson, 40x. B: las células presentan depósitos de DSPP intracelulares. Detección inmunohistoquímica de DSPP, 40x.*

Asociadas a estas células de aspecto odontoblástico encontramos un estroma de aspecto reticular con células de morfología estrellada. Al teñir los preparados con tricrómico de Masson se observó que la matriz sintetizada por estas células estrelladas contenía finas fibras de colágeno en forma de malla (figura 55A).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se observó que los depósitos de DSPP en la matriz de aspecto reticular próxima a la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie eran mucho menores que en las capas celulares formadas sobre otras superficies de la matriz dentaria; sin embargo las células de aspecto odontoblástico situadas en contacto con los túbulos dentinarios sí que presentaban depósitos de esta proteína en su citoplasma (figura 55B).



← *Figura 55. Secciones de una muestra del grupo HS a las cuatro semanas de cultivo. A: sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC producen una matriz de aspecto reticular (asterisco). Tricrómico de Masson. 10x. B: en el citoplasma de las células y en la matriz reticular se observaron depósitos de DSPP, pero éstos fueron menores que los observados en las capas celulares formadas sobre otras superficies de la matriz dentaria. Detección inmunohistoquímica de DSPP, 10x.*

Al estudiar las muestras a mayores aumentos se observó cómo las DPSC adoptaron una morfología similar a los odontoblastos, en algunos casos orientándose perpendicularmente a la superficie de la dentina, emitiendo una o varias prolongaciones dentro de los túbulos dentinarios a modo de proceso odontoblástico (figura 56), confirmando los hallazgos del Estudio Preliminar.

Asimismo, mediante técnicas inmunohistoquímicas se evidenciaron depósitos de DSPP en el citoplasma perinuclear de estas células de aspecto odontoblástico y en sus prolongaciones celulares, alojadas en los túbulos dentinarios (figura 57).

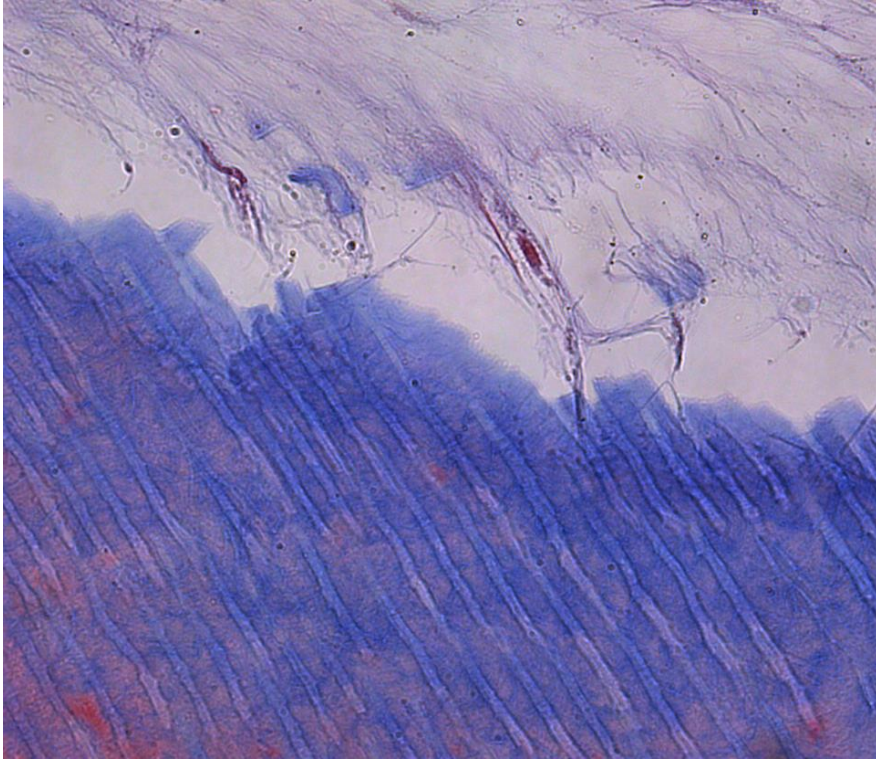
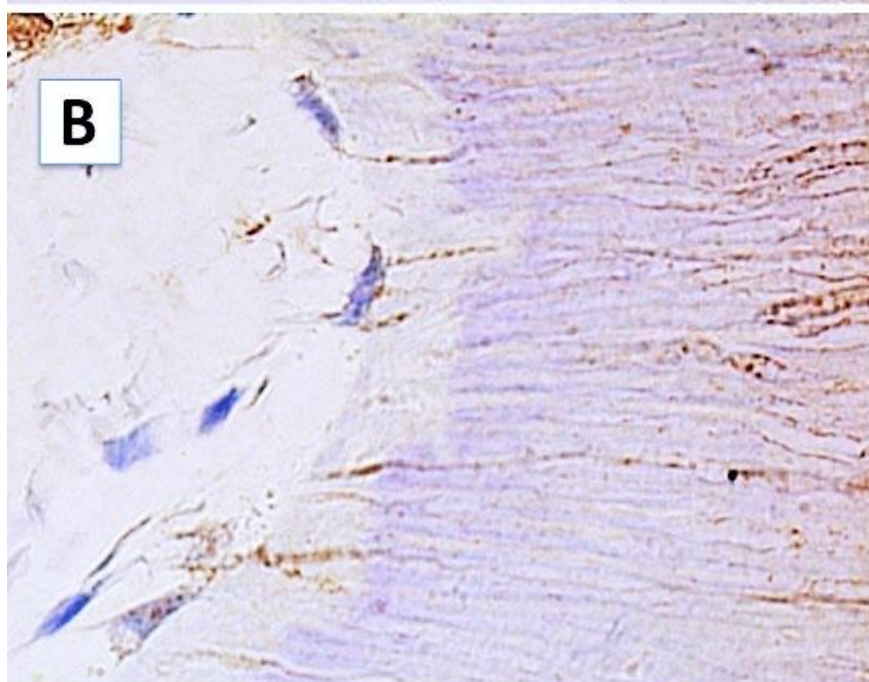
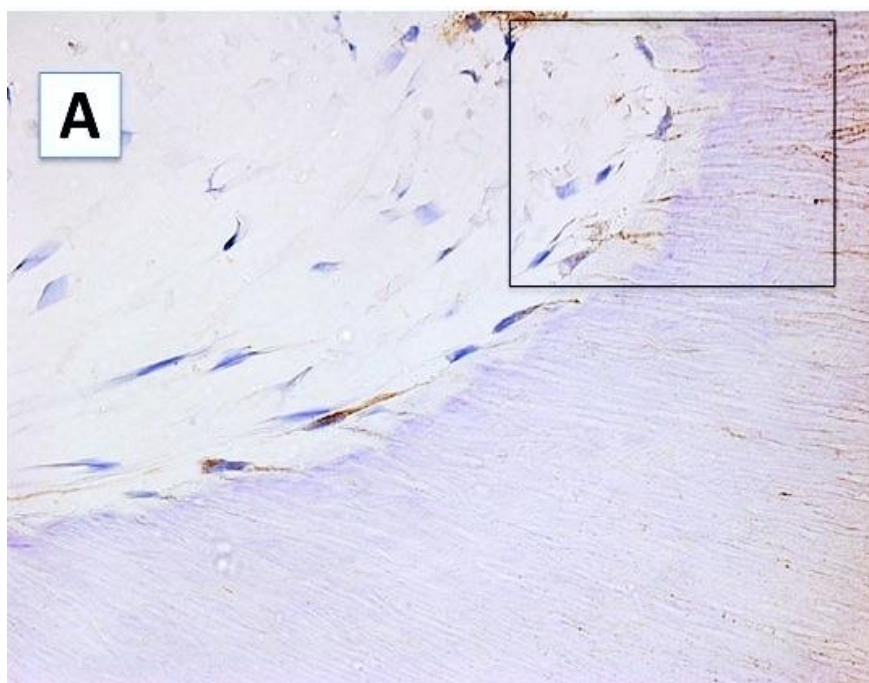


Figura 56. Sección de una muestra del grupo HS a las seis semanas de cultivo. Dos células pseudo-odontoblásticas emiten varias prolongaciones celulares que discurren por el interior de túbulos dentinarios. Tricrómico de Masson, 100x.

Figura 57. Sección de una muestra del grupo HS a las seis semanas de cultivo. A: Se observan depósitos de DSPP en el citoplasma y en las prolongaciones celulares alojadas en los túbulos dentinarios. Detección inmunohistoquímica de DSPP. 40x. B: Detalle de la región recuadrada en A, 100x. →



El análisis de las muestras mediante microscopía electrónica (MET) confirmó los hallazgos realizados en el estudio a microscopía óptica. Se observó que sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DSPC adoptaron un aspecto odontoblástico, emitiendo prolongaciones dentro de los túbulos dentinarios (figura 58). En estas prolongaciones se observó un alto contenido en filamentos de actina, que podrían intervenir en el proceso de anclaje de la célula a la matriz dentaria.

En las imágenes obtenidas también se puede apreciar la diferencia, a nivel de la estructura de la matriz dentaria, entre la dentina intertubular, rica en fibras de colágeno y con un aspecto más electrodenso, y la dentina peritubular, en la pared de los túbulos dentinarios y con un escaso contenido en fibras de colágeno (figura 58).

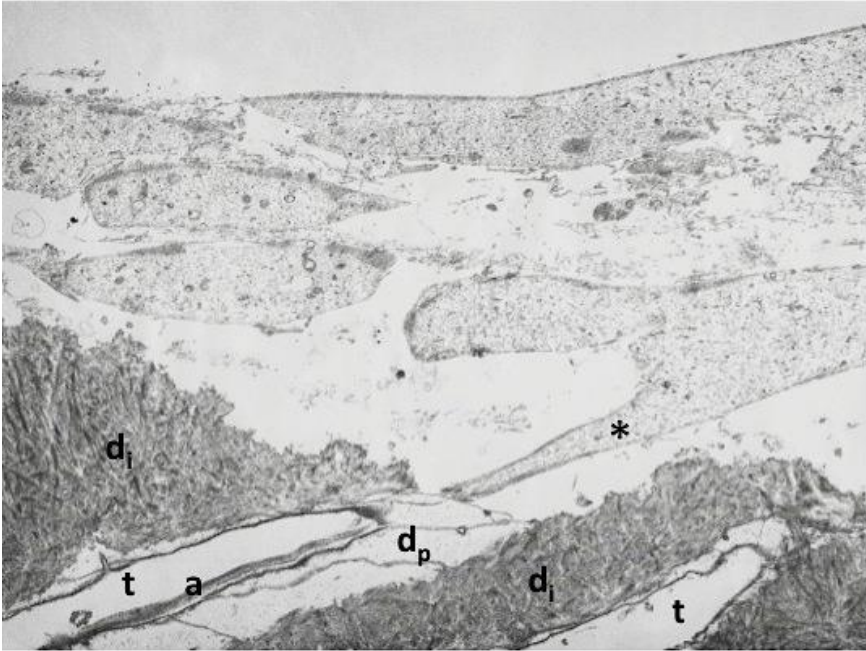


Figura 58. Sección de una muestra del grupo CL a las cuatro semanas de cultivo. Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC adoptan un aspecto alargado, emitiendo prolongaciones citoplasmáticas (asterisco) con gran contenido en filamentos de actina (a) dentro de los túbulos dentinarios (t). Se observa la diferencia entre la dentina intertubular (d_i), con un alto contenido en fibras de colágeno, y la dentina peritubular (d_p), en las paredes de los túbulos dentinarios, pobre en colágeno. MET, 3000x.

Sobre esta superficie las DPSC presentaban un citoplasma irregular, grande y alargado, así como un núcleo voluminoso con cromatina laxa y un nucléolo evidente, rasgo típico de células productoras de matriz. También se observaron abundantes vesículas de secreción, esféricas y electrodensas, y acúmulos de glucógeno en su citoplasma. En las zonas de anclaje a la matriz dentaria y de unión

intercelular se observaron gruesos acúmulos de filamentos de actina (figura 59).

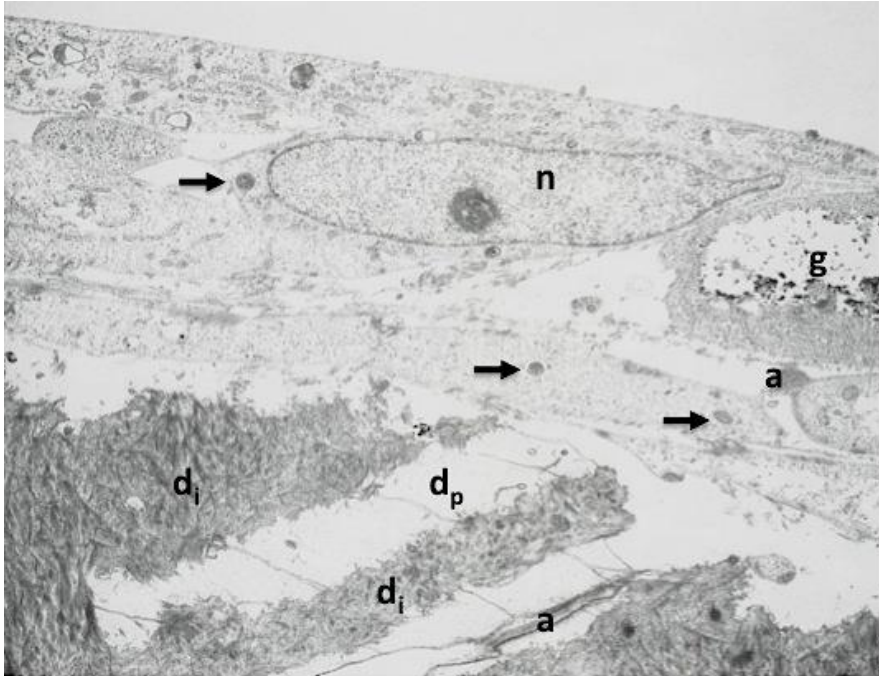
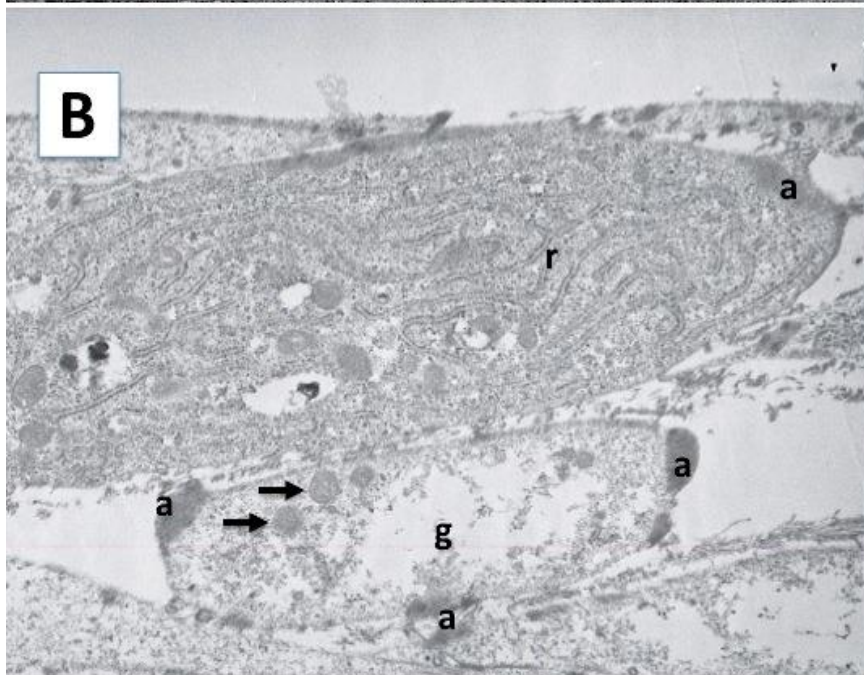
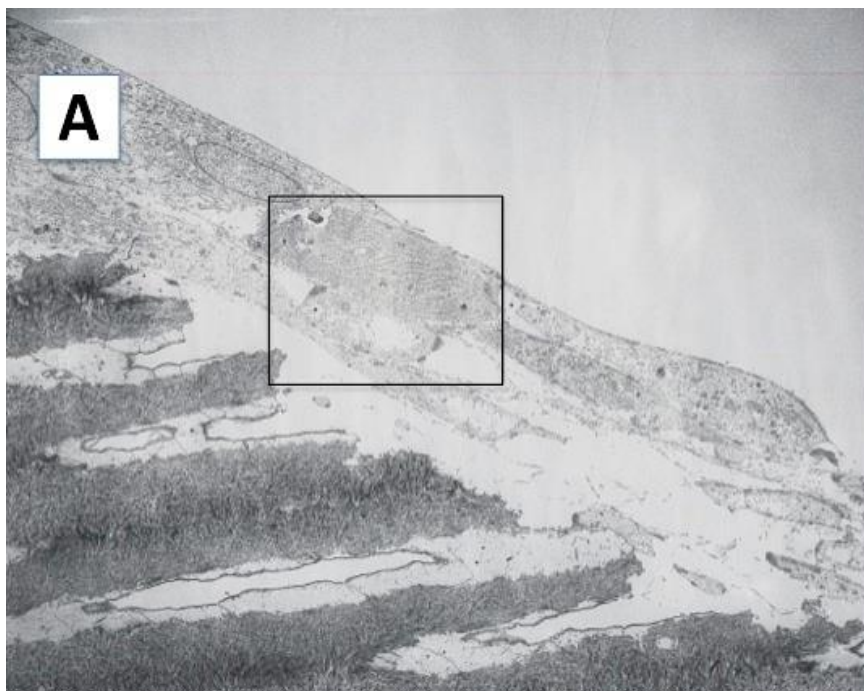


Figura 59. Sección de una muestra del grupo HS a las cuatro semanas de cultivo. Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC adoptan una morfología alargada, presentando un núcleo voluminoso (n), cúmulos de glucógeno (g), vesículas de secreción (flechas) y filamentos de actina (a) en su citoplasma. Dentina intertubular (di) y peritubular (dp). MET, 2500x.

Asimismo, las DPSC presentaban un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado, como corresponde a células de gran actividad de síntesis (figura 60).

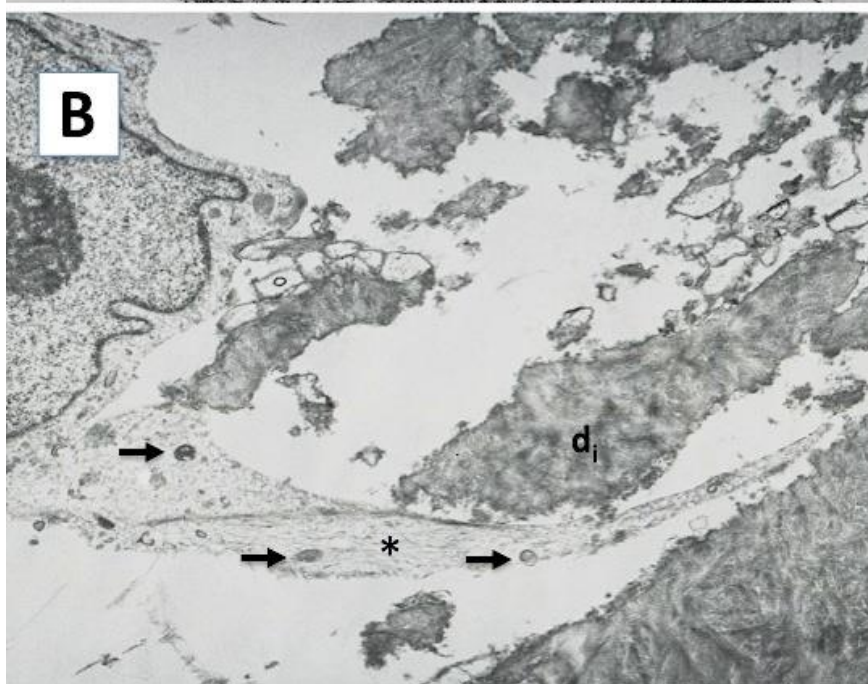
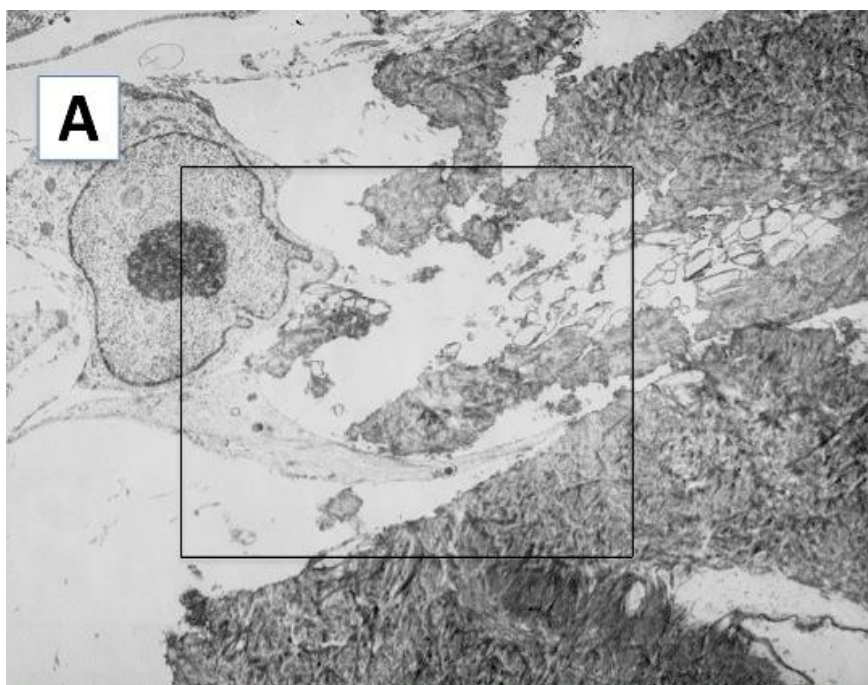


← *Figura 60. Sección de una muestra del grupo HS a las cuatro semanas de cultivo. A: Sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC adoptan una morfología alargada. MET. 1200x. B: Detalle de la región recuadrada en A. Se observan cúmulos de glucógeno (g), un retículo endoplasmático rugoso (r) muy voluminoso, vesículas de secreción (flechas) y filamentos de actina (a) en su citoplasma. MET, 5000x.*

En el estudio de las diferentes muestras se observó que las DPSC adoptaron formas irregulares sobre esta superficie, pero siempre con un núcleo voluminoso con cromatina laxa y un nucléolo evidente. Los cortes obtenidos sí permitieron visualizar cómo las DPSC, adoptando un aspecto odontoblástico, emitieron prolongaciones celulares a modo de proceso odontoblástico en el interior de los túbulos dentinarios de la matriz dentaria.

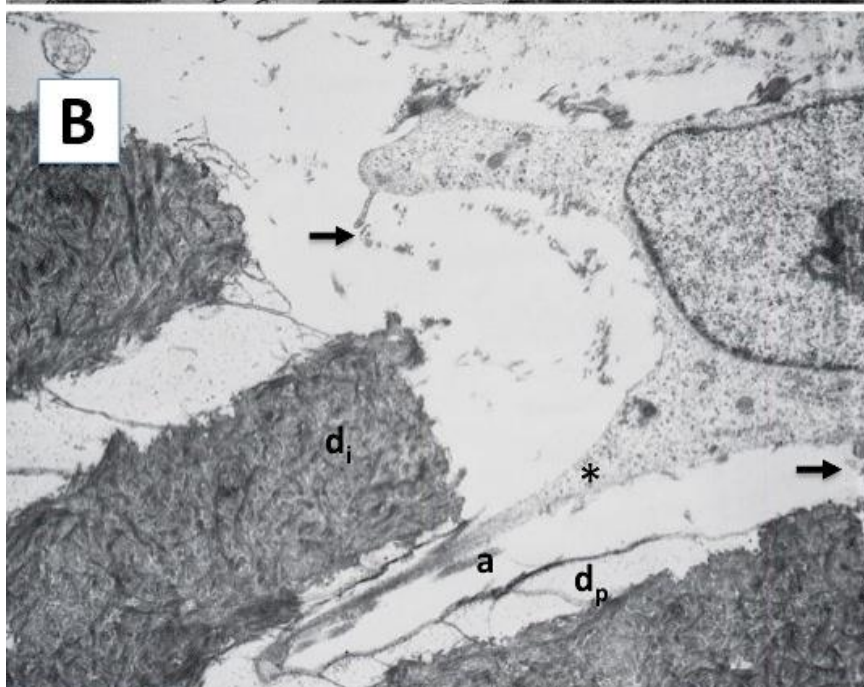
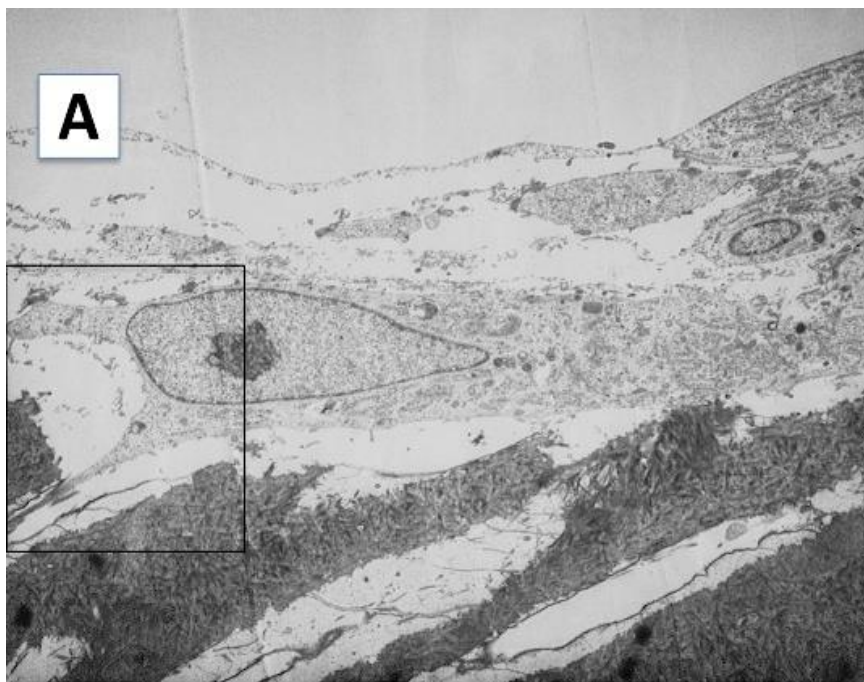
También se observó la presencia de vesículas de secreción no solo en el citoplasma perinuclear, como se expuso anteriormente, sino también a nivel de estas prolongaciones citoplasmáticas (figura 61).

Figura 61. Sección de una muestra del grupo HS tras cuatro semanas de cultivo. A: Se observa una célula de aspecto odontoblástico sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie, emitiendo una prolongación dentro de uno de estos túbulos. MET. 3000x. B: Detalle de la región recuadrada en A. A mayor aumento, en la prolongación celular (asterisco), se observan vesículas de secreción (flechas). Dentina intertubular (d). MET, 10000x. →



Las imágenes obtenidas confirmaron que, además del aspecto odontoblástico y los rasgos típicos de células de gran actividad secretora, como son la presencia de cromatina laxa en el núcleo y un retículo endoplasmático rugoso abundante, las DPSC se encontraban secretando activamente matriz rica en fibras de colágeno sobre la superficie de la matriz dentaria, pues se pudo observar a DPSC liberando las vesículas de secreción sobre dicha superficie (figura 62).

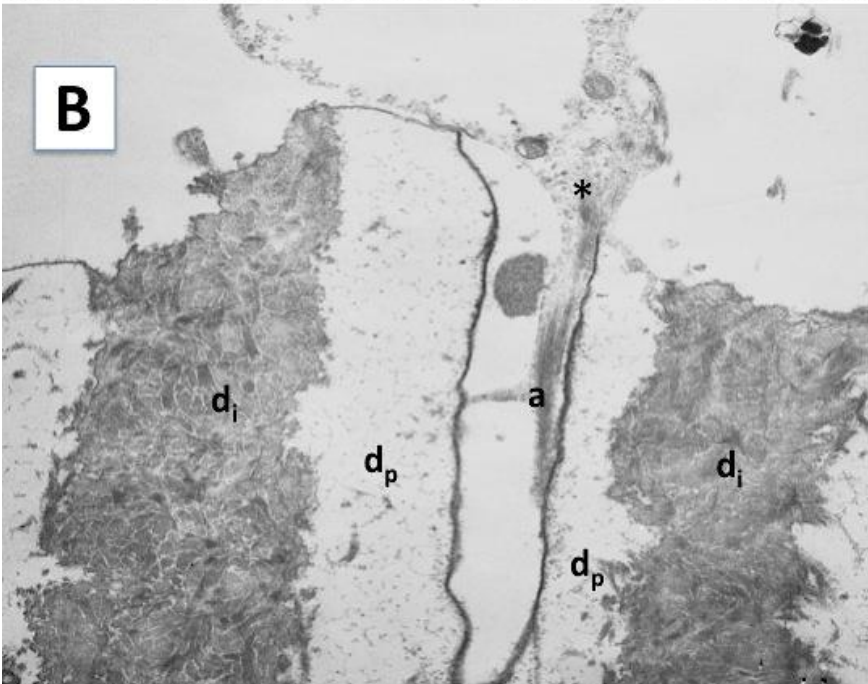
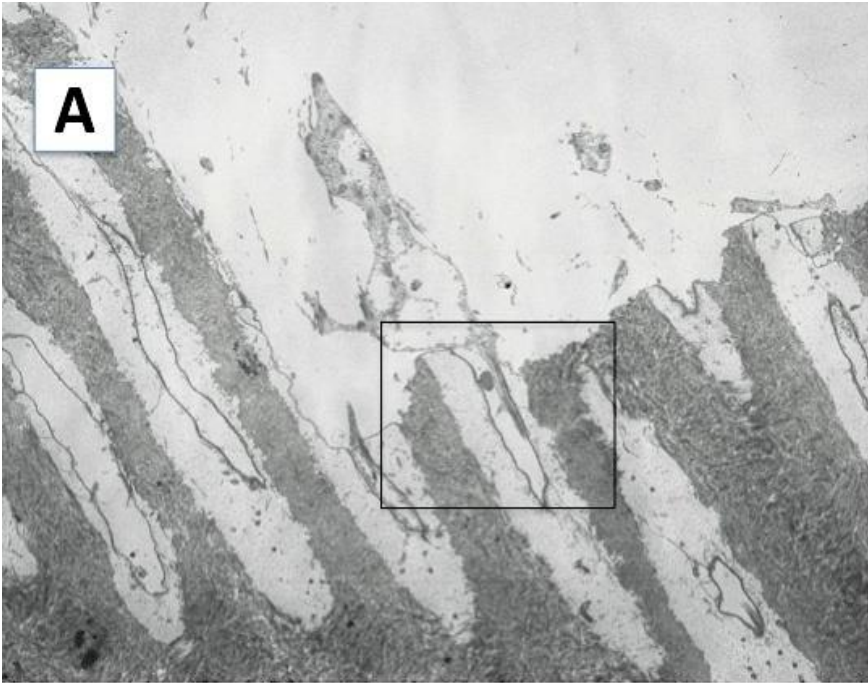
Figura 62. Sección de una muestra del grupo HS a las seis semanas de cultivo. A: Célula de aspecto odontoblástico sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie emitiendo una prolongación dentro de un túbulo dentinario. MET. 1500x. B: Detalle de la región recuadrada en A. En la prolongación celular (asterisco), se observan filamentos de actina (a). La célula está secretando matriz rica en fibras de colágeno (flechas). Dentina intertubular (d_i) y peritubular (d_p). MET, 4000x. →

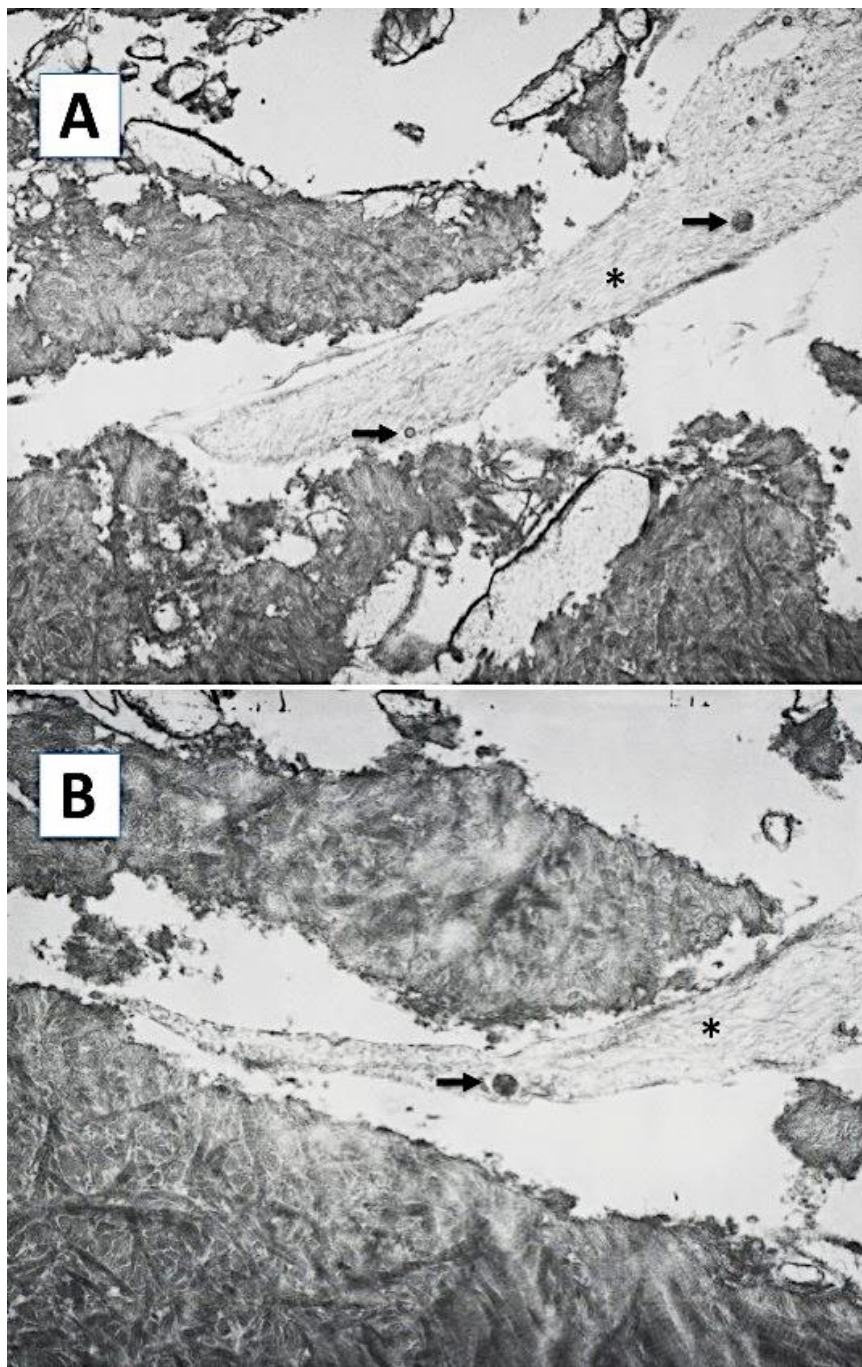


En algunas imágenes se observó la presencia de gruesos filamentos de actina en las prolongaciones citoplasmáticas que se encontraban alojadas en los túbulos dentinarios, probablemente relacionados tanto con el mantenimiento de la forma de dichas prolongaciones celulares, así como con el anclaje de la célula a la matriz dentaria (figura 63).

Al estudiar las muestras a mayores aumentos se observó que estas prolongaciones celulares presentaban una forma cónica y un grosor variable, ocupando gran parte de la luz, aunque no totalmente, del túbulo dentinario. En ellas se pudo observar un citoesqueleto muy desarrollado, con abundantes microtúbulos y microfilamentos. Además se encontraron abundantes vesículas de secreción, de tamaño variable y con un contenido electrodenso (figura 64).

Figura 63. Sección de una muestra del grupo CL a las seis semanas de cultivo. A: Se observa una célula de aspecto odontoblástico emitiendo una prolongación dentro de un túbulo dentinario. MET. 1500x. B: Detalle de la región recuadrada en A. En la prolongación celular (asterisco), se observan una gran cantidad de filamentos de actina (a). Dentina intertubular (d_i) y peritubular (d_p). MET, 5000x. →

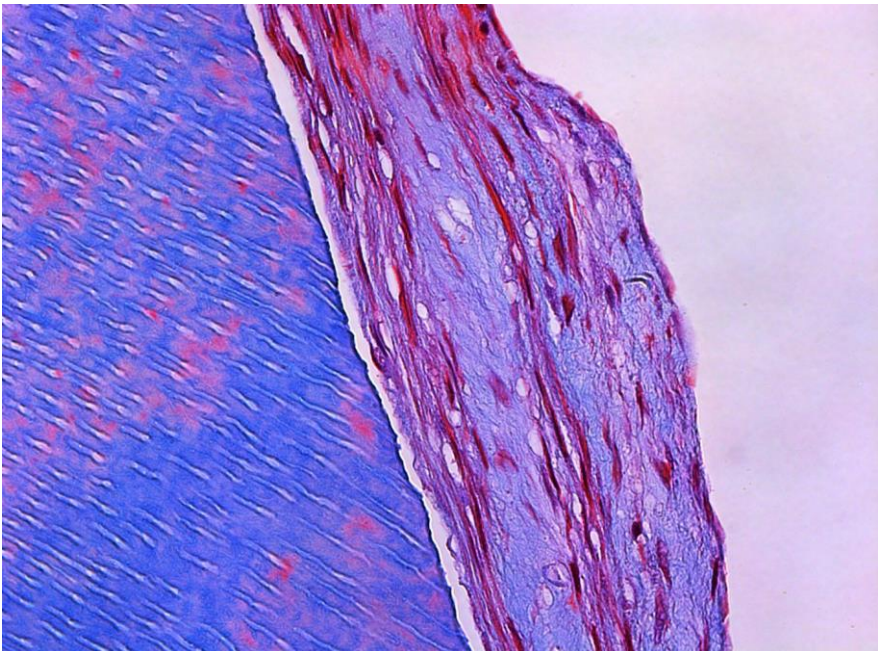




← *Figura 64. Secciones de una muestra del grupo HS a las seis semanas de cultivo. A y B: Detalles de las prolongaciones celulares (asterisco) emitidas por las DPSC en los túbulos dentinarios. En ellas se observan vesículas de secreción (flechas), microtúbulos y microfilamentos. MET, 10000x.*

III. Dentina con los túbulos paralelos a la superficie

Sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie y sobre la superficie externa de la dentina las DPSC adoptaron una morfología aplanada, formando capas bien cohesionadas y produciendo abundante matriz intercelular sobre la matriz dentaria. Al teñir los preparados con tricrómico de Masson se observó que esta matriz era rica en colágeno (figura 65).



← *Figura 65. Sección de una muestra del grupo CL a las cuatro semanas de cultivo. Sobre la capa externa de la dentina las DPSC forman capas aplanadas, produciendo abundante matriz intercelular rica en fibras de colágeno. Tricrómico de Masson, 40x.*

Al estudiar las muestras a MET, se observó que las DPSC adoptaron una morfología aplanada, formando capas más cohesionadas y produciendo abundante matriz intercelular rica en fibras de colágeno sin una orientación definida en relación a la superficie de la matriz dentaria (figura 66).

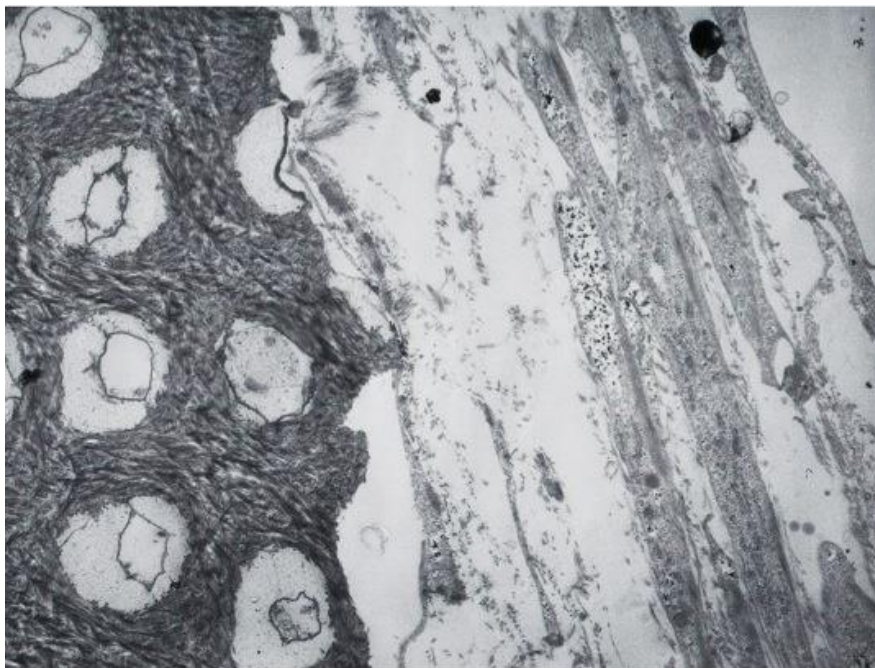
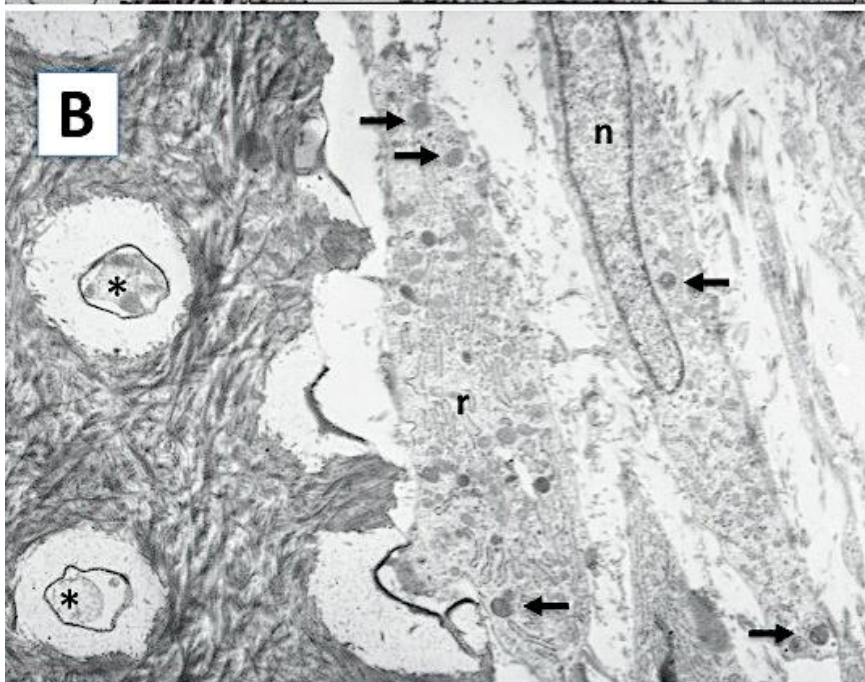
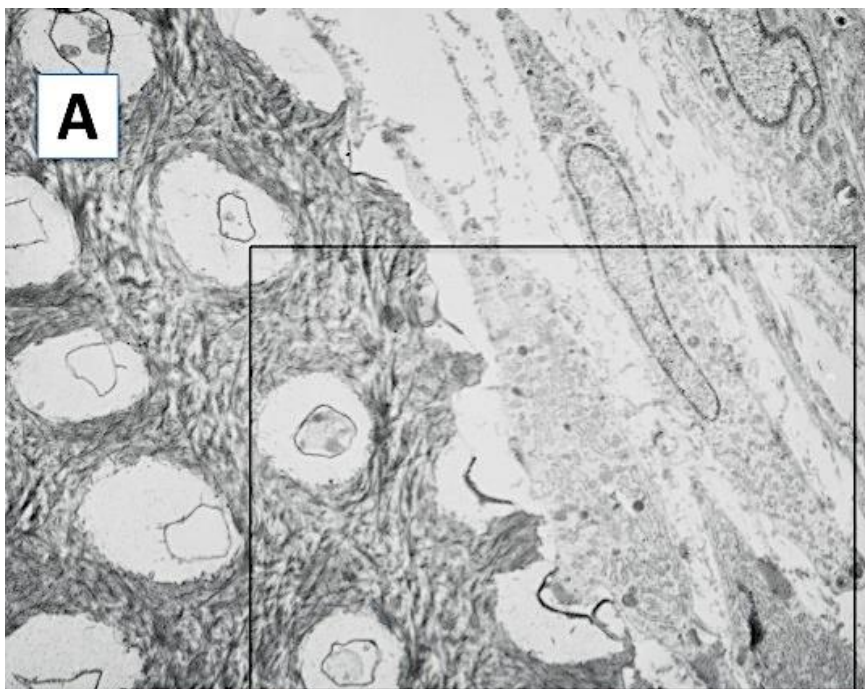


Figura 66. Sección de una muestra del grupo HS a las cuatro semanas de cultivo. Sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie las DPSC forman capas celulares aplanadas, produciendo abundante matriz intercelular rica en colágeno. MET, 3000x.

Al igual que sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie, sobre esta superficie las DPSC presentaban también los rasgos de una gran actividad secretora: un núcleo voluminoso con la cromatina laxa, un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado y gran cantidad de vesículas de secreción (figura 67).

En los cortes obtenidos se observaron algunas prolongaciones celulares alojadas en los túbulos dentinarios. El origen de estas prolongaciones podrían ser las células situadas sobre esta superficie (dentina con los túbulos paralelos a la superficie), lo que supondría que habrían podido emitirla a través de alguna comunicación lateral de los túbulos, o podrían provenir de células situadas en otras superficies más alejadas (dentina en la que los túbulos están orientados de forma perpendicular a la superficie), pues, como se pudo observar en las imágenes obtenidas en el estudio a microscopía óptica, estas prolongaciones celulares en algunos casos son de gran longitud.

También se observaron importantes acúmulos citoplasmáticos de filamentos de actina en las zonas de anclaje intercelular (figura 68).



← *Figura 67. Sección de una muestra del grupo CL a las seis semanas de cultivo. A: Se observan células aplanadas sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie. MET, 2500x. B: Detalle de la región recuadrada en A. En el citoplasma de éstas células se observa un núcleo voluminoso (n), un retículo endoplasmático rugoso (r) muy desarrollado y abundantes vesículas de secreción (flechas). En el interior de los túbulos dentinarios se observan algunas prolongaciones celulares alojadas (asteriscos). MET, 4000x.*

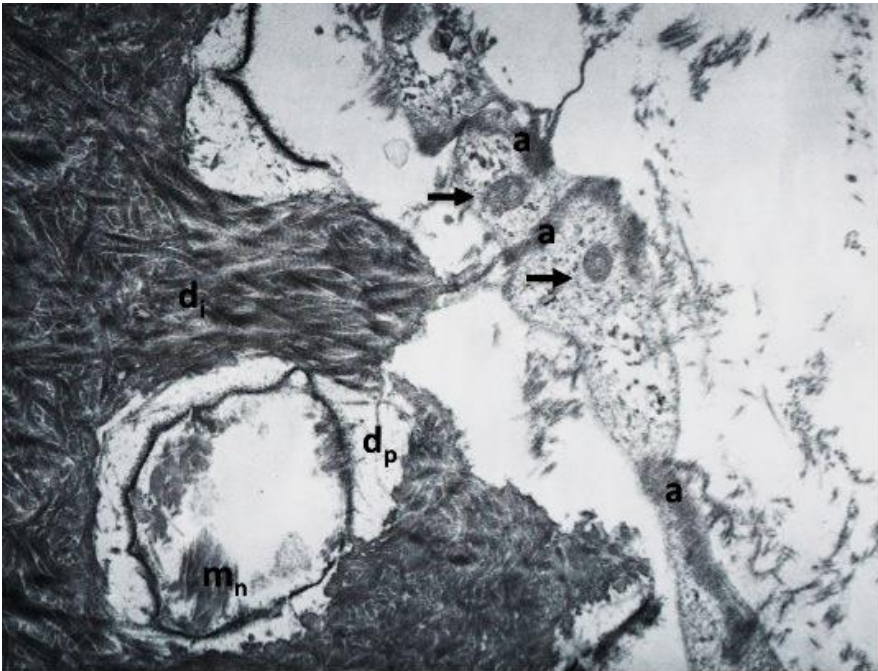
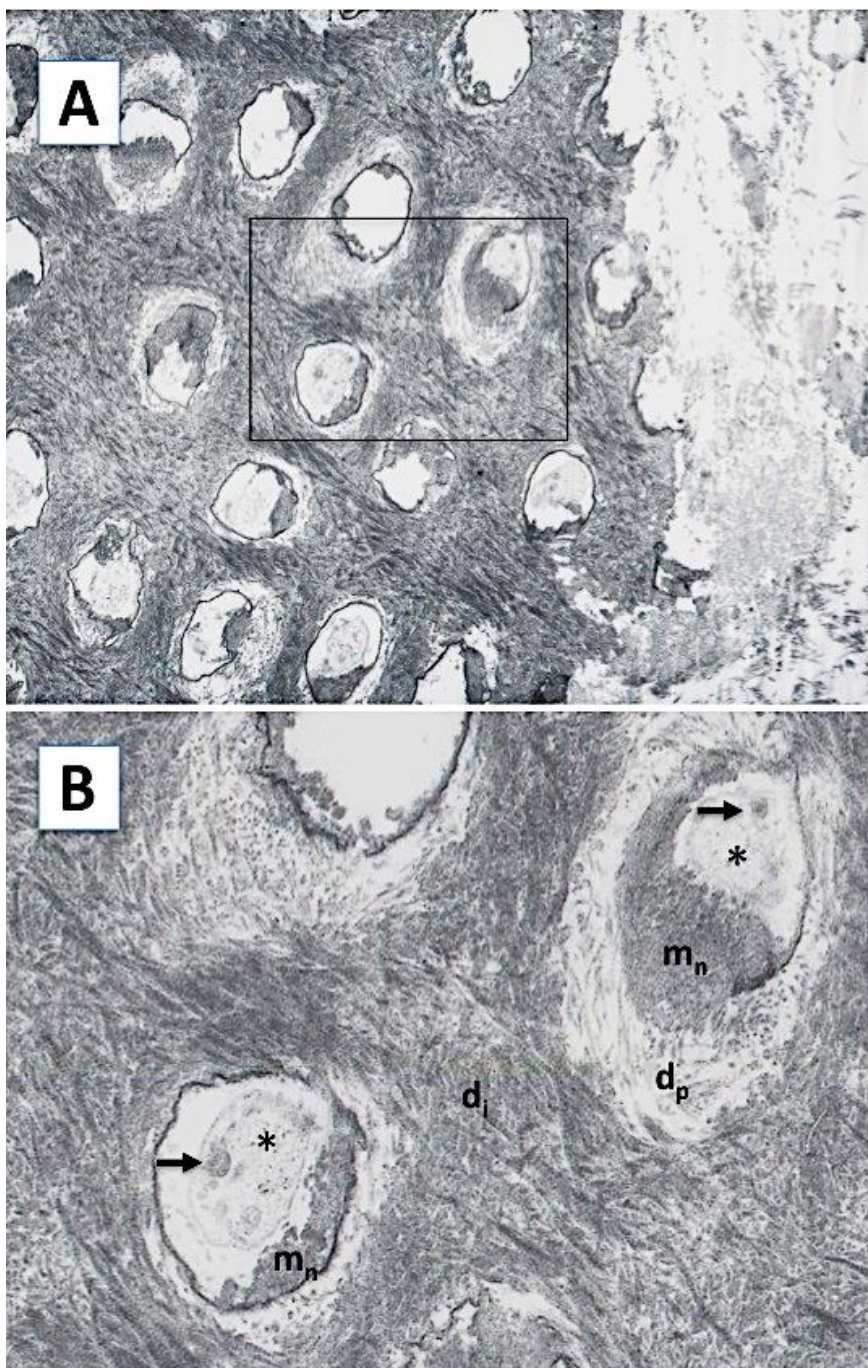


Figura 68. Sección de una muestra del grupo HS a las cuatro semanas de cultivo. En el citoplasma de las DPSC se observan las uniones intercelulares (a), ricas en filamentos de actina, y vesículas de secreción (flechas). En la pared del túbulo dentinario se aprecian depósitos de matriz neoformada (m_n) rica en colágeno. Dentina intertubular (d_i) y peritubular (d_p). MET, 10000x.

En relación a los túbulos dentinarios seccionados transversalmente, en algunas zonas se observó que la mayoría de ellos estaban ocupados por prolongaciones celulares, probablemente provenientes de las células odontoblásticas situadas sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie.

Alrededor de estas prolongaciones celulares y sobre la pared de los túbulos, se observaron depósitos de matriz extracelular no mineralizada y rica en fibras de colágeno. Al estudiar la muestra a mayores aumentos, al igual que en los cortes longitudinales correspondientes a la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie, se observó que dichas prolongaciones celulares presentaban en su interior abundantes microtúbulos y microfilamentos, así como vesículas de secreción de aspecto electrodenso (figura 69).

Figura 69. Sección de una muestra del grupo HS a las seis semanas de cultivo. A: Se trata de un corte transversal de los túbulos dentinarios en dentina con los túbulos paralelos a la superficie, en cuyo interior se observan las prolongaciones celulares de las DSPC. MET. 2500x. B: Detalle de la región recuadrada en A. Se observan vesículas de secreción (flechas) dentro de las prolongaciones celulares (asteriscos) alojadas en los túbulos, y depósitos de matriz neoformada (m_n) en las paredes del tubo. Dentina intertubular (d_i) y peritubular (d_p). MET, 10000x. →



Algunas de las imágenes obtenidas permitieron visualizar etapas del proceso de liberación de estas vesículas desde la prolongación alojada dentro del túbulo dentinario, para producir matriz sobre las paredes del túbulo (figura 70).

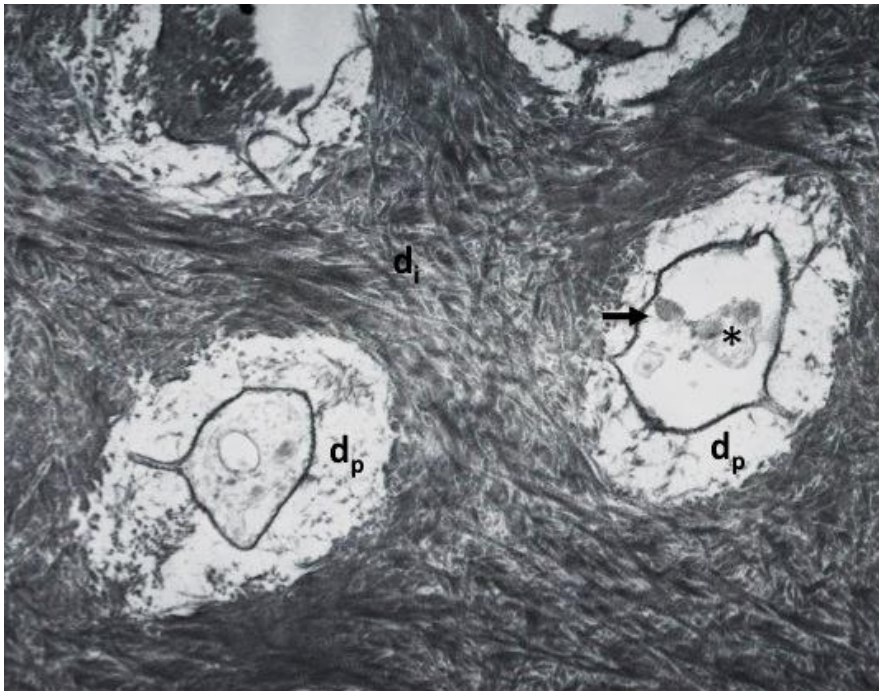


Figura 70. Sección de una muestra del grupo HS a las seis semanas de cultivo. Se observa la secreción de matriz rica en colágeno (flecha) en la pared del túbulo dentinario desde la prolongación celular (asterisco) de una DPSC. Dentina intertubular (d_i) y peritubular (d_p). MET, 8000x.

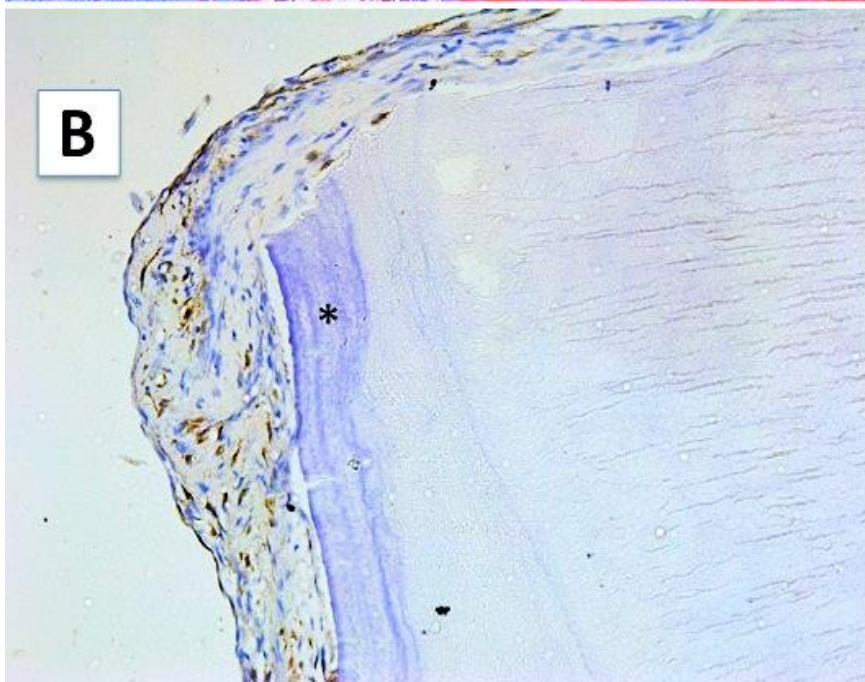
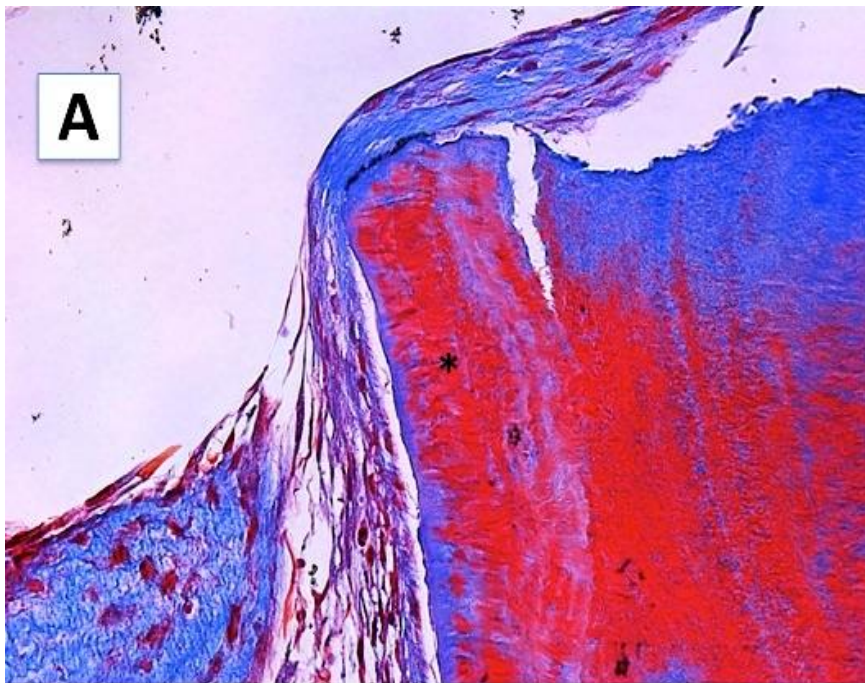
IV. Cemento

Sobre el cemento las DPSC formaron densas capas celulares con abundante matriz intercelular rica en colágeno, similares a las observadas sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie (figura 71A). Mediante técnicas inmunohistoquímicas se observaron abundantes depósitos de DSPP intracelulares en gran parte de las células y en la matriz intercelular (figura 71B).

A mayor aumento se observó la presencia de depósitos de DSPP también en algunas zonas de la matriz intercelular sintetizada (figura 72).

A las seis semanas de cultivo, tal y como se observó en el Estudio Preliminar, sobre el cemento las DPSC formaron capas de células aplanadas con abundante matriz intercelular rica en colágeno. La orientación de las fibras de colágeno sintetizadas directamente sobre la superficie del cemento era predominantemente perpendicular a la misma (figura 73).

Al estudiar las muestras a MET se confirmaron los hallazgos realizados en el estudio a microscopía óptica, pues se observó que las DPSC adoptaron una morfología aplanada, formando capas bien cohesionadas y produciendo abundante matriz intercelular rica en fibras de colágeno.



← *Figura 71. Secciones de una muestra del grupo CL a las cuatro semanas de cultivo. A: Sobre el cemento (asterisco) las DPSC forman capas celulares aplanadas, sintetizando una matriz intercelular rica en colágeno. Tricrómico de Masson, 20x. B: Sobre el cemento (asterisco) se observaron depósitos de DSPP en las células y en la matriz intercelular sintetizada. Detección inmunohistoquímica de DSPP, 20x.*

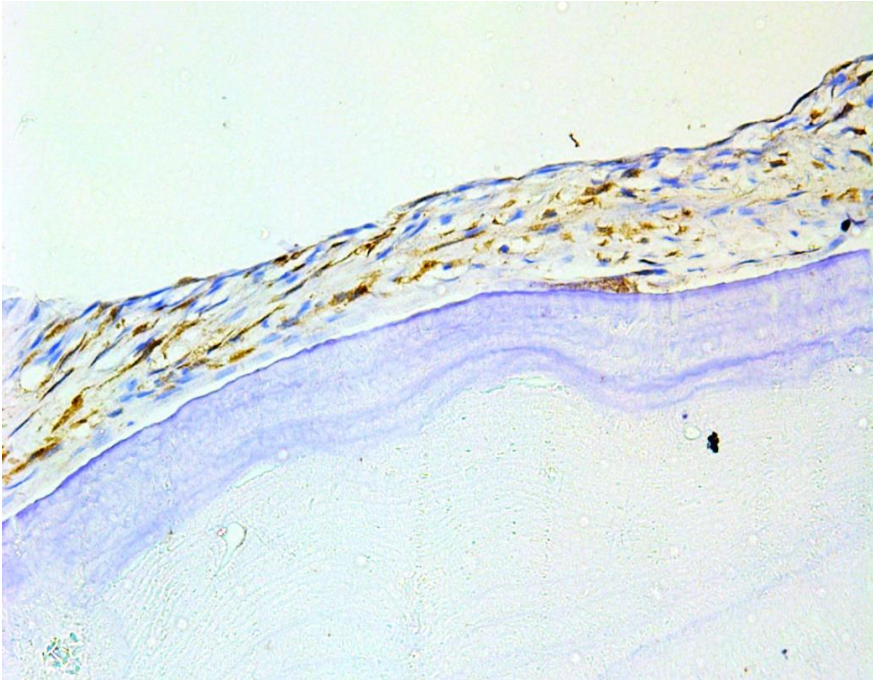


Figura 72. Sección de una muestra del grupo CL a las cuatro semanas de cultivo. Se observan depósitos de DSPP en las células y en la matriz intercelular sintetizada. Detección inmunohistoquímica de DSPP, 40x.

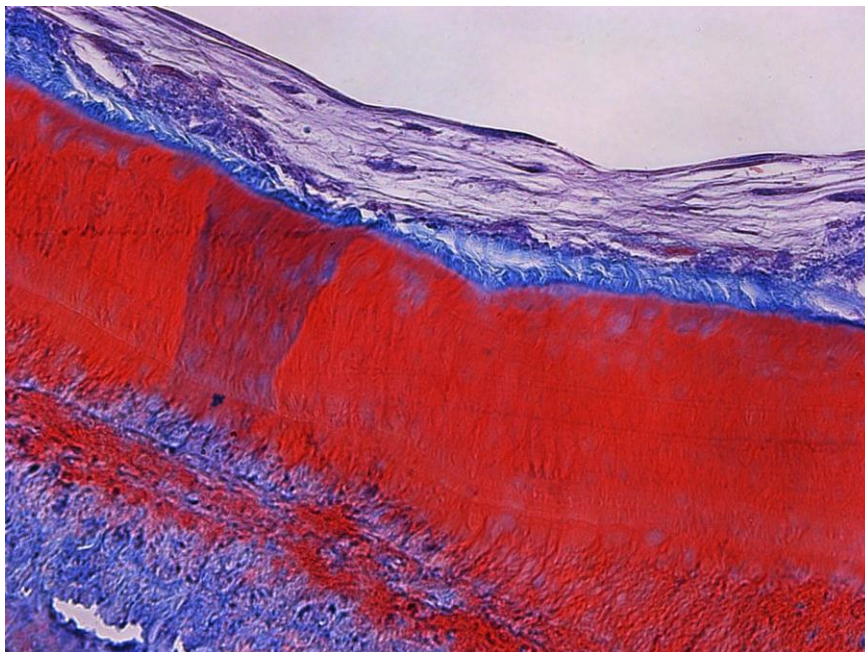
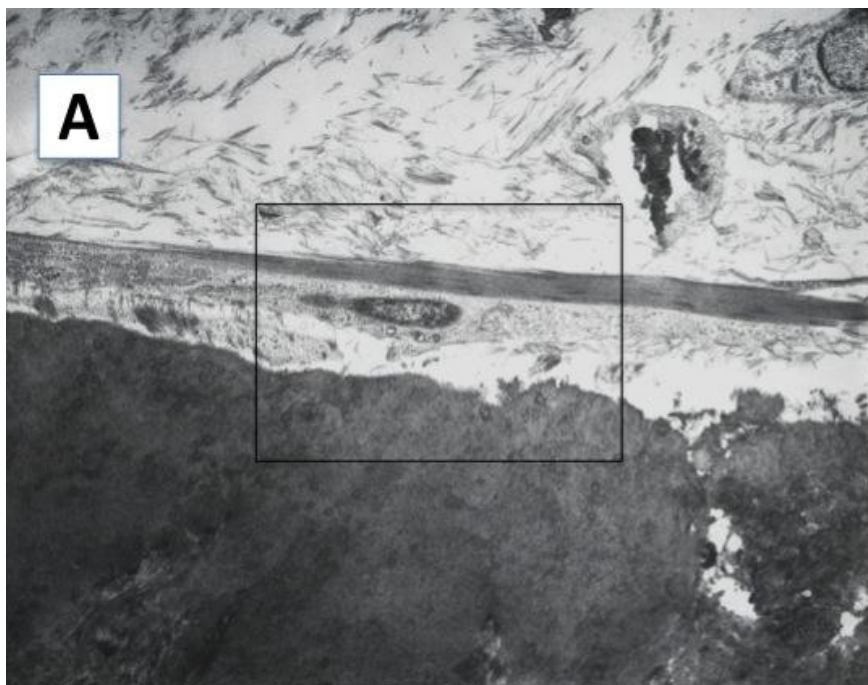


Figura 73. Sección de una muestra del grupo CL a las seis semanas de cultivo. Sobre el cemento las DPSC sintetizaron fibras de colágeno orientadas perpendicularmente a la superficie. Tricrómico de Masson, 40x.

Las imágenes obtenidas mostraron que las DPSC presentaban un citoesqueleto muy desarrollado, con acúmulos de gruesos filamentos de actina en su citoplasma, así como una gran actividad secretora, pues mostraron a las DPSC liberando activamente matriz rica en fibras de colágeno (figura 74).

Figura 74. Sección de una muestra del grupo CL tras seis semanas de cultivo. A: Sobre el cemento las DPSC adoptaron un aspecto aplanado. MET. 2500x. B: Detalle de la región recuadrada en A. En estas células se observaron gruesos acúmulos de filamentos de actina (a), así como la secreción de matriz extracelular rica en fibras de colágeno (flechas). MET, 5000x. →



4. DISCUSIÓN

Desde que en el año 2000 Gronthos y colaboradores aislaron, caracterizaran y describieran algunas de las vías de diferenciación de las células madre de la pulpa dental (DPSC), se han realizado múltiples estudios en los que se ha analizado el potencial de estas células para generar distintos tipos celulares, así como los estímulos que pueden inducir o modificar dicho proceso de diferenciación.

Las estrategias seguidas en los estudios publicados se podrían englobar, a grandes rasgos, en tres grupos. Por un lado, algunos autores (Gronthos *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006; Laino *et al.*, 2006; Waddington *et al.*, 2009; Karaöz *et al.*, 2010 y 2011; Ferroni *et al.*, 2015), han estimulado la diferenciación de las DPSC mediante modificaciones en la composición del medio de cultivo. En estos estudios se ha descrito cómo mediante la adición de determinadas sustancias en el medio de cultivo, las DPSC eran capaces de diferenciarse en células formadoras de tejidos mineralizados (hueso y dentina), formadoras de cartílago, células musculares o células nerviosas, entre otras. Dentro de este grupo también podemos incluir los estudios en los que se han co-cultivado DPSC con otros tipos celulares (Yu *et al.*, 2006; Honda *et al.*, 2009), pues se puede considerar que el factor inductor de la diferenciación son las señales químicas que se generan entre las células.

Por otro lado, en algunos estudios (Zhang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Vallés-Lluch *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011) se han cultivado las DPSC en entornos artificiales con una configuración tridimensional y/o una composición similares a las que encontramos en algunos tejidos del organismo (dentina), lo que ha inducido a estas células a adoptar una morfología característica, mostrando un patrón de comportamiento semejante al que siguen las células en estos entornos biológicos dentro del organismo.

Y por último, otros autores (Batouli *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2011; Galler *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2013; Choung *et al.*, 2013; Nakashima *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015) han cultivado las DPSC con matrices de origen dentario, lo que ha dotado a las células de un entorno tridimensional óptimo, a la vez que las ha puesto en contacto con los elementos orgánicos e inorgánicos que componen los tejidos dentarios naturales.

En el presente trabajo se siguió esta última estrategia, estudiando la proliferación y el comportamiento de las DPSC en contacto con dentina y cemento. Sin embargo, indirectamente, la presencia de estas matrices dentarias estimuló también la diferenciación de las DPSC más alejadas de ellas, como se expuso en el apartado de Resultados.

En comparación con las otras estrategias, el empleo de matrices derivadas de tejido dentario natural, aparte de las ventajas ya mencionadas, ofrece la posibilidad de acercar los resultados obtenidos a sus aplicaciones clínicas en el campo de la regeneración de los tejidos dentarios y peridentarios.

4.1. Matrices dentarias

En el presente estudio, las DPSC se cultivaron en presencia de matrices de origen dentario. Como se expuso anteriormente, las células experimentaron unos cambios morfológicos y formaron capas celulares diferentes en función del tipo de superficie sobre la que proliferaron. Los resultados del Estudio Preliminar mostraron que sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC adoptaron una morfología odontoblástica y comenzaron a sintetizar matriz extracelular rica en colágeno, independientemente del tratamiento realizado a la superficie de la matriz (con NaClO o con clorhexidina). La matriz extracelular que se había sintetizado alrededor de estas células odontoblásticas era de tipo reticular, tal y como se evidenció en las preparaciones teñidas con tricrómico de Masson, similar a la que encontraríamos en relación con los odontoblastos en el tejido conjuntivo pulpar (Ten Cate, 1986).

En el Ensayo Optimizado, mediante técnicas de detección inmunohistoquímica, se observó la presencia de sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) en el citoplasma de estas células odontoblásticas. Esta proteína ha sido ampliamente relacionada con el proceso de mineralización de la matriz dentinaria (Prasad *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*,

2012; Nanci, 2013), así como de otros tejidos duros del organismo, como el esmalte (Ritchie *et al.*, 1997; Begue-Kirn *et al.*, 1998), el cemento o el hueso alveolar (Baba *et al.*, 2004). La presencia de DSPP podría indicar que las DPSC habían iniciado el proceso de mineralización de la matriz colágena sintetizada.

Como se ha indicado anteriormente, en los últimos años han sido varios los estudios en los que también se han cultivado DPSC en presencia de matrices dentarias (Batouli *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2011; Galler *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2013; Choung *et al.*, 2013; Nakashima *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015), obteniendo resultados muy dispares. En todos ellos únicamente se estudió el comportamiento de las DPSC sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie, y no sobre otras superficies dentarias.

El primer estudio publicado en el que se emplearon matrices dentarias como agente inductor para la diferenciación de las DPSC fue el realizado por Batouli y colaboradores (2003). En este estudio, las DPSC se cultivaron en el interior de la cámara pulpar de terceros molares durante 12 horas y se trasplantaron, junto con la matriz dentaria, en ratones atímicos. Se implantaron también matrices dentarias con células madre de médula

ósea (BMSC) como controles. Previamente los dientes habían sido preparados eliminando el tejido conjuntivo pulpar, la predentina y la capa interna de la dentina, y tratando la superficie dentinaria brevemente con ácido acético. Por otro lado, se implantaron también DPSC y BMSC con gránulos de hidroxapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP). Los resultados de este estudio mostraron que cuando se emplearon gránulos de HA/TCP, al igual que ocurriera en estudios publicados anteriormente (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002), en las muestras donde se cultivaron BMSC se había formado tejido óseo y médula ósea, mientras que en las muestras en que se cultivaron DPSC se encontraron estructuras similares a complejos dentino-pulpares, con células de morfología odontoblástica y una matriz mineralizada con una organización similar a la dentina. Sin embargo, en las muestras implantadas con matrices dentarias, sobre la superficie de la dentina las DPSC adoptaron una morfología ovalada pero sin emitir prolongaciones celulares en el interior de los túbulos dentinarios, y depositaron matriz extracelular mineralizada pero con un aspecto similar a la dentina reparativa, es decir, sin túbulos dentinarios. En las muestras en que se cultivaron BMSC, no se observó la formación de matriz extracelular mineralizada sobre la superficie de la dentina. Mediante inmunodetección se evidenciaron depósitos de sialoproteína dentinaria únicamente en la dentina

peritubular de la matriz preexistente, y no en la matriz mineralizada neoformada por las DPSC.

Los resultados del estudio de Batouli *et al.* difieren de los obtenidos en el presente estudio, en el que las DPSC sobre la dentina sí que adoptaron una morfología odontoblástica. El hecho de que sobre los gránulos de HA/TCP sí que se observaran estructuras celulares similares a los complejos dentino-pulpares y sobre la dentina las DPSC formaran dentina reparativa podría deberse a que, secuestrados en la matriz dentinaria, se ha detectado la presencia de numerosos factores quimiotácticos (TGF- β , FGF-2, IGF-1, VEGF, PDGF, IL-8 e IL-10) (Roberts-Clarke *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012). Estos factores, al producirse la disolución de la matriz por efecto de agentes ácidos, tal y como ocurre en la caries, se liberan y desencadenan la activación del proceso inflamatorio pulpar y la activación de los odontoblastos para formar dentina reactiva/reparativa (Smith *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2015).

En la pulpa, cuando por causa de un proceso cariogénico moderado/avanzado mueren odontoblastos, las células que ocupan su lugar no emiten prolongaciones citoplasmáticas dentro de los túbulos dentinarios, sino que los cierran mediante la aposición de dentina reparativa (Gómez de Ferraris y Campos, 2009; Nanci, 2008). De forma análoga,

la desmineralización experimental mediante ácido acético podría haber favorecido la liberación de gran cantidad de estas moléculas, las cuales habrían estimulado a las DPSC en contacto con la dentina a cerrar los túbulos dentinarios mediante la síntesis de dentina reparativa. En el presente trabajo, tanto en el Estudio Preliminar como en el Ensayo Optimizado, no se emplearon agentes desmineralizantes sobre la matriz dentinaria por lo que, de producirse la liberación de esos factores quimiotácticos, la liberación habría sido muy lenta.

Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos en el estudio publicado por Huang y colaboradores (2010), en el que se cultivaron DPSC en andamiajes de ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA. Una vez sembradas, los andamiajes con las células fueron colocados en el interior de una matriz dentaria e implantados en el dorso de ratones inmunodeprimidos. Paralelamente se realizó el mismo procedimiento empleando células madre de la papila apical dental (SCAP). Para preparar la matriz dentaria, se realizaron secciones transversales de las raíces de dientes humanos extraídos, se eliminó el tejido conjuntivo pulpar y se ensanchó el canal radicular hasta alcanzar un diámetro de 2-2.5 mm, y se selló uno de los extremos con agregado de tróxido mineral (MTA). A continuación se trató la superficie de la dentina con EDTA, ácido cítrico, betadine®

y NaClO. Los resultados mostraron que en ambos grupos de muestras, a los cuatro meses de la implantación, en el canal radicular se había generado un tejido vascularizado similar al tejido conjuntivo pulpar, y sobre las paredes de la dentina se había depositado una fina capa de matriz mineralizada. Las células adyacentes a la matriz neoformada constituyeron una capa desorganizada y, en general, dicha matriz carecía de una organización estructural definida, asemejándose a la dentina reparativa. Sin embargo, las células adoptaron una morfología odontoblástica típica, con el citoplasma polarizado y emitiendo una prolongación a modo de proceso odontoblástico en el interior de la matriz neoformada, sintetizando una matriz mineralizada de aspecto similar a la dentina, con túbulos dentinarios en su interior, aunque este comportamiento se observó únicamente en zonas concretas de algunas de las muestras. Las muestras en las que se emplearon SCAP presentaron un volumen mayor de matriz dentaria neoformada, así como mejor organización de las capas celulares del tejido conjuntivo pulpar neoformado, en comparación con las muestras en las que se usaron DPSC. El análisis mediante diversos anticuerpos reveló que las células que formaban estos nuevos tejidos eran de origen humano y, por tanto, derivaban de las células implantadas inicialmente con la matriz, y no eran

células del huésped que habían colonizado la matriz implantada.

Así pues, al igual que en el estudio de Batouli y colaboradores (2003), al producir una desmineralización de la matriz, en este caso mediante EDTA y ácido cítrico, se habrían liberado factores quimiotácticos que habrían estimulado la formación de dentina reparativa sobre la superficie de la matriz dentinaria. El que sólo se observaran células de aspecto odontoblástico, con prolongaciones celulares dentro de los túbulos dentinarios, en algunos puntos concretos de algunas de las muestras podría deberse a una desmineralización menos intensa en esos puntos o a otros factores aún desconocidos.

Sin embargo, no en todos los estudios en los que se había desmineralizado previamente la matriz dentinaria se observó el mismo comportamiento de las DPSC. En el estudio publicado por Shao y colaboradores (2011) se cultivaron DPSC sobre discos de dentina desmineralizada. Estos discos fueron preparados tratando brevemente la superficie con EDTA y ácido cítrico para eliminar el barrillo dentinario. Después los discos se sometieron a un tratamiento más prolongado de desmineralización con EDTA, se esterilizaron con NaClO y se mantuvieron en DPBS. Paralelamente, se cultivaron también células madre

del ligamento periodontal (PLSC) sobre discos de dentina tratados con el mismo procedimiento. A los 4 días de cultivo, las DPSC presentaban un aspecto muy elongado y comenzaron a formar multicapas, emitiendo prolongaciones celulares monopares en el interior de los túbulos dentinarios. A los 10 días de cultivo, las DPSC formaron capas más densas y aparecieron algunos pequeños depósitos de matriz extracelular. Las PLSC adoptaron un aspecto fusiforme, pero no presentaban prolongaciones celulares hacia el interior de los túbulos dentinarios. El análisis mediante inmunofluorescencia reveló cambios significativos en el citoesqueleto de las DPSC, apareciendo cúmulos de fibrillas de actina dispuestas en el eje de la células y en las prolongaciones citoplasmáticas. Asimismo, también se observó un importante incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina a partir del cuarto día de cultivo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, en los que las DPSC también adoptaron una morfología odontoblástica, emitiendo prolongaciones citoplasmáticas en los túbulos dentinarios y sintetizando matriz extracelular y, tal y como se evidenció en el estudio a microscopía electrónica, observándose en su citoplasma gruesos haces de filamentos de actina que reforzaban el citoesqueleto y el anclaje celular.

Un estudio especialmente contradictorio con los resultados de los trabajos anteriormente descritos es el realizado por Lei y colaboradores (2013). En él se cultivaron *in vitro* e *in vivo* células madre de la médula ósea (BMSC) en el interior de los conductos radiculares de dientes extraídos. En estos dientes la raíz fue seccionada transversalmente y el tejido conjuntivo pulpar y la capa de preentina fueron eliminados. La superficie de la dentina fue tratada con EDTA, ácido cítrico y etanol. Los resultados del estudio *in vitro* mostraron que las BMSC en contacto con la superficie de la dentina adoptaron una morfología odontoblástica, alineándose perpendicularmente a la dentina y emitiendo prolongaciones celulares en el interior de los túbulos dentinarios a modo de proceso odontoblástico. El estudio mediante detección inmunohistoquímica reveló la presencia de DSPP en el citoplasma de estas células con aspecto odontoblástico y, mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real) y análisis *Western Blot*, se confirmó la expresión de esta proteína. Para el estudio *in vivo*, las matrices dentarias con BMSC se implantaron en la cápsula renal de ratones atímicos. Los resultados confirmaron los hallazgos obtenidos en el estudio *in vitro*, pues a las seis semanas de la implantación, las células en contacto con la dentina presentaban un aspecto típicamente odontoblástico, formando una capa bien organizada, con un citoplasma polarizado y orientado

perpendicularmente a la matriz, y presentando prolongaciones celulares hacia el interior de los túbulos dentinarios. El análisis inmunohistoquímico reveló una inmunorreactividad positiva a la DSPP en estas células.

Los resultados del trabajo de Lei y colaboradores no coinciden con los de otros trabajos publicados en dos aspectos: por un lado, aunque se han empleado cultivos de BMSC como controles en otros estudios con DPSC (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002; Batouli *et al.*, 2003), es el único donde se observó la diferenciación odontoblástica de las BMSC y, por otro lado, no se observó la formación de dentina reparativa sobre la superficie de la matriz dentinaria, a pesar de haberla sometido a una desmineralización rápida mediante el tratamiento con EDTA y ácido cítrico.

Un estudio que puso en relieve la importancia de las señales intercelulares en la regeneración de los tejidos dentarios es el publicado por Choung y colaboradores (2013). En él se cultivaron *in vivo* DPSC con matrices dentarias, empleando un medio de cultivo acondicionado por pre-ameloblastos (PA-CM) procedentes de la papila apical de germen dentario de rata. Las células de la papila apical proceden de la vaina epitelial de Hertwig y se ha demostrado su capacidad para diferenciarse en

ameloblastos (Lee *et al.*, 2011). Para preparar las matrices dentarias, se tomaron secciones de la raíz de dientes extraídos en las que se eliminó el tejido conjuntivo pulpar y la preentina, y se trataron con una disolución de NaClO. A continuación se desmineralizaron brevemente con EDTA, y se esterilizaron con óxido de etileno. Las DPSC se mezclaron con el PA-CM en un gel de fibrina, se introdujeron en el interior del conducto radicular de las matrices dentarias tratadas y se implantaron en el dorso de ratones inmunodeprimidos. En las muestras control, en las cuales se empleó un medio de cultivo convencional, se observó que en el interior de las matrices dentarias se había formado tejido muscular esquelético y que sobre la superficie de la dentina se había formado un tejido mineralizado sin una estructura definida y con algunas células en su interior, similar a la dentina reparativa. Sin embargo, en las muestras en las que se empleó PA-CM, en el interior de las matrices dentarias se observó un tejido con una morfología muy similar a la pulpa dentaria normal, y las células en contacto con la matriz dentinaria presentaron un aspecto típicamente odontoblástico, emitiendo prolongaciones celulares en el interior de los túbulos dentinarios. En las muestras en las que se empleó PA-CM, el análisis inmunohistoquímico reveló la abundante presencia de DSPP y nestina, concentradas en las células odontoblásticas en contacto con la matriz dentaria y en sus

prolongaciones celulares alojadas en los túbulos dentinarios, mientras que en las muestras en las que se usó un medio de cultivo convencional la presencia de estas proteínas era menor y más diseminada. Estos resultados mostraron que, tras haber realizado una desmineralización débil de la superficie dentinaria, las DPSC cultivadas en medio de cultivo convencional formaron dentina reparativa sobre la superficie de la matriz dentinaria, al igual que se observara en los trabajos de Batouli *et al.* (2003) y Huang *et al.* (2010). Sin embargo, en las mismas condiciones pero con las señales químicas procedentes de los pre-ameloblastos, las DPSC fueron capaces de generar un nuevo tejido conjuntivo pulpar en la cámara pulpar del diente. Estos hallazgos sugieren que en sí misma la matriz dentinaria, a pesar de contener gran variedad de factores quimiotácticos, no posee capacidad suficiente para inducir la formación de un tejido conjuntivo pulpar ordenado y estructurado, tal y como encontraríamos en un diente normal.

El análisis de los resultados del presente estudio y de los hallazgos de los trabajos publicados por otros autores parecen indicar que *in vitro*, sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie y sin otro factor inductor que la propia matriz dentinaria, las DPSC (BMSC en el caso del trabajo de Lei *et al.* publicado en 2013) tienden a adoptar

una morfología odontoblástica, mientras que en las experiencias *in vivo*, la tendencia es a formar dentina reparativa para sellar los túbulos dentinarios.

Recientemente, algunos autores, utilizando un modelo animal, han realizado estudios *in vivo* en los que, tras extraer el tejido conjuntivo pulpar de un diente, se han probado diferentes alternativas *in situ* para estimular la regeneración completa de dicho tejido (Galler *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012; Nakashima *et al.*, 2014).

En el presente estudio, no se observaron diferencias a nivel morfológico entre las capas celulares formadas por las DPSC sobre las matrices tratadas con clorhexidina y las tratadas con NaClO. Sin embargo, otros estudios publicados han relacionado el tratamiento de la matriz dentinaria mediante NaClO con una actividad odontoclástica sobre dicha matriz. En el trabajo publicado por Galler y colaboradores (2011) se cultivaron *in vivo* DPSC en un hidrogel enriquecido con los factores VEGF, TGF- β 1 y FGF. Las DPSC crecidas en el hidrogel se colocaron en el interior de matrices dentarias y se implantaron en ratones inmunodeprimidos. Las matrices dentarias fueron preparadas a partir de fragmentos de raíces de molares, en las que se eliminó el tejido conjuntivo pulpar y se ensanchó mecánicamente el canal radicular

hasta un diámetro de 1.5 mm. A continuación fueron tratadas siguiendo dos procedimientos. En un grupo de muestras las matrices fueron sumergidas en PBS, tratadas con NaClO y lavadas con PBS. En el otro grupo de muestras se siguió el mismo procedimiento que con el primero, pero además, tras él, las matrices se sumergieron brevemente en EDTA y se lavaron con en PBS. Los resultados mostraron que en el grupo de muestras tratadas con EDTA se había formado un tejido conjuntivo muy similar al de la pulpa dental, con células de aspecto odontoblástico y en las que se detectó mediante inmunohistoquímica la presencia de DSP en contacto con la dentina. En las muestras tratadas solo con NaClO aparecieron zonas de reabsorción de la matriz dentaria, con presencia de células multinucleadas de tipo odontoclástico y con un tejido conjuntivo peor organizado que en las muestras del otro grupo. Así pues, los autores de este estudio concluyen que la desmineralización rápida de la superficie dentinaria mediante EDTA libera factores quimiotácticos secuestrados en la matriz, lo que unido a los factores de crecimiento con que se enriqueció el cultivo, habría proporcionado a las DPSC las señales adecuadas para su diferenciación y la formación de un tejido conjuntivo pulpar perfectamente ordenado, mientras que el NaClO habría estimulado una actividad odontoclástica sobre la matriz.

Estos resultados no coinciden con los del estudio publicado por Zhu y colaboradores (2012). En él se aplicaron cuatro métodos diferentes para estimular la regeneración *in vivo* del tejido conjuntivo pulpar tras realizar una pulpectomía en premolares de perro. Tras la pulpectomía, la dentina se trató irrigando en el interior de la cámara pulpar con NaClO y con EDTA. Se lavó con una disolución salina, se secó la cámara pulpar y se rellenó siguiendo cuatro estrategias diferentes: con un coágulo de sangre, con DPSC, con plasma rico en plaquetas (PRP) o con DPSC y PRP. La apertura coronal se selló con agregado de trióxido mineral (MTA). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de muestras. En todos ellos, cubriendo la superficie de la dentina de la cámara pulpar se observó un tejido mineralizado similar al cemento y, en contacto con éste, un tejido conjuntivo con gruesos haces de fibras de colágeno asociados a algunos islotes de tejido óseo neoformado, similar al ligamento periodontal. En ninguna de las muestras se observó la formación de un tejido similar a la dentina. Así pues, a pesar de haber producido una desmineralización rápida de la superficie dentinaria, no se observó la diferenciación odontoblástica de las DPSC. Una posible causa podría ser que la población de DPSC implantada en la cámara pulpar no sobreviviera o se diseminara, y la regeneración del tejido pulpar se realizara mediante las células procedentes del

ligamento periodontal llegadas a través del foramen apical, lo que explicaría la formación dentro de la cámara pulpar de cemento, ligamento periodontal y hueso.

Siguiendo un planteamiento similar, Chen y colaboradores (2015) estudiaron la capacidad para regenerar el tejido conjuntivo pulpar de las DPSC y de la fibrina rica en plaquetas (PRF). Para ello rellenaron el canal radicular de dientes extraídos siguiendo tres procedimientos distintos: con DPSC, con PRF o con DPSC y PRF. Previamente, la dentina fue tratada con brevemente con EDTA y ácido cítrico, y luego con Betadine® y NaClO. Una vez rellenado el canal radicular y sellada la apertura coronal con MTA, los dientes fueron implantados en el dorso de ratones atímicos. Paralelamente se realizó la pulpectomía en premolares de perro y, sin tratar la superficie de la dentina, los canales radiculares fueron rellenados siguiendo los tres procedimientos anteriormente descritos para el modelo de trasplante ectópico. En ambos modelos experimentales los resultados mostraron que a las ocho semanas, en las muestras en las que se emplearon DPSC o DPSC y PRF se había formado un tejido ricamente vascularizado en el interior del canal radicular, similar al tejido conjuntivo pulpar, y dentina reparativa sobre la superficie de la dentina radicular. Sin embargo, en las muestras con DPSC y PRF la capa de dentina neoformada era mucho más gruesa que

en las otras muestras, y en ella se observaron odontoblastos incluidos en la matriz dentinaria (osteodentina), así como la aparición de algunos túbulos dentinarios irregulares. Estos resultados coinciden con los de otros estudios (Batouli *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2010), en los que *in vivo*, en contacto con la matriz dentinaria, las DPSC se diferenciaron en odontoblastos y formaron dentina reparativa. Sin embargo, es especialmente llamativo que los resultados obtenidos en las muestras en las que se trató la dentina con EDTA y ácido cítrico (modelo de trasplante ectópico), y en las muestras en las que no se hizo (modelo de regeneración *in situ*) fueran similares. Esto podría deberse a que a la hora de generar un tejido conjuntivo pulpar bien organizado y sintetizar dentina con túbulos dentinarios no solo intervienen los factores quimiotácticos que se encuentran en la matriz dentinaria, sino que son necesarias otras señales químicas más específicas.

Estos factores quimiotácticos, ya sea liberados por otras células o secuestrados en la matriz dentinaria, parecen ser un elemento clave a la hora de inducir a las DPSC a diferenciarse y formar un tejido conjuntivo pulpar bien organizado. En este sentido, otro estudio significativo es el publicado por Nakashima y colaboradores (2014), en el que se cultivaron DPSC movilizadas mediante factor

estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Para ello, DPSC y granulocitos se cultivaron en un medio de cultivo enriquecido con G-CSF, pero con una membrana que separaba ambas poblaciones celulares, de manera que éstas compartieron el mismo medio de cultivo pero no se mezclaron. Las DPSC movilizadas fueron sembradas en esponjas de colágeno e implantadas *in vivo* en la cámara pulpar de dientes de perro tras realizarles una pulpectomía. En la descripción del procedimiento seguido no se especifica si se trató la superficie dentinaria con algún agente químico desinfectante o desmineralizante. Como grupo control, se implantaron DPSC cultivadas con medio de cultivo convencional, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito. El análisis de las muestras reveló que las DPSC cultivadas con medio de cultivo convencional, se habían diseminado por los tejidos periodontales tras ser implantadas, mientras que las DPSC movilizadas permanecieron por más tiempo en el conducto radicular. En las muestras implantadas con DPSC movilizadas, se observó posteriormente una completa regeneración del tejido conjuntivo pulpar y la aparición de dentina reparativa cubriendo las paredes del conducto radicular. A largo plazo el diente mostró reacción positiva a los test de vitalidad pulpar, lo que indica una re-inervación del tejido formado. En las muestras control, en las que realizó el mismo procedimiento empleando DPSC

cultivadas en medio de cultivo convencional, el área de tejido pulpar regenerado fue menor, se observó dentina reparativa pero con un espesor menor y el tejido formado en la cámara pulpar presentaba un bajo nivel de organización, en comparación con las muestras en las que se implantaron DPSC movilizadas.

Los resultados del estudio de Nakashima y colaboradores concuerdan con los de otros estudios anteriormente descritos (Batouli *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015), confirmando la hipótesis de que las DPSC *in vivo* tienden a formar dentina reparativa sobre la matriz dentinaria, y que necesitan señales químicas más específicas para adoptar un aspecto odontoblástico típico, emitiendo prolongaciones citoplasmáticas en el interior de los túbulos dentinarios (Choung *et al.*, 2013). La razón de este comportamiento puede ser que las DPSC por sí mismas, en contacto con la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie tienden a diferenciarse y a adoptar una morfología odontoblástica, emitiendo prolongaciones citoplasmáticas dentro de los túbulos dentinarios, tal y como se ha observado en el presente estudio y en otros trabajos realizados *in vitro* (Shao *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando otras células del organismo, como por ejemplo granulocitos neutrófilos, entran en contacto con la matriz dentinaria, tal y como

sucedería en un estudio *in vivo*, éstos liberarían factores quimiotácticos proinflamatorios que estimularían a las DSPC a depositar dentina reparativa para cerrar los túbulos dentinarios, de manera similar a lo que ocurriría en un proceso inflamatorio que afectase a la pulpa dental.

En el presente estudio, además del comportamiento de las DPSC sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie, también se valoró sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie y sobre el cemento.

Tal y como se expuso en el apartado de Resultados, sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie las DPSC formaron densas capas celulares, adoptando una morfología aplanada y sintetizando abundante matriz extracelular rica en colágeno. Mediante técnicas de detección inmunohistoquímica se observaron abundantes depósitos de DSPP en dichas capas celulares. Asimismo, el estudio a MET reveló una gran actividad secretora en estas células, con abundancia de orgánulos y vesículas de secreción intracelulares. Como se ha expuesto anteriormente, los trabajos publicados por otros autores solo han valorado la diferenciación de las DSPC sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie, por lo que no se encuentran precedentes en la bibliografía. Sin embargo, los hallazgos antes mencionados apuntan a que

las DPSC se habrían diferenciado hacia células de tipo odontoblástico y podrían estar sintetizando una matriz similar a la dentina reparativa, tal y como indica el alto contenido en colágeno y la abundante presencia de DSPP.

De forma análoga, sobre el cemento las DPSC también formaron densas capas celulares y adoptaron una morfología aplanada. El estudio a microscopía óptica reveló una abundante síntesis de matriz extracelular rica en colágeno, pero a diferencia de lo observado sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie, sobre el cemento la orientación de las fibras de colágeno fue predominantemente perpendicular a la superficie de la matriz dentaria, lo que fue confirmado en el estudio a MET. La detección inmunohistoquímica también reveló la presencia de depósitos de DSPP en estas capas celulares. Aunque esta proteína tradicionalmente ha estado asociada con el proceso de mineralización de la matriz dentinaria, algunos autores la han relacionado también con el cemento (Baba *et al.*, 2004; Arzate *et al.*, 2015). Esta presencia, unido a la orientación observada en las fibras de colágeno, podría indicar la síntesis de matriz cementoide y ligamento periodontal sobre la superficie del cemento. Teniendo en cuenta que el origen embriológico de las DPSC y de los cementoblastos es el mismo, pues ambas poblaciones

celulares tienen un origen ectomesenquimático, este comportamiento no sería extraño.

Otros autores han estudiado el comportamiento de células madre de origen ectomesenquimático sobre la superficie del cemento. Liu y colaboradores (2008) realizaron un estudio *in vivo* en el que se aislaron, caracterizaron y cultivaron células madre del ligamento periodontal (PDLSC) procedentes de dientes extraídos de cerdo. A estos cerdos se les provocaron quirúrgicamente defectos periodontales intraóseos. Estos defectos se rellenaron con gránulos de TCP/HA o con gránulos de TCP/HA y PDLSC. Los resultados mostraron que en los defectos donde se implantaron gránulos de TCP/HA y PDLSC se había producido una regeneración casi completa de los tejidos periodontales, incluido el ligamento y el hueso alveolar, mientras que en los defectos donde solo se emplearon gránulos de TCP/HA la regeneración fue mucho menor.

Otro trabajo significativo fue el publicado por Núñez y colaboradores (2012), en el que a partir de las raíces de premolares exodonciados a perros Beagle, se aislaron, caracterizaron y cultivaron células del cemento (*cementum derived cells* o CDC) y del ligamento periodontal (*periodontal ligament derived cells* o PDLDC). A estos mismos perros, se les provocaron quirúrgicamente defectos

periodontales intraóseos, lugar donde a continuación se implantaron CDC y PDLDC cultivadas en esponjas de colágeno. Tanto en los defectos tratados con CDC como en los tratados con PDLDC se observó una completa regeneración del cemento radicular, así como del ligamento periodontal y del hueso alveolar. En comparación con las muestras control, en las que no se implantaron células en los defectos periodontales intraóseos, las muestras con CDC y PDLDC presentaron una capa mayor de nuevo cemento y mayor regeneración del anclaje fibroso periodontal. No se observó anquilosis o reabsorción radicular. Así, los resultados de este trabajo sugieren que las células (CDC o PDLDC), en contacto con el cemento se diferencian a cementoblastos y sintetizan cemento, lo que posibilitaría el anclaje de las fibras del ligamento periodontal neoformado, lo que a su vez estimularía la formación de hueso alveolar. De la misma manera, en el presente estudio las DPSC en contacto con el cemento se diferenciaron a células secretoras de una matriz extracelular similar al cemento tanto en su composición como en la organización de las fibras de colágeno.

El potencial para inducir la diferenciación cementoblástica del cemento podría estar asociado a la presencia de la proteína del cemento-1 (CEMP1). Esta proteína se ha relacionado con el proceso de mineralización de la matriz

cementoide (Arzate *et al.*, 1998), y se cree que desempeña un papel clave en la proliferación y diferenciación de los cementoblastos (Arzate *et al.*, 2015).

Al igual que ocurre en la matriz dentinaria, donde hay gran cantidad de factores quimiotácticos secuestrados en la matriz que inducen la diferenciación celular, la presencia de estos factores quimiotácticos y de otras proteínas características como la CEMP1 en la matriz cementaria podría explicar la capacidad del cemento para inducir una diferenciación cementoblástica de las células, ya sean DPSC, PDLDC o CDC.

4.2. Matrices artificiales

Los resultados del presente estudio mostraron diferencias en la morfología celular y en las capas celulares que formaron las DPSC en función de las características de la superficie de la matriz dentaria con la que contactaron, de lo que se deriva que no solo la composición de la matriz sino también su configuración tridimensional condiciona la diferenciación de las DSPC.

En los últimos años se han probado distintas matrices sintéticas en estudios *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de crear un entorno tridimensional que estimule a las células a diferenciarse y sintetizar dentina, al mismo tiempo que se ha estudiado hasta qué punto la composición de estas matrices puede inducir, condicionar o incluso inhibir dicho proceso de diferenciación.

Varios estudios emplearon, junto con las diferentes matrices estudiadas, un medio de cultivo osteo-inductor (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002; Zhang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Nam *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011), mientras que otros autores implantaron las matrices en ratones atímicos y estudiaron la diferenciación de las células del huésped que colonizaron y proliferaron sobre dichas matrices (Vallés-Lluch *et al.*, 2010).

El primer trabajo publicado en el que se emplearon DPSC fue el realizado por Gronthos y colaboradores (2000), en el que se cultivaron *in vitro* e *in vivo* DPSC en diferentes entornos biológicos para estudiar su capacidad de diferenciación. En el estudio *in vivo* se trasplantaron a ratones atímicos muestras de DPSC mezclada con cristales de hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP). Este proceso se realizó igualmente con una población de células madre de médula ósea (BMSC), y se comparó la evolución de ambas poblaciones. Los resultados mostraron que las DPSC habían formado un tejido similar a la dentina alrededor de los cristales de HA/TCP, con predominio de fibras de colágeno tipo I ordenadas y células con una morfología similar a los odontoblastos, que emitían prolongaciones celulares a modo de procesos odontoblásticos dentro de la matriz neoformada. Por el contrario, en las muestras con BMSC, sobre los gránulos de HA/TCP las células adoptaron un aspecto similar a los osteoblastos y sintetizaron una matriz de tipo osteoide. Además aparecieron adipocitos y núcleos hematopoyéticos, algo que no se observó en las muestras con DPSC. En este trabajo se evidenció la capacidad de las DPSC de diferenciarse en células formadoras de dentina, con una morfología muy similar a los odontoblastos que encontramos en el tejido conjuntivo pulpar de los dientes, así como el potencial inductor de la HA y el TCP en este

proceso de diferenciación. Sin embargo, esta morfología típicamente odontoblástica, así como una matriz neoformada de composición y organización similares a la dentina, sólo se observaron en las muestras *in vivo*. En el estudio *in vitro*, aunque se añadieron diferentes compuestos químicos al medio de cultivo para inducir la diferenciación de las DPSC (dexametasona, glucocorticoide, fosfato cálcico, ...), éstas únicamente formaron núcleos desorganizados con acumulación de calcio, sin mostrar ningún tipo de morfología celular u organización de la matriz que recordara a la dentina o el tejido conjuntivo de la pulpa dental.

Estos resultados concuerdan con los del trabajo publicado por Nam y colaboradores (2011), en el que se cultivaron *in vitro* DPSC con gránulos de fosfato tricálcico (TCP). La otra variable que se estudió fue el efecto sobre las DPSC de la utilización de un medio osteo-inductor enriquecido con dexametasona, glicerofosfato y ácido ascórbico. Los resultados mostraron que en los cultivos en los que las DPSC crecieron sobre los gránulos de TCP, la proliferación y la actividad secretora de matriz extracelular había sido mayor respecto a las muestras control, en las que también se cultivaron las DPSC en un medio osteo-inductor pero sin gránulos de TCP. En las muestras cultivadas con TCP se observaron abundantes depósitos de matriz extracelular

rica en colágeno con zonas mineralizadas y la expresión de fosfatasa alcalina, osteocalcina y DSPP fue muy superior a las muestras control. Sin embargo, no se apreció ningún tipo de organización en la matriz sintetizada. Las conclusiones de este estudio apuntan a que la presencia de un elemento tridimensional sobre el que proliferar y que actúe como soporte estructural para la matriz extracelular sintetizada favorece la diferenciación y la actividad secretora de las DPSC. Además, este estudio demuestra la capacidad inductora del TCP sobre la diferenciación de las DPSC, lo que coincide con los resultados de otros estudios publicados (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002; Batouli *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2011), siendo ésta incluso superior al efecto del medio de cultivo osteo-inductor.

Los resultados del presente estudio y de los trabajos publicados apuntan a que tanto la presencia de un elemento tridimensional como la composición de este elemento condiciona la diferenciación de las DPSC. En este sentido, es significativo el trabajo publicado por Kim y colaboradores (2009), en el que se cultivaron *in vitro* DPSC en un medio osteogénico enriquecido con dexametasona, glicerofosfato y ácido ascórbico, con cuatro tipos de matrices artificiales: colágeno tipo I, colágeno tipo III, gelatina y quitosano (chitosan). Los resultados mostraron la presencia de núcleos de matriz calcificada, muy

abundantes en las muestras cultivadas con colágeno tipo I y III, poco abundantes en las muestras cultivadas con gelatina y muy escasos en las muestras con quitosano. Al igual que en el estudio de Nam *et al.* (2011), no se apreció ningún tipo de organización en la matriz extracelular neoformada.

El hecho de que solo se haya observado matriz neoformada con una organización tubular similar a la de la dentina en algunos estudios *in vivo* y no en las experiencias *in vitro* parece indicar que se puede crear mediante TCP/HA o con matrices de colágeno un entorno biológico favorable para diferenciación de las DPSC, pero éstas necesitan señales químicas más precisas para diferenciarse en células odontoblásticas y sintetizar una matriz mineralizada y organizada con túbulos, tal y como encontramos en la dentina de un diente natural.

Pero no todos los estudios publicados apuntan en la misma dirección. En el trabajo realizado por Zhang y colaboradores (2006) se cultivaron *in vivo* e *in vitro* DPSC en tres tipos de matrices artificiales: colágeno esponjoso, cerámica porosa (con HA y TCP) y una malla de titanio fibroso. En todas las muestras se empleó un medio de cultivo inductor de la osteo-diferenciación (enriquecido con dexametasona, fosfato potásico y ácido ascórbico). Los

resultados del cultivo *in vitro* mostraron que, tras cuatro semanas, en los tres tipos de matrices se habían producido depósitos de matriz extracelular rica en colágeno. Mediante RT-PCR se detectó la expresión de DSPP en todas las muestra. En el estudio *in vivo* se implantaron las matrices co-sembradas con las DPSC en ratones atímicos. Los resultados mostraron que en los tres tipos de muestras se había depositado matriz extracelular rica en colágeno y en todos los casos se detectó la expresión de DSPP. Sin embargo no se evidenció ningún tipo de organización en la matriz extracelular sintetizada. Tampoco se observaron zonas mineralizadas en dicha matriz, a diferencia de otros trabajos *in vivo* reseñados (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002; Batouli *et al.*, 2003; Nam *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011) en los que también se emplearon matrices de colágeno o HA/TCP.

El trabajo publicado por Wang y colaboradores (2011) evidenció la importancia de la estructura tridimensional a la hora de configurar un entorno biológico favorable para la diferenciación de las DPSC. En él se cultivaron *in vitro* e *in vivo* DPSC con dos tipos de matrices de ácido poli-láctico: de paredes lisas y de superficie nano-fibrosa. En ambos estudios se empleó un medio de cultivo osteogénico enriquecido con dexametasona, glicerofosfato y ácido ascórbico. Para el estudio *in vivo* se implantaron las

matrices con las DPSC en ratones atímicos. Los resultados de ambos estudios revelaron que la cantidad de matriz extracelular mineralizada depositada por las DPSC fue mayor en las muestras con matrices con estructura nano-fibrosa, en comparación con las muestras con matrices de paredes lisas. En las muestras control, en las cuales no se empleó un medio de cultivo osteo-inductor, no se observaron depósitos de matriz extracelular mineralizada, lo que indicaría que las matrices de ácido poli-láctico no tienen capacidad inductora sobre las DPSC por sí mismas.

En este sentido, es significativo el trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, pues aunque no se emplearon DPSC, sí quedó de manifiesto la importancia de la configuración tridimensional de la matriz empleada en la diferenciación celular. Así pues, Vallés-Lluch y colaboradores (2010) estudiaron la bio-compatibilidad de tres tipos de matrices sintéticas: copolímero etil-metacrilato-co-hidroxietil-acrilato, copolímero nanomineralizado con óxido de silicio y copolímero nanomineralizado con óxido de silicio recubierto de HA. Estos materiales fueron diseñados para imitar la estructura de la dentina, pues presentaban túbulos en su interior de un diámetro similar a los túbulos dentinarios. Los tres tipos de matrices fueron implantadas en ratones durante 6 semanas. Los resultados mostraron un patrón celular diferente en las células que colonizaron

los distintos tipos de matrices. En las muestras con matrices de copolímero, las células observadas presentaban una morfología fibroblástica, adoptando un aspecto reticular. En las muestras con matrices de copolímero nanomineralizado, las células mostraban un aspecto fibroblástico pero rodeadas de una densa matriz colágena neoformada. Mientras que en las muestras con matrices recubiertas de HA, las células que proliferaron sobre dichas matrices presentaban un aspecto odontoblástico, emitiendo prolongaciones citoplasmáticas dentro de los túbulos y depositando pequeñas cantidades de matriz extracelular rica en colágeno sobre la pared de dichos túbulos.

Así pues, en algunos de los estudios en que se empleó un medio de cultivo osteo-inductor (Zhang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Nam *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011), se observaron grandes diferencias en función de la composición de la matriz empleada. Las matrices con HA/TCP en la superficie (Zhang *et al.*, 2006; Vallés-Lluch *et al.*, 2010; Nam *et al.*, 2011), o compuestas de colágeno (Kim *et al.*, 2009), parecen ser las más aptas para la diferenciación celular y la síntesis de matriz extracelular mineralizada, probablemente por sus similitudes con la composición de los tejidos dentarios naturales.

En este aspecto, es destacable el estudio publicado por Zheng y colaboradores (2011). En él se cultivaron *in vitro* DPSC con cuatro tipos de matrices artificiales: matrices de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), matrices de PLGA y TCP, matrices de PLGA e HA y matrices de PLGA e HA de carbonato cálcico (CDHA). En este estudio se empleó un medio de cultivo no osteo-inductor. Los resultados mostraron diferencias muy significativas entre las muestras. Las muestras con matrices de PLGA y TCP presentaban abundantes depósitos de matriz extracelular mineralizada y unos niveles altos de actividad de ALP. Las muestras con matrices de PLGA e CDHA y de PLGA e HA, también presentaron nódulos de matriz extracelular calcificada, pero menos abundantes que en las muestras con matrices de PLGA y TCP, mientras que en las muestras con matrices de PLGA no se apreciaron depósitos de matriz extracelular mineralizada. Además se realizó un estudio *in vivo*, en el que se implantaron matrices de PLGA y TCP en la cápsula renal o en el mesenterio de ratones atímicos. En las muestras implantadas se observaron complejos dentino-pulpaes, en los que las DPSC habían adoptado una morfología típicamente odontoblástica y habían sintetizado un tejido muy similar a la dentina. Este trabajo confirmó la capacidad del TCP para inducir a las DPSC a diferenciarse y formar dentina, en concordancia con los hallazgos de estudios anteriores (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002; Zhang *et*

al., 2006; Nam *et al.*, 2011), así como la posibilidad de utilizar PLGA como material para la síntesis de matrices que permitan la formación de nuevo tejido dentinario.

Diversos autores coinciden en que otro de los aspectos significativos que condiciona la proliferación y la diferenciación de las DPSC es la rigidez de la matriz empleada. Por ejemplo, las matrices de malla de titanio, aun sin tener un efecto inductor sobre la diferenciación de las DPSC, al emplearse con un medio de cultivo osteo-inductor actuaron como un entorno tridimensional eficaz para el depósito de matriz extracelular mineralizada (Zhang *et al.*, 2006) debido a su biocompatibilidad y rigidez. Las matrices de co-polímero recubierto de HA, aparte del efecto inductor de la HA sobre las células, presentaban unas propiedades mecánicas más similares a la dentina que las matrices de co-polímero o las de co-polímero nanomineralizado, pues los cristales de HA dieron una mayor rigidez a la estructura, evitando que los túbulos de la matriz se colapsaran (Vallés-Lluch *et al.*, 2010). Esto propició que las células del huésped, probablemente de origen mesenquimático, se diferenciaban a células con una morfología muy similar a los odontoblastos del tejido conjuntivo pulpar normal, emitiendo prolongaciones celulares dentro de los túbulos y secretando matriz extracelular sobre la matriz artificial.

En este mismo sentido destaca el estudio publicado por Qu y colaboradores (2015), en el que se evaluó la diferenciación de las DPSC asociadas a gelatinas nanofibrosas (NFG) con diferentes grados de rigidez. Las DPSC se cultivaron sobre las NFG en medio osteoinductor durante una semana, tras lo cual fueron implantadas en el dorso de ratones atímicos. A las cuatro semanas se observó la formación de matriz extracelular mineralizada únicamente en contacto con la NFG de rigidez alta, mientras que la NFG de rigidez baja había sido reabsorbida y sustituida por un tejido conjuntivo vascularizado.

Así pues, estos resultados coinciden con los de los estudios anteriormente descritos, confirmando que la diferenciación de las DPSC y su capacidad para formar tejidos mineralizados depende tanto de las señales químicas específicas, como de la rigidez y la configuración tridimensional del entorno biológico en el que se encuentran.

4.3. Inducción mediante sustancias químicas

En el presente trabajo, al cultivar las DPSC con matrices de origen dentario, se indujo la diferenciación no sólo de las células que establecieron contacto con dichas matrices, las cuales, como se ha expuesto, adoptaron morfologías diferentes en función de las características de la superficie sobre la que proliferaron, sino que también se diferenciaron las DPSC que se encontraban alejadas de la matriz dentaria y sin contacto directo con ésta.

En la composición de la dentina y en el cemento encontramos fosfato cálcico cristalizado en forma de HA, otros fosfatos en estado amorfo y calcio (Gómez de Ferraris y Campos, 2009; Nanci, 2013). Además, como se expuso anteriormente, varios estudios han demostrado la presencia de diferentes moléculas pro-inflamatorias (IL-8, IL-10), así como de otros factores quimiotácticos (TGF- β , FGF-2, PDGF, IGF-1) secuestrados en la matriz dentinaria, que se liberarían al producirse la disolución de dicha matriz (Smith *et al.*, 2012). Tanto en el Estudio Preliminar como en el Ensayo Optimizado, las matrices dentarias no se desmineralizaron antes de su empleo en los cultivos, pero es posible que a largo plazo se produjera la disolución en el

medio de cultivo de algunos de los componentes de la matriz dentaria mineralizada, como fosfatos, calcio, factores quimiotácticos u otras moléculas con capacidad para estimular la diferenciación de las DPSC.

Así pues, al realizar los cultivos en presencia de estas matrices dentarias no desmineralizadas, indirectamente se pudo producir una variación en la composición del medio de cultivo, lo que habría podido inducir la diferenciación de las DPSC aun sin estar en contacto directo con dicha matriz dentaria. Como se expuso anteriormente, las DPSC en estas zonas (sin contacto directo con la matriz dentaria) formaron capas celulares más o menos organizadas con abundante producción de matriz extracelular rica en fibras de colágeno, tal y como evidenciaron las tinciones con Tricrómico de Masson.

En el trabajo publicado por Gronthos y colaboradores (2000), tras aislar y caracterizar la población de DPSC, las células se cultivaron en presencia de ácido ascórbico, dexametasona, glucocorticoide y fosfato inorgánico. Tras seis semanas de cultivo las DPSC formaron condensaciones celulares con núcleos de calcificación.

En los últimos años han sido numerosos los estudios en que se ha descrito la diferenciación osteogénica *in vitro* de las DPSC, así como los factores químicos que, añadidos al

medio de cultivo, inducían dicha diferenciación. Algunos autores emplearon como factor inductor la combinación de dexametasona, β -glicerofosfato y ácido ascórbico (Zhang *et al.*, 2006; Waddington *et al.*, 2009; Karaöz *et al.*, 2010 y 2011), aunque otros autores apuntan a que el uso de un medio de cultivo con un alto contenido (20%) en suero fetal bovino (FCS) a largo plazo puede inducir esta diferenciación (Laino *et al.*, 2006).

Cabe destacar que la mayoría de estos autores no hacen distinción entre diferenciación osteogénica y odontogénica, pues en ambos casos la matriz extracelular sintetizada por las DPSC está formada principalmente por colágeno tipo I, sobre la que aparecen núcleos de mineralización producidos por la formación de cristales de hidroxiapatita. Para poder distinguir entre ambos tipos de diferenciación, cuando no se aprecian diferencias estructurales evidentes, tal y como ocurre entre la dentina reparativa y el hueso, es necesario el empleo de técnicas de detección inmunohistoquímica que revelen la presencia de alguno de los componentes diferenciales propios de la dentina o del hueso. En el caso de la dentina, el componente diferencial empleado para poder distinguir el tipo de matriz extracelular sintetizada suele ser la sialofosfoproteína dentaria (DSPP).

En el presente trabajo el medio de cultivo empleado contenía un 10% de FCS y no se añadió ningún factor químico para estimular la diferenciación de las DPSC, aparte del ácido ascórbico. Sin embargo, los resultados obtenidos evidenciaron, mediante detección inmunohistoquímica, la presencia de sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) en las zonas alejadas de la matriz dentaria, especialmente en las zonas periféricas de la matriz colágena neoformada y en el citoplasma de las células próximas, lo que sugiere la diferenciación de las DPSC hacia células formadoras de tejidos duros y el inicio del proceso de mineralización de dicha matriz sintetizada.

Pero el hecho de que la DSPP se haya relacionado con la mineralización tanto de la dentina como de otros tejidos duros (Ritchie *et al.*, 1997; Begue-Kirn *et al.*, 1998; Baba *et al.*, 2004), sumado a que el análisis histológico de las muestras no reveló que las células adoptaran alguna morfología con rasgos característicos que las asemejasen a odontoblastos, ameloblastos, cementoblastos u osteoblastos, hace imposible determinar con exactitud el tipo de diferenciación que habrían seguido las DPSC, así como el tipo de tejido que estaban sintetizando.

La capacidad de las DPSC de formar dentina quedó demostrada en el trabajo publicado por Honda y

colaboradores (2009). En este estudio, utilizando un modelo animal (cerdo), se co-cultivaron DPSC en esponjas de colágeno con células provenientes del órgano del esmalte y con queratinocitos, respectivamente. Ambos tipos de muestras se trasplantaron a ratones atímicos. Los resultados mostraron que en las muestras donde se asociaron DPSC con células del órgano del esmalte, se había sintetizado dentina y esmalte, mientras que en las muestras donde se asociaron DPSC y queratinocitos únicamente se observó dentina neoformada. En ambos tipos de muestras la dentina que sintetizaron las DPSC fue dentina desorganizada, sin túbulos dentinarios y con áreas de osteodentina, similar a la dentina reparativa que se observa a veces en la cámara pulpar de algunos dientes. Asimismo, las células odontoblásticas que habían producido esta dentina presentaban una morfología ovalada sin mostrar ninguna prolongación celular hacia la dentina a modo de proceso odontoblástico, tal y como ocurre en la dentina reparativa.

Así pues, el análisis de los resultados de los trabajos publicados demuestra que las DPSC son capaces de diferenciarse en células formadoras de dentina, pero a la vez sugiere que por sí mismas no son capaces de producir una dentina con una configuración tridimensional (con túbulos dentinarios) similar a la dentina que encontramos

en los dientes, pues requieren de alguna estructura sólida sobre la que depositar el tejido neoformado, como gránulos de HA y TCP (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002). En los casos en los que no tenían esta estructura de soporte tridimensional, aunque se observaron depósitos de dentina, ésta era desorganizada y sin túbulos dentinarios, similar a la dentina terciaria (Zhang *et al.*, 2006; Honda *et al.*, 2009).

Otro estudio destacable es el realizado por Yu y colaboradores (2006), en el que cultivaron DPSC *in vitro* e *in vivo*, empleando un medio de cultivo acondicionado por células del germen dentario (TGC-CM). Para la preparación de este medio, se extrajeron gérmenes dentarios provenientes de crías de rata y se cultivaron sus células durante 7 días. El sobrenadante de esos cultivos se añadió al medio de cultivo empleado con las DPSC. Los resultados del estudio *in vitro* mostraron que en las muestras cultivadas con TGC-CM las DPSC adoptaron una morfología elongada, muy diferente a la que mostraron las DPSC en los cultivos de control, en los que se empleó un medio de cultivo convencional. El estudio de la expresión genética mediante detección inmunohistoquímica y RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real) reveló una alta expresión de fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína dentinaria (DSP) y de otras proteínas relacionadas con la síntesis de matriz dentinaria

(osteopontina, osteonectina, colágeno I, proteína de la matriz dentinaria I y sialoproteína ósea), en comparación con los cultivos control. Para el estudio *in vivo*, tras 7 días de cultivo en TGC-CM, las DPSC se implantaron en las cápsulas renales de ratas. Los resultados mostraron que en el 35% de las muestras se observaron complejos dentino-pulpaes en los que había células con una morfología típicamente odontoblástica, en contacto con una matriz no mineralizada similar a la predentina, y rodeada ésta por una matriz mineralizada similar a la dentina. Los resultados de este estudio nos indican que las señales químicas liberadas por las células del germen dentario tienen la capacidad inductora más precisa sobre las DPSC, pues no solo las estimula a depositar matriz extracelular mineralizada, sino que éstas lo hacen de forma ordenada y sintetizando un tejido morfológicamente reconocible, aun sin un elemento tridimensional previo que actúe a modo de soporte estructural.

En el presente estudio se produjo la diferenciación de las DPSC aun en las zonas alejadas a la matriz dentaria. Esto pudo producirse por la disolución de componentes de la matriz dentaria, lo que habría alterado la composición del medio de cultivo, tal y como se expuso anteriormente. Pero también pudo producirse por efecto de las señales químicas producidas por las DPSC que estaban en

contacto directo con la matriz dentaria. De manera que, tal y como sugieren algunos estudios, en los que se demuestra la capacidad inductora de las señales químicas intercelulares (Yu *et al.*, 2006; Honda *et al.*, 2009), las DPSC en contacto directo con la matriz dentaria se habrían diferenciado a células odontoblásticas y habrían liberado mediadores químicos que podrían inducir la diferenciación de las demás DPSC del cultivo, incluidas las que se encontraban más alejadas de la matriz dentaria.

En el estudio Preliminar del presente trabajo, se evaluó la influencia sobre el comportamiento de las DPSC de la presencia de ácido ascórbico en el medio de cultivo. Los resultados mostraron una mayor proliferación y un aumento de la síntesis de matriz extracelular en los grupos de muestras cultivadas con ácido ascórbico, en comparación con los grupos de muestras cultivados sin ácido ascórbico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos publicados anteriormente, en los que se ha relacionado el ácido ascórbico tanto con un aumento en la proliferación y en la síntesis de proteínas extracelulares de la matriz en cultivos de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSC) (Coelho *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2008), como en la inducción de la diferenciación osteoblástica de estas células (Wang *et al.*, 2006).

Además, como se ha expuesto anteriormente, en varios de los estudios en los que se ha demostrado la capacidad de diferenciación osteogénica de las DPSC (Gronthos *et al.*, 2000 y 2002; Zhang *et al.*, 2006; Waddington *et al.*, 2009; Karaöz *et al.*, 2010 y 2011), ésta se indujo en medios de cultivo enriquecidos con ácido ascórbico.

El papel del ácido ascórbico como regulador en la síntesis de colágeno ha sido demostrado desde hace tiempo (Murad y *et al.*, 1981), por lo que no es extraño pensar que su presencia en el medio de cultivo favorezca la síntesis de matriz extracelular, puesto que, como se ha demostrado en el estudio a microscopía óptica y a microscopía electrónica de las muestras, dicha matriz neoformada por las DPSC es rica en fibras de colágeno. Un aumento en la síntesis de matriz extracelular podría a su vez estimular la proliferación y la diferenciación de las DPSC, tal y como apuntan los resultados de los estudios realizados con BMSC.

Sin embargo, los resultados del presente estudio revelaron que si bien las muestras cultivadas con ácido ascórbico mostraron una mayor proliferación y un aumento de la síntesis de matriz extracelular a las cuatro semanas de cultivo, al aumentar el tiempo de cultivo hasta las seis semanas las diferencias respecto a las muestras cultivadas sin ácido ascórbico fueron pequeñas. Además, estas

diferencias fueron de tipo cuantitativo, en proliferación y volumen de matriz sintetizada, pero no de tipo cualitativo, pues el estudio de las muestras no reveló diferencias en la morfología de las células ni de las capas celulares formadas. Esto parece indicar que el ácido ascórbico, aunque puede favorecer o acelerar el proceso de diferenciación celular, no actuaría como elemento inductor de dicho proceso, pues tanto en las muestras cultivadas con ácido ascórbico, como en las cultivadas sin ácido ascórbico, se observaron los mismos cambios morfológicos en las DPSC.

En el presente trabajo, a la vista de los resultados obtenidos en el Estudio Preliminar, a la hora de realizar el Ensayo Optimizado se decidió cultivar todas las muestras con ácido ascórbico, pues esto otorgaba dos ventajas. Por un lado, acelerar y favorecer el proceso de diferenciación celular y de síntesis de matriz extracelular de las DPSC. Y, por otro lado, este aumento en la matriz extracelular sintetizada se traduciría en una mayor estabilidad en las capas celulares formadas sobre las matrices dentarias, lo que favorecería su conservación al procesar las muestras para su estudio microscópico.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas, y que constituyen nuestro trabajo para optar al grado de Doctor, nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

- I. La metodología empleada en el presente estudio permitió obtener, cultivar y caracterizar una población homogénea de DPSC humanas para el desarrollo del modelo experimental propuesto.
- II. Las matrices tridimensionales compuestas por tejido dentario radicular no desmineralizado constituyeron un entorno biológico favorable para la proliferación de las DPSC humanas, actuando, además, como inductor de su diferenciación.
- III. La inclusión de las muestras de DPSC cultivadas con matrices dentarias en parafina, para su estudio a microscopía óptica, y en resina Epon, para su estudio a microscopía electrónica, permitió su análisis microscópico en las muestras cultivadas durante cuatro semanas o más. En tiempos de cultivo más cortos, una y dos semanas, la unión de las capas celulares formadas por las DPSC y la matriz por ellas generada sobre la superficie de la matriz dentaria no fue, en general, lo suficientemente estable para emplear esta metodología.

- IV. El medio de cultivo enriquecido con ácido ascórbico estimuló la proliferación celular y aumentó la síntesis de matriz extracelular, con respecto a las muestras cultivadas en un medio sin esta sustancia.
- V. El tratamiento de las superficies dentarias mediante hipoclorito sódico permitió crear un entorno idóneo para la siembra, la proliferación y la diferenciación de las DPSC humanas, aunque fue necesario eliminar los restos de esta sustancia alojados en los túbulos dentinarios mediante un lavado minucioso. Los resultados obtenidos empleando clorhexidina fueron similares, si bien en algunos casos no fue tan eficaz limpiando los restos tisulares de la superficie dentaria.
- VI. En relación al tiempo de cultivo, a las dos semanas las DPSC habían comenzado a formar capas celulares cohesionadas sobre la superficie de la matriz dentaria y sintetizado matriz extracelular rica en colágeno. Sin embargo, fue a partir de las cuatro semanas cuando se observaron evidencias de la diferenciación de las DPSC hacia células de tipo odontoblástico.
- VII. Tanto la composición como la estructura tridimensional de la matriz dentaria fueron factores que condicionaron la diferenciación de las DPSC humanas.

- *In vitro*, sobre la dentina con los túbulos perpendiculares a la superficie las DPSC tendían a adoptar una morfología odontoblástica y a producir matriz extracelular rica en colágeno de tipo reticular.
- Sobre la dentina con los túbulos paralelos a la superficie las DPSC adoptaron una forma aplanada y sintetizaron una matriz extracelular similar a la dentina reparativa.
- Sobre el cemento las DSPC adoptaron una forma aplanada y produjeron una matriz extracelular con fibras de colágeno orientadas principalmente de forma perpendicular a la superficie dentaria, semejante a la matriz cementoide.
- Las DPSC alejadas de la matriz dentaria también sufrieron un proceso de diferenciación, formando capas celulares con cierto grado de organización y sintetizando matriz extracelular rica en colágeno.

6. BIBLIOGRAFÍA

Amano A. Host–parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontol* 2000. 2010; 54:9-14.

Arzate H, Chimal J, Hernández L, Díaz de León L. Human cementum protein 1 promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontal Res.* 1996; 31:144-148.

Arzate H, Zeicher-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol* 2000. 2015; 67:211-233.

Baba O, Qin C, Brunn JC, Jones JE, Wygant JN, McIntyre BW, Butler WT. Detection of dentin sialoprotein in rat periodontium. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112:163-170.

Barrancos J, Barrancos PJ. *Operatoria dental: integración clínica.* 4ª edición. Ed Médica Panamericana; 2006.

Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteo- genesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003; 82:976-981.

Bègue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:963-70.

Bennet JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *Journal of Cell Science.* 1991; 99:131-139.

Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Oral anatomy, histology and embryology. 4^a edición. Mosby-Elsevier; 2009.

Bhaskar SN. Histología y embriología bucal de Orban. 11^a edición. Ediciones Prado; 1991.

Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(8 Suppl):87-105.

Carda C, Peydro A. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. *Tissue Cell.* 2006; 38:141-150.

Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. 2011; 99:1-7.

Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu, NX, Lv X, Li Q, et al. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res*. 2015; Mar 24.

Choi K, Seo Y, Yoon H, Song K, Kwon S, Lee H, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng*. 2008; 105:586-594.

Choung H, Lee J, Lee D, Chuong P and Park J. The role of preameloblast-conditioned medium in dental pulp regeneration. *J Mol Hist*. 2013; 44:715-721.

Coelho MJ, Cabral AT, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM. *Biomaterials*. 2000; 21:1087-1094.

Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -

glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. 2000; 21:1095-1102.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008; 34:962-969.

D'aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Rullo R, Checchi V, et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool Mol Dev Evol*. 2008; 312B:408-415.

Eustaquio MV, Montiel JM and Almerich JM. Oral health survey of the adult population of the Valencia region (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15 (3):e538-e544.

Ferroni L, Gardin C, Sivoilella S, Brunello G, Berengo M, Piattelli A, et al. A hyaluronan-based scaffold for the in vitro construction of dental pulp-like tissue. *Int J Mol Sci*. 2015; 16:4666-4681.

Fitzgerald RJ, Morhart RE, Marquez C, Adams BO. Inhibition of caries in hamsters treated with staphylococcin 1580. *Infect Immun*. 1986; 54:288-90.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976; 4:267-274.

Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod.* 2011; 37(11):1536-1541

Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular bucodental.* 3ª edición. Editorial Médica Panamericana; 2009.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:13625-13630.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81:531-5.

Harada H, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakakura K, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130:773-783

Honda MJ, Shinmura Y, Shinohara Y. Enamel tissue engineering using subcultured enamel organ epithelial cells in combination with dental pulp cells. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189:261-267.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009; 88:792-806.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(2):605-615

Jo YY, Lee HJ, Kook SY, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*. 2007; 13: 767-773.

Karaöz E, Dogan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol*. 2010; 133:95-112.

Karaöz E, Demircan PC, Saglam Ö, et al. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial

stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2011; 136:455-473.

Kim NR, Lee DH, Choung P and Yang H. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108:e94-e100.

Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg.* 2006; 17:511-515.

Lee CP, Colombo JS, Ayre WN, Sloan AJ, Waddington RJ. Elucidating the cellular actions of demineralised dentine matrix extract on a clonal dental pulp stem cell population in orchestrating dental tissue repair. *J Tissue Eng.* 2015; 6:1-13.

Lei G, Yu Y, Jiang Y, et al. Differentiation of BMMSCs into odontoblast-like cells induced by natural dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2013; 58: 862-870.

Lijlberg B, Lindhe B, Berglundh T, Dhalen G. Some microbiological, histopathological and

immunohistochemical characteristics of progressive periodontal disease. *J Clin Periodont.* 1994; 21:720-727.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Periodontología clínica e implantología odontológica.* 5ª edición. Editorial Médica Panamericana; 2009.

Liu Y, Zheng Y, Ding G, et al. Periodontal Ligament Stem Cell-Mediated Treatment for Periodontitis in Miniature Swine. *Stem Cells.* 2008; 26(4): 1065-1073

Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development.* 1988;103:155-69.

Menaker L. *Bases biológicas de la caries dental.* Editorial Salvat; 1986.

Massler M. Preventive endodontics: vital pulp therapy. *Dental Clinics of North America.* 1967; 663-673.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:5807-5812.

Murad S, Grove D, Lindberg KA, Reynolds G, Sivarajah A, Pinnell SR. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Biochemistry*. 1981; 78:2879-2882.

Nakashima M, Iohara K. Mobilized Dental Pulp Stem Cells for Pulp Regeneration: Initiation of Clinical Trial. *J Endod*. 2014; 40:S26-S32.

Nam S, Won J, Kim C, Kim H. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells stimulated by the calcium phosphate porous granules. *J Tissue Eng*. 2011; 2011:1-10.

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: development, structure, and function. 8^a edición. Elsevier-Mosby; 2013.

Notarianni E, Evans MJ. Embryonic stem cells: a practical approach. Oxford University Press; 2006.

Núñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Arzate H, Villalobos C, et al. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J Periodont Res*. 2012; 47: 33-44.

Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*. 2005; 83:661-669.

Prasad M, Butler W, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res.* 2010; 51:404-417.

Qu T, Jing J, Ren Y, Ma C, Feng JQ, Yu Q, et al. Complete pulpodentin complex regeneration by modulating the stiffness of biomimetic matrix. *Acta Biomater.* 2015; 16:60-70.

Ritchie HH, Berry JE, Somerman MJ, Hanks CT, Bronckers ALJJ, Hotton D, et al. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105: 405-413.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000; 45:1013-1016.

Ruch, JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochemistry and Cell Biology.* 1998; 76: 923-938.

Schroeder. *Oral structural biology: embryology, structure and function of normal, hard and soft tissues of the oral cavity and temporomandibular joints.* Thieme; 1991.

Shao M, Fu Z, Cheng R, et al. The presence of open dentinal tubules affects the biological properties of dental pulp cells ex vivo. *Mol Cells*. 2011; 31:65-71.

Smith AJ, Tobias RS, Murray PE. Transdentinal stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. *J Dent*. 2001; 29:341-346.

Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol*. 2012; 57:109-121.

Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012; 57:1165-1175.

Takahashi k, Poole I, Kinane DF. Detection of IL-1 mRNA-expressing cells in human gingival crevicular fluid by in situ hybridization. *Arch Oral Biol*. 1995; 40:941-947.

Vallés-Lluch A, Novella-Maestre E, Sancho-Tello M, Pradas MM, Ferrer GG, Batalla CC. Mimicking natural dentin using bioactive nanohybrid scaffolds for dentinal tissue engineering. *Tissue Eng*. 2010; 16:2783-2793.

Waddington RJ, Youde SJ, Lee CP and Sloan A. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189:268-274.

Wang Y, Singh A, Xu P, Pindrus MA, Blasioli DJ, Kaplan DL. Expansion and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a vitamin C functionalized polymer. *Biomaterials*. 2006; 27:3265-3273.

Wang J, Ma H, Jin X, et al. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials*. 2011; 32:7822-7830.

Yu J, Deng Z, Shi J, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned médium. *Tissue Eng*. 2006; 12:3097-3105.

Zhang W, Walboomers XF, Kuppevelt TH, Daamen WF, and Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*. 2006; 27:5658-5668.

Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, and Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells

derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006; 12:2813-2823.

Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod.* 2011; 37:26-30.

Zheng L, Yang F, Shen H, et al. The effect of composition of calcium phosphate composite scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells. *Biomaterials.* 2011; 32:7053-7059.

Zhu X, Zhang C, Huang GTJ, et al. Transplantation of dental pulp stem cells and platelet-rich plasma for pulp regeneration. *J Endod.* 2012; 38:1604-1609.