



EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE OSTEODIFERENCIACIÓN DE CELULAS
MADRE MENSENQUIMALES AISLADAS DE PULPA Y LIGAMENTO
PERIODONTAL UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE INDUCCIÓN

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE OSTEODIFERENCIACIÓN DE CELULAS
MADRE MENSENQUIMALES AISLADAS DE PULPA Y LIGAMENTO
PERIODONTAL UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE INDUCCIÓN

NATALIA CARRILLO MENDIGAÑO

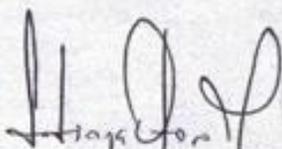
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
TESIS PRESENTADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS
COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BOGOTÁ 25 JULIO DE 2014

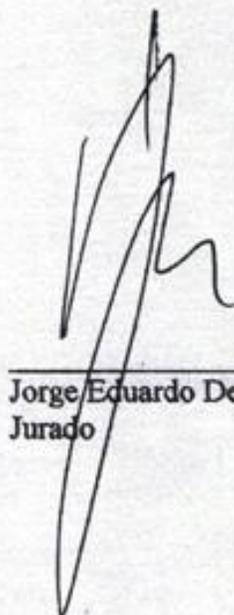
EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE OSTEODIFERENCIACIÓN DE CELULAS
MADRE MENSENQUIMALES AISLADAS DE PULPA Y LIGAMENTO
PERIODONTAL UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE INDUCCIÓN

NATALIA CARRILLO MENDIGAÑO

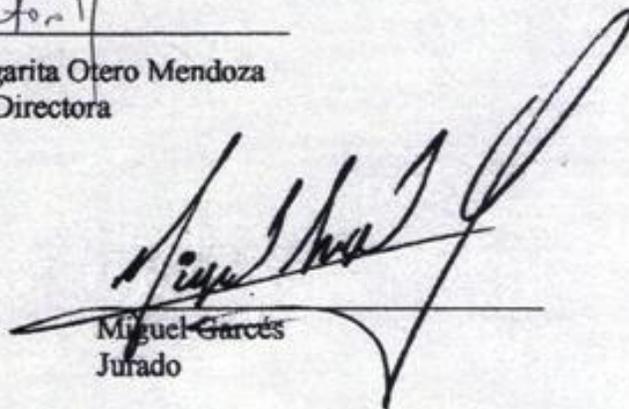
HOJA DE APROBACION



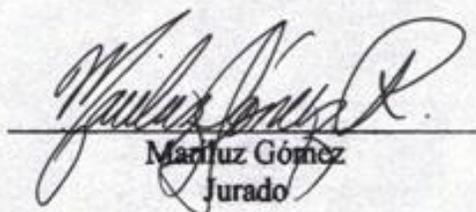
Liliana Margarita Otero Mendoza
Directora



Jorge Eduardo Delgado
Jurado



Miguel Garcés
Jurado



Mariluz Gómez
Jurado

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE OSTEODIFERENCIACIÓN DE CELULAS
MADRE MENSENQUIMALES AISLADAS DE PULPA Y LIGAMENTO
PERIODONTAL UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE INDUCCIÓN

NATALIA CARRILLO MENDIGAÑO

HOJA DE APROBACION

Dra Concepción Puerta B PhD
Decana Facultad de Ciencias

Dr Manuel Franco MD; PhD
Director de Posgrado

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE OSTEODIFERENCIACIÓN DE CELULAS
MADRE MENSENQUIMALES AISLADAS DE PULPA Y LIGAMENTO
PERIODONTAL UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE INDUCCIÓN

CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	8
2.1.OBJETIVO GENERAL	8
2.2.OBEJTIVOS ESPECÍFICOS	8
3. MARCO TEÓRICO	9
3.1.GENERALIDADES	9
3.1.1. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS	9
3.1.2. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS	10
3.1.3. CÉLULAS MADRE FETALES	11
3.1.4. CÉLULAS MADRE ADULTAS	11
3.2.CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	12
3.2.1. MARCADORES DE MEMBRANA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	13
3.3.DIFERENCIANCIÓN	15
3.4.NICHO Y CÉLULAS MADRE	19
3.4.1. NICHO Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	20
3.5.CÉLULAS MADRE DE ORIGEN DENTAL	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1.POBLACIÓN Y MUESTRA	23
4.2.PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA	24
4.3.TRANSPORTE	24
4.4.AISLAMIENTO Y FENOTIPIFICACIÓN	25

4.5.SEPARACIÓN POR EL MÉTODO DE MILTENYI	25
4.6.OSTEODIFERENCIACIÓN	26
4.7.EVALUACIÓN DE LA OSTEODIFERENCIACIÓN	28
4.7.1. TINCIÓN CON ROJO ALIZARIN	28
4.7.2. RT-PCR	28
4.7.2.1.EXTRACCIÓN DE RNA	28
4.7.2.2.RT PCR	29
5. RESULTADOS	30
5.1.AISLAMIENTO	30
5.2.CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	35
5.3.OSTEODIFERENCIACIÓN	37
5.3.1. RT PCR	37
5.3.2. TINCIONES	43
6. DISCUSIÓN	47
7. CONCLUSIONES	53
8. BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXO 1	65
ANEXO 2	68
LISTADO DE TABLAS	3
LISTADO DE FIGURAS	4

LISTADO DE TABLAS

TABLA I: Marcadores moleculares para evaluación de osteodiferenciación de células madre mesenquimales	18
TABLA 2: Expresión genética evaluada por RT PCR	29
TABLA 3: Obtención de la muestra	30

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de protocolo de diferenciación	28
Figura 2 Muestras con migración positiva	33
Figura 3 Migración positiva según grado de formación radicular	33
Figura 4 Migración negativa según grado de formación radicular	34
Figura 5: Migración según origen	34
Figura 6: Citometria de Flujo	35
Figura 7: Comparación de citometrías de flujo realizadas sobre todas las muestras con y sin separación por el método de Miltenyi	36
Figura 8. Comparación de expresión de genes en pulpas y ligamentos diferenciados	38
Figura 9 Comparación de expresión de genes en los diferentes medios de diferenciación	38
Figura 10 Comparación de expresión de genes día 14 y 21	39
Figura 11 Comparación de expresión de genes en muestras aisladas de ligamento según los medios de diferenciación	39
Figura 12 Comparación de expresión de genes en muestras aisladas de pulpa según los grupos de diferenciación	40
Figura 13: Comparación de la expresión de Runx2 en los diferentes medios	40
Figura 14: Comparación de la expresión de Colágeno I en los diferentes medios	41
Figura 15: Comparación de la expresión de Osteopontina en los diferentes medios	41
Figura 16: Comparación de la expresión de OPG en los diferentes medios	42
Figura 17: Comparación de la expresión genética de pulpas vs ligamentos	42
Figura 18 Tinción con Rojo Alizarin medio 5	43
Figura 19 Tinción con Rojo Alizarin medio 4	44
Figura 20 Tinción con Rojo Alizarin medio 2	44
Figura 21 Tinción con Rojo Alizarin Medio 1: Control Negativo	45
Figura 22 Tinción específica para fosfatasa alcalina leucositaria Medio 5	45
Figura 23 Tinción específica para fosfatasa alcalina leucositaria Medio 1 (Neg)	46

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo, las enfermedades musculoesqueléticas son la causa más común de dolor de larga duración y pérdida de habilidad, el tratamiento de estas condiciones representa en Estados Unidos un costo estimado de 269.3 billones de dólares por año¹, por otra parte en países en desarrollo, como Colombia, entre 10 y 15 millones de personas al año sufren lesiones óseas, discapacidades o inhabilidades como consecuencia de accidentes de tráfico, muchos de los cuales suceden en gente joven.

Es por esta razón que los defectos óseos de gran magnitud, han representado un reto para la cirugía reconstructiva, particularmente aquellos causados por trauma o por defectos relacionados con infecciones. El uso de injertos de hueso autólogo ha sido considerado como el estándar de oro para el tratamiento de este tipo de defectos², sin embargo, este procedimiento tiene varias desventajas dentro de las que se incluyen la limitada cantidad de hueso disponible y la afección del sitio donador, además del alto grado de reabsorción del injerto autólogo, lo que hace necesario tomar cantidades adicionales de hueso para mejorar el éxito del procedimiento.^{3,4}

Recientemente la regeneración ósea por ingeniería de tejidos ha sido considerada como una alternativa a la técnica de injerto autólogo, las células madre mesenquimales (MSC) de origen humano, han sido estudiadas para este fin^{5,6,7}, debido a su múltiple potencial de diferenciación dentro del que se encuentra el linaje óseo.

Las células madre mesenquimales se caracterizan principalmente por su capacidad de adherirse al plástico en cultivo, expresión positiva de marcadores de membrana CD 105, CD73, CD90 y CD146 entre otros y ausencia de expresión de marcadores de superficie CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79^{a25}.

El marcador CD146 en las células madre se relaciona con diferencias en la localización *in situ*, siendo mayormente expresado en células madre mesenquimales localizadas en la región vascular³¹

La mayoría de las células madre adultas utilizadas tienen su origen en el tejido medular, sin embargo, su uso ha sido limitado por la injuria que el procedimiento que su obtención

genera en tejidos sanos, y por la cantidad reducida de tejido que puede ser extraída, por tanto, se han identificado poblaciones de células madre obtenidas de tejidos alternativos como músculo, tejido adiposo, tejido conectivo⁸, la pulpa dental y el ligamento periodontal.⁹ Las células madre de origen dental fueron aisladas inicialmente por Gronthos y cols en el 2000⁵¹, posteriormente estas células fueron caracterizadas por expresar marcadores de membrana similares a los de otras células madre mesenquimales¹⁰.

Adicionalmente, se ha reportado que las células madre provenientes de la pulpa poseen capacidad osteogénica y condrogénica, mientras que las células madre provenientes del ligamento periodontal tienen además la capacidad de diferenciarse a adipocitos¹¹. Estas características multipotentes y la posibilidad de tener un acceso relativamente sencillo a estas células, las convierten en un blanco atractivo para los estudios de diferenciación, particularmente hacia el linaje osteoblástico, en respuesta a las necesidades de alternativas terapéuticas para los defectos óseos orales¹².

A medida que se ha profundizado en el conocimiento sobre las MSC se ha encontrado que la región anatómica en la que éstas están ubicadas, denominada nicho, regula su función por medio de moléculas secretadas, de superficie, señales mecánicas, arreglos espaciales y condiciones metabólicas particulares; estos factores activan cascadas de señalización intracelular que definen el linaje de diferenciación de las MSC¹³.

En condiciones de cultivo, la diferenciación de las MSC hacia el linaje osteogénico ha sido ampliamente probada¹⁴. Los suplementos más comunes para la diferenciación hacia el linaje óseo incluyen la dexametasona, glucocorticoide sintético que induce efectos transcripcionales de BSP, el ácido ascórbico, requerido para la hidroxilación de residuos de lisina y prolina del colágeno y los b-glicerofosfatos, suplemento necesario como fuente de fosfatos inorgánicos³. Otros suplementos usados para la osteodiferenciación incluyen la melatonina por sus efectos sobre la expresión de proteínas como ALP y BSP en células madre¹⁵. Sin embargo aún no se ha establecido la combinación óptima de condiciones de cultivo y administración de factores de crecimiento para dirigir la diferenciación celular⁵, se reporta por ejemplo que variaciones en la concentración de dexametasona pueden detener la diferenciación de las células madre hacia el linaje osteogénico y que el ácido ascórbico puede presentar variaciones debido a su inestabilidad en condiciones estándar de cultivo³.

En esta forma surgen los siguientes interrogantes: ¿Existen diferencias en la respuesta de células madre de origen dental a diferentes medios de osteoinducción?, ¿Hay variaciones entre la diferenciación osteogénica de células madre aisladas de tejido pulpar y tejido periodontal?, ¿Existe diferencia entre el éxito de aislamiento de células madre de pulpa y ligamento periodontal en diversos estadios de formación radicular? ¿Maniobras previas como la separación celular para células madre con microperlas Milteyi Biotec mejoran la recuperación de células madre obtenidas de ligamento y pulpa dental? La respuesta a estas preguntas ayudará a encontrar medios de diferenciación osteogénica más eficaces para el manejo de células madre provenientes de tejidos dentales. Este conocimiento permitirá en un futuro emplear esta alternativa para la regeneración tisular, ya que se considera que existe un gran potencial en esta área de investigación para resolver problemas clínicos que aquejan a la población general como los defectos óseos tanto en cavidad oral como en el resto del organismo.

El propósito de este estudio fue obtener células madre de pulpa y ligamento periodontal de individuos sanos y someterlas a diferentes medios de osteodiferenciación.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL:

Comparar la capacidad de osteodiferenciación de células madre aisladas de pulpa y ligamento periodontal de terceros molares cultivadas con diferentes medios de osteodiferenciación

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar células madre de pulpa y ligamento periodontal de terceros molares.
- Caracterizar fenotípicamente las células aisladas de pulpa y ligamento periodontal y comparar esta caracterización con la obtenida mediante células separadas con el sistema microreads (Milteny Biotec)
- Evaluar diferencias en la capacidad de diferenciación osteogénica entre células provenientes de pulpa y ligamento periodontal
- Evaluar diferencias en la osteodiferenciación de las muestras obtenidas con diferentes medios de cultivo

3. MARCO TEÓRICO

3.1. GENERALIDADES

Células Stem, Células madre o células troncales, son términos ampliamente usados para describir un gran variedad e células de diversas fuentes, que tienen la capacidad de auto renovarse para producir nuevas células madre con características similares a las de la célula original, diferenciarse en diversos tipos celulares especializados¹⁶ e, in vivo, reconstruir un tejido determinado.¹⁷

Las células madre pueden ser divididas en categorías:

3.1.4 Células madre embrionarias (EP):

Son células pluripotenciales, derivadas de la masa celular interna del blastocisto, un estado temprano del embrión de los mamíferos¹⁸, en humanos, este estado ocurre 5 a 6 días después de la fecundación y en ratones de 3 a 4 días; éstas células, son capaces de diferenciarse virtualmente en cualquier tipo celular y de autorenovarse indefinidamente en un estado indiferenciado;¹⁹ las células embrionarias, fueron obtenidas inicialmente del ratón (1981¹⁸)y posteriormente de blastocistos de primates y humanos en 1998²⁰, las líneas celulares obtenidas de estas células, han sido mantenidas en cultivo por más de 300 a 400 pases, y al ser inyectadas en un blastocisto muestran la capacidad de diferenciarse en formas maduras y funcionales de células de las tres capas primarias embrionales (ectodermo, endodermo, y mesodermo)¹⁷.

Estas células difieren de las células totipotenciales en que no pueden formar tejidos placentarios y adicionalmente, no pueden formar un embrión viable sin contribuciones de otros tipos celulares, el embrión del mamífero es totipotencial hasta el estado de 16 células, después de esto las células de la mórula se diferencian en destinos definidos. Por otra parte, el término de células con multipotencialidad, es aplicado a células que tienen el potencial

de diferenciarse en dos o más tejidos pero no necesariamente forman múltiples capas embrionarias.²¹

Algunas de las desventajas para el uso de estas células incluyen los obstáculos éticos que supone la destrucción del embrión para obtenerlas, especialmente en investigaciones en humanos, el riesgo de formación de tumores y la dificultad para controlar el crecimiento y diferenciación; adicionalmente, el uso de materiales como suero fetal bovino requeridos para su cultivo generan una barrera para la utilización terapéutica en humanos.

3.1.2. Células madre pluripotenciales inducidas (Ips)

Estas células son derivadas de células adultas no pluripotentes, que son artificialmente transformadas en células pluripotentes, teóricamente, cualquier célula somática puede ser utilizada para este fin¹⁸; esta reprogramación de las células para que tengan un comportamiento similar a la de las células madre embrionarias tiene lugar por un incremento artificial de la expresión de genes específicamente pluripotentes²¹.

Los métodos utilizados para realizar esta transformación artificial de células adultas, incluyen técnicas de transfección con retrovirus, adenovirus o lentivirus que inducen la activación de oncogenes en las células candidatas, también han sido descritas técnicas por expresión de plásmidos para inducir genes pluripotentes pero las colonias obtenidas con este método suelen ser ineficientes. Recientemente, se han realizado avances en la utilización de mRNAs modificados para reprogramar células adultas, este último método, puede constituirse en el método más seguro y eficiente de reprogramación de células adultas²¹.

Los perfiles de expresión de las células madre pluripotenciales inducidas y las células embrionarias, son muy similares, al igual que las características de crecimiento, las modificaciones epigenéticas y el potencial de diferenciación; sin embargo, existen algunas diferencias que sugieren que la reprogramación de las células es incompleta, adicionalmente, este proceso está asociado a una alta tasa de formación de tumores¹⁸.

3.1.3. Células madre fetales

Este grupo se caracteriza porque el origen de las células madre está en el feto o en estructuras extra embrionarias de origen fetal (fluido amniótico, membrana amniótica, cordón umbilical, placenta, jalea de Wharton)¹⁸, El cordón umbilical (UC) ha sido utilizado como una fuente alternativa de células madre hematopoyéticas, células progenitoras y células madre mesenquimales, se ha reportado que células estromales primitivas aisladas del cordón umbilical y la jalea de Wharton pueden ser diferenciadas en tipos celulares como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, cardiomiocitos y neurocitos; adicionalmente, se ha encontrado que las células obtenidas de este origen, expresan marcadores celulares similares a los de las células madre mesenquimales como CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, y una capacidad de proliferación invariable incluso después de 30 pases.⁸ Sin embargo, estas células, muestran una capacidad de diferenciación restringida hacia algunos linajes, particularmente hacia el linaje adipogénico¹⁸.

La facilidad relativa para acceder a estas células y la alta proliferación las convierte en un buen recurso para la medicina regenerativa, considerándolas un intermedio operacional entre células madre embrionarias y células madre adultas¹⁷.

3.1.4. Células madre adultas (SSC)

Estas células somáticas multipotentes, se encuentran en tejidos diferenciados y su función es mantener y regenerar los tejidos dañados reemplazando las células perdidas¹⁸. Si bien la mayoría de estas células cumplen con las características de auto renovación y habilidad para diferenciarse a múltiples linajes, el grado en el cual estas características se presentan es menor que el reportado para células madre embrionarias¹⁸.

Algunos ejemplos de este tipo de células son las células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y células madre endoteliales.

3.2. CELULAS MADRE MESENQUIMALES

Son células somáticas provenientes de tejidos mesenquimales que cumplen las características generales de las células madre de autorenovación y múltiple diferenciación en linajes mesenquimales (tejido conectivo esquelético, hueso, cartílago, estroma de médula y adipocitos), estas células fueron inicialmente identificadas en médula ósea pero posteriormente fueron aisladas de músculo, tejido adiposo y tejido conectivo dentro del que se ubican la pulpa y ligamento periodontal de adultos humanos²².

Adicionalmente, las MSC tienen interacciones especiales con el sistema inmune, esto debido al bajo nivel de expresión de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y a la ausencia de expresión de MHC II, características que las protegen de la acción de las células natural killer²³.

Las MSC tienen un efecto en la proliferación de células T y B que una vez activadas, pueden ser detenidas en la fase G0/G1 del ciclo celular por acción de factores solubles y contactos célula-célula inducidos por las MSC; algunos de los factores solubles involucrados son interferón- γ , interleuquina 1 β , TGF- β 1 entre otros; adicionalmente, las MSC expresan TLR receptores (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5), la unión de TLR3 y TLR4 con sus ligandos naturales puede suprimir la actividad inmunomodulatoria de las MSC²³.

El potencial terapéutico de las células madre mesenquimales ha incrementado su interés en una amplia variedad de disciplinas, por esta razón el comité de células madre y tejidos mesenquimales de la sociedad internacional de terapia celular propone unos criterios mínimos para definir las células madre mesenquimales humanas:

1. Deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones estándar de cultivo; si bien la adhesión al plástico no es una propiedad altamente específica, excluye el linaje hematopoyético existente en la cavidad medular, otros tipos

celulares mas diferenciados que pueden encontrarse en las muestras para aislamiento de células madre mesenquimales son incapaces de expandirse in vitro durante varios pases, resultando en un predominio de células madre al final de la preparación.²⁴

2. El 95% de las células deben expresar los marcadores CD 105, Cd 73 y CD 90 medidos por citometría de flujo y menos del 2% expresar los marcadores CD 45, CD 34, Cd 14, Cd 11b, CD 79^a, CD19 y marcadores HLA-DR de superficie
3. Deben diferenciarse in vitro a osteoblastos adipocitos y condroblastos²⁵.

3.2.1. MARACADORES DE MEMBRANA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

CD 105 es conocido como endoglin, una glicoproteína homodimérica transmembranal que es altamente expresada en células endoteliales y que actúa como un co-receptor de TGF- β , lo que regula en las células endoteliales la proliferación y la angiogenesis²⁶, esta proteína es expresada en células madre hematopoyéticas, mesenquimales y neurales²⁷.

CD 73, conocida como ecto 5' nucleotidasa, el segundo marcador requerido para la caracterización de MSC, es una enzima localizada en la superficie celular de varios tipos celulares como linfocitos y células madre, encargada de catalizar la desfosforilación extracelular de la purina y pirimidina ribo y desoxiribonucleosidos monofosfatos a los correspondientes nucleosidos²⁸.

Por otra parte CD 90 (Thy-1) es una proteína de superficie de 25-37 kDa anclada al glicosilfosfatidilinositol, involucrada en la activación de células T, apoptosis, supresión de tumores, cicatrización y fibrosis, expresada en varios tipos celulares incluyendo fibroblastos, células endoteliales, neuronas y células hematopoyéticas²⁹.

Otros marcadores frecuentemente usados para caracterizar células madre son Stro-1, proteína de superficie celular expresada por células estromales de la médula ósea³⁰ y CD 146, molécula de superficie celular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas expresada en células endoteliales humanas. Las células madre mesenquimales CD 146+ pueden secretar factores de crecimiento que modulan la función de las células madre hematopoyéticas; la expresión de este marcador en células madre mesenquimales, está relacionada con diferencias en la localización in situ y concentraciones microambientales de oxígeno, siendo mayormente expresado en células madre mesenquimales localizadas en la región vascular³¹.

Para asegurar que las MSC estudiadas no sean confundidas con otros tipos celulares, se recomienda que estas células carezcan de la expresión de antígenos hematopoyéticos como CD 45 (marcador pan-leucocítico), CD 14, CD 11b (predominantemente expresadas en monocitos y macrófagos)²⁴ y CD 34 (marcador de progenitores hematopoyéticos y células endoteliales), sin embargo, se encuentran reportes de células madre mesenquimales positivas para este último marcador, particularmente las células positivas para Stro-1³².

Teniendo en cuenta la heterogénea población de MSC que puede ser obtenida, se han desarrollado métodos para estandarizar su aislamiento, uno de ellos es el método de separación celular, Milteyi Biotec que mediante el uso de microperlas (partículas magnéticas acopladas a anticuerpos) puede seleccionar subpoblaciones celulares específicas en forma positiva. Después de esta separación las células seleccionadas pueden ser usadas para expansión y cultivo entre otras³³.

3.3. DIFERENCIACIÓN

En un intento por simular los estímulos que conducen a la diferenciación de las células madre, se han desarrollado diferentes medios de cultivo, que al interactuar con las MSC determinan el tipo de diferenciación de las mismas:

Diferenciación adipogénica

El proceso de diferenciación hacia células adiposas es inducido generalmente por suplementos que incluyen Dexametasona, insulina, indometacina y 3-isobutil-1-metil-xantina. Esta diferenciación es caracterizada por una secuencia de eventos durante los cuales los preadipocitos se dividen hasta lograr confluencia, cuando han sido diferenciados, se convierten en células esféricas que expresan varios tipos de proteínas de matriz extracelular dentro de las que se encuentran fibronectina, laminina y colágeno tipo 1, 3, 4, 5 y 6³.

Los marcadores moleculares tempranos de diferenciación adipogénica son lipasa lipoproteína y la cadena 2 del colágeno tipo 6; mientras que leptina, FABP4 y adiponectina son expresadas durante etapas posteriores. En etapas finales, los adipocitos diferenciados se caracterizan por el acumulo de vacuolas intracelulares ricas en lípidos que pueden ser teñidas con Red O³.

Diferenciación condrogénica:

Las condiciones para diferenciación condrogénica de las MSC incluyen un estrecho contacto célula-célula y la administración de suplementos que incluyen dexametasona, ácido ascórbico, TGFB, BMP, factor de crecimiento fibroblástico y factor de crecimiento insulínico. Durante el proceso de diferenciación las MSCs adquieren una forma redondeada, la matriz extracelular se caracteriza por una red de colágeno

(predominantemente tipo II) y la agregación de proteoglicanos y glicosaminoglicanos de alto peso molecular que pueden ser detectados por la técnica de Alcian Blue³.

A nivel molecular, tempranamente, el factor de transcripción SRY (sox9) controla la expresión de los genes de colágeno tipo 2, 9, 10, 11 y agrecan; por unión del promotor de estos genes³.

Diferenciación osteogénica:

El método clásico para la osteo diferenciación consiste en incubar las células madre en una monocapa confluyente con combinaciones de dexametasona (dex), b-glicerol fosfato (b-GP) y ácido ascórbico por varias semanas, también se han reportado combinaciones de Vitamina D3, TGFb y BMPs³.

Dex, es un glucocorticoide sintético que ha demostrado ser un requerimiento esencial para la diferenciación de las MSCs en células osteoprogenitoras³⁴; si bien los mecanismos de acción de Dex en la diferenciación de las células madre no han sido totalmente dilucidados, se ha encontrado que induce efectos transcripcionales (de BSP por ejemplo) al unirse a elementos de respuesta a glucocorticoides en la región promotora del gen BSP³.

Adicionalmente Dex favorece la expresión de integrina A5 y la molécula TAS, las cuales se han visto relacionadas con la diferenciación osteoblástica por activación de la transcripción de los genes dependientes de Runx-2¹⁸.

Estudios realizados para evaluar la concentración ideal de Dex para osteoinducción reportan que la concentración ideal es 10nM correspondiente a su concentración fisiológica, a mayores concentraciones, Dex inhibe la diferenciación osteoblástica y conduce a una osteoporosis inducida; en adición la proliferación es negativamente afectada, principalmente debido al efecto inhibitorio de los glucocorticoides en la síntesis de colágeno³.

Por otra parte, b-GP funciona como una fuente importante de fosfatos inorgánicos que son esenciales para la mineralización de la matriz, b-GP es hidrolizado enzimáticamente por la fosfatasa alcalina convirtiéndose en la fuente primaria para las células madre mesenquimales para formar depósitos CaP in vitro³⁴; usualmente son usadas concentraciones de 5 -10nM para osteodiferenciación de MSCs²⁸.

El ácido ascórbico, juega un papel fundamental como cofactor para la hidroxilación de los residuos de lisina y prolina en el colágeno. Recientes estudios muestran que la presencia de asc-2-p en el cultivo de MSCs sobre regula la expresión de los genes relacionados con el ciclo celular y mitosis, mientras que la ausencia de Asc-2-P conduce a la reducida expresión de fosfatasa alcalina y a la inhibición del acumulo de calcio. usualmente, se usan concentraciones entre 50 a 500 1M para la osteoinducción de MSCs²⁸.

Otros suplementos como la melatonina, han demostrado también la habilidad de promover diferenciación de células pluripotentes al linaje osteoblástico, evaluado por su efecto en el incremento en los niveles de expresión de varios genes, incluida la sialoproteína ósea y la fosfatasa alcalina³⁵, cuando esta es utilizada en concentraciones de 50nM³⁶.

Cuando las MSCs son diferenciadas a células osteoblásticas adquieren una forma cuboidal, producen matriz extracelular compuesta principalmente por colágeno tipo I y en un estado posterior forman nódulos o agregados que pueden ser teñidos positivamente por las técnicas de rojo alzarin y von Kossa. Adicionalmente, se observa un incremento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y el contenido de calcio²⁸.

A nivel molecular, se observa la expresión de genes específicos de hueso que confirman la osteodiferenciación, algunos de los marcadores utilizados se encuentran resumidos en la tabla I

TABLA I: Marcadores moleculares para evaluación de osteodiferenciación de células madre mesenquimales

AUTOR	ALP	COLI	IGFBP-5	NURR1	ZHX3	JUNB	OSTERIX	RUNX2	Osteocalcina	Osteopontina	Osteonectina	PPA2	BSAP
Li JH, Liu ³⁷	X	X					X	X	X				X
Atari M, ⁹	X	X							X		X		
Mori G. ³⁸	X	X	X	X		X				X			
Zhang W. ³⁹	X	X						X	X				
Suehiro F. ⁴⁰					X		X	X					
Kim BS, ⁴¹	X	X						X					
Biman B. ⁴²									X	X	X	X	
Miraoui H, ⁴³	X	X						X	X				
Kristopher A. ⁴⁴								X	X			X	
PoliniA ⁴⁵ ,	X							X					X
Schantt i, ⁴⁶	X	X											

X EVALUADA POR EL AUTOR

3.4. NICHOS Y CELULAS MADRE

Las células madre, residen en microambientes altamente regulados llamados nichos, estos microambientes formados por células estromales, nutren las células madre y les permiten, mediante un diálogo constante mantener un balance de autorenovación y diferenciación para favorecer la homeostasis tisular⁴⁷.

El nicho, por medio de moléculas secretadas y de superficie, señales mecánicas, arreglos espaciales y condiciones metabólicas particulares, tiene la capacidad de regular el destino final de las células madre definiendo su linaje de diferenciación¹³, adicionalmente, puede generar estímulos apoptóticos que modifican el número de células madres disponibles; esta interacción protege a las células madre de sobre producción que si no es adecuadamente controlada puede conducir al desarrollo de cáncer⁴⁷.

Bajo condiciones homeostáticas adecuadas, un nicho contiene unas pocas células madre (dos o tres), con una alta capacidad de diferenciación⁴⁸. Una célula madre individual puede dar lugar a dos células hijas idénticas (división simétrica) o a dos células hijas no idénticas, una manteniendo la identidad de la célula madre y la otra comenzando diferenciación de linaje (división asimétrica)⁴⁷ eventualmente, la célula hija que ha comenzado su proceso de diferenciación puede abandonar el nicho; la proliferación y diferenciación de estas células depende en gran medida de la adhesión y comunicación entre ellas y las células estromales⁴⁷.

Ejemplos importantes de las herramientas regulatorias del nicho sobre las células madre, son los factores de crecimiento y citoquinas como ligandos Notch, proteínas Wnt, BMP, entre otros, estos factores de regulación celular se enfocan principalmente en la conservación del perfil de expresión génica de las células y su microambiente, una parte importante de esta comunicación es realizada extracelularmente vía cascadas de feedback en circuitos autocrinos o paracrinos que interactúan con la matriz extracelular y las células adyacentes⁴⁹.

Otro aspecto importante en la regulación del nicho sobre las células madre, es la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular; en particular para el sistema hematopoyético moléculas de adhesión a matriz extracelular como cadherinas, integrinas y osteopontina han mostrado efectos en la regulación de la función de las células madre; adicionalmente, se ha sugerido que el arreglo espacial específico de los componentes de la matriz extacelular, la tensión de oxígeno, y la concentración de glucosa, aminoácidos y metabolitos, también son factores relevantes en la función reguladora del nicho¹³.

3.4.1 NICHOS DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales, han sido encontradas en diferentes nichos, como periostio, membrana sinovial y médula ósea, sin embargo, el conocimiento del nicho de las células madre mesenquimales en sus tejidos de origen es muy pobre; se ha sugerido que éstas se ubican en áreas perivasculares de la médula ósea donde pueden estar en cercana asociación con las células madre hematopoyéticas (HSC) y ejercer una función reguladora en la diferenciación y multiplicación de las mismas⁴⁷

La presencia de las MSC es necesaria para el mantenimiento de las HSC, ya que secretan un rango de factores de crecimiento que puede modular la función de las células hematopoyéticas.; en contraste, las HSC pueden inducir a las células madre mesenquimales a diferenciarse en células de linaje osteoide³¹, sin embargo, estudios recientes sugieren que el destino in vivo de las MSC es ampliamente determinado por factores de crecimiento como IFN- γ , TGF- β , PPAR γ y Wnt;⁴⁹ IL-6 por ejemplo, aparece como un elemento crucial para el mantenimiento del pool de MSC en médula ósea y del soporte de las HSC; la hipótesis actual de que las dos células madre adultas (HSC y MSC) habitan en nichos comunes en la médula ósea sugiere una regulación cruzada entre las células hematopoyéticas y mesenquimales, consecuentemente los linajes de diferenciación de ambos tipos celulares pueden estar relacionados¹³.

Por otra parte, se han desarrollado estudios para evaluar la influencia de los miRNA en la diferenciación de MSC, los miRNA, son un grupo pequeño de nucleótidos no codificantes de RNA monocatenario que regulan la expresión de genes por unión con su blanco: un RNA mensajero (mRNAs), lo que resulta en la represión traslacional del mRNA o su degradación. Recientemente, se ha encontrado que en MSC humanas, la expresión disminuida de miR-138 se ha asociado con diferenciación osteogénica y adipogénica, mientras que miR-204/211 y miR-637 han mostrado controlar el balance entre diferenciación osteoblástica y adipogénica, sin embargo, es necesario tener presente, que el blanco y la función biológica de los miRNAs es dependiente del medioambiente celular, lo que ratifica la influencia del nicho en la diferenciación de células madre⁴⁹.

3.5. CELULAS MADRE DE ORIGEN DENTAL.

La formación embriológica de los dientes, se caracteriza por una estructurada interacción de células ectodérmicas epiteliales y ectomesénquima originado por la migración de las células de la cresta neural⁵⁰. Este tejido ectomesenquimal origina la pulpa y el ligamento de los dientes tanto deciduos como permanentes, por sus características mesenquimales, al igual que todos los tejidos de este tipo alberga en condiciones de normalidad células madre mesenquimales. Estas células fueron aisladas inicialmente por Gronthos y cols(2000)⁵¹, mediante digestión enzimática de tejido pulpar; al análisis inmunohistoquímico estas células mostraron marcadores similares a las células mesenquimales extraídas de médula ósea. Estudios posteriores de este mismo grupo confirman que estas células cumplen con los criterios necesarios para ser caracterizadas como células madre, como la capacidad de diferenciarse a adipocitos, células de la cresta neural y odontoblastos⁵².

Existen dos métodos reportados en la literatura para el aislamiento de células madre pulpares, el método de explantes y el de digestión enzimática⁵³. El método de explantes, consiste en la migración de células desde fragmentos de tejido pulpar (explantes) y la posterior adherencia a las superficies plásticas de cultivo⁵⁴. El segundo

método, se caracteriza por la digestión enzimática de la pulpa y posterior caracterización de las células basada en marcadores de superficie⁵¹.

Las células obtenidas por estos medios, tienen resultados favorables para la diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, otros tipos de células hacia las que pueden diferenciarse incluyen células de musculo liso y neuronas⁵³.

Por otro lado, el primer reporte de presencia de células pluripotentes en ligamento periodontal fue realizado por McCulloch y cols en 1985⁵⁵, en un experimento realizado en ratones. Posteriormente, la caracterización de estas células como células madre mesenquimales fue confirmada mediante la expresión de marcadores de membrana, y la capacidad de osteodiferenciación hacia linajes osteogénicos, adipogénicos condrogénicos^{56,57}.

Las células madre de ligamento periodontal han sido caracterizadas como positivas para los marcadores CD 9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD53, CD73, CD 90, CD 105, CD106, CD146, Cd 166 y STRO-1^{57,70},⁵⁸. Estos dos últimos marcadores, sugieren una posible ubicación perivascular.

Otras poblaciones de células madre de origen dental incluyen las SHED o células extraídas de la pulpa de dientes temporales, SCAP o células extraídas de la papila apical y DFSC o células extraídas del folículo dental. Todas estas células cumplen con los requisitos mínimos para ser catalogadas como células madre¹⁰.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

La Población fue establecida como pacientes con indicación terapéutica de extracción de terceros molares que acudieron a la Clínica de cirugía de la Pontificia Universidad Javeriana.

Criterios de inclusión:

- Pacientes sistémicamente sanos
- Dientes sin enfermedad periodontal
- Dientes en cuyo procedimiento quirúrgico no haya sido necesaria la odontectomía
- Dientes con tejido pulpar y ligamento periodontal sano
- Dientes sanos con esmalte intacto
- Terceros molares con estadio radicular de nolla 8, 9 y 10

Criterios de exclusión:

- Pacientes fumadores de 6 o más cigarrillos día
- Pacientes menores de 13 años y mayores de 40 años
- Pacientes que estén consumiendo medicamentos o que hayan consumido medicamentos en los últimos tres meses (ej. antiinflamatorios, analgésicos, antibióticos, corticoesteroides)
- Dientes en cuya exodoncia el instrumental (elevadores) haya alterado la integridad del ligamento periodontal
- Erosiones atricción bruxismo

El universo de pacientes que acudieron a la consulta durante el periodo de recolección de la muestra fueron 150 pacientes, de estos, cumplieron con los criterios de inclusión previamente descritos (50 pacientes) de los cuales fueron tomadas 30 muestras.

4.2. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Tercer molar erupcionado:

Antes de realizar el procedimiento quirúrgico se informó al paciente del alcance del estudio y fue firmado el consentimiento informado previamente aprobado por el comité de ética de la facultad de odontología de la Pontificia Universidad Javeriana; posteriormente, el paciente realizó un enjuague antiséptico con enjuague libre de alcohol y profilaxis sobre el diente que iba a ser extraído, una vez realizados los procedimientos anestésicos tronculares con lidocaína mas vasoconstrictor al 2% se procedió a la sindesmotomia, luxación y escisión del diente cuidando que el elevador no sobrepasara el tercio medio radicular del mismo.

Tercer molar incluido

Antes de realizar el procedimiento quirúrgico se informó al paciente del alcance del estudio y fue firmado el consentimiento informado previamente aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana; posteriormente, el paciente realizó un enjuague antiséptico con enjuague libre de alcohol, una vez realizados los procedimientos anestésicos tronculares con lidocaína mas vasoconstrictor al 2% se procedió a la incisión, levantamiento del colgajo, osteotomía, luxación y escisión del tercer molar.

4.3 TRANSPORTE

Inmediatamente realizada la escisión del tercer molar, este fue embebido en un frasco estéril con medio de transporte (DMEM + 3% de antibiótico) y fue llevado al laboratorio en un tiempo máximo desde el proceso de la extracción de 30 minutos haciendo uso de una nevera de transporte y gel frío para mejorar la conservación de la muestra.

4.4 AISLAMIENTO Y FENOTIPIFICACIÓN

En la cámara de flujo laminar se tomó la muestra del tercio apical y medio del ligamento periodontal mediante una hoja de bisturí # 15, esta muestra fue sometida a la acción de las enzimas dispasa (0,4mg/ml) y colagenasa (0,3mg/ml) por 15 minutos para favorecer su disgregación; posteriormente los dientes fueron seccionados con pieza de alta con abundante irrigación y fresa zecria estériles, una vez seccionados, la pulpa fue extraída mediante una cucharilla #5, esta muestra fue disgregada mecánicamente y sometida a la acción de dispasa (0,1mg/ml) durante 15 minutos.

Los explantes disgregados tanto de pulpa como de ligamento periodontal, fueron colocados en cajas de petri e incubados en condiciones estándar de CO₂ (5%) y temperatura (37°C) hasta permitir su fijación en la caja, posteriormente se agregaron 5ml de medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino 10% y antibiótico 1%; las cajas de Petri con las muestras fueron incubadas en condiciones estándar hasta obtener migración celular. Una vez la migración celular tuvo lugar las células fueron desprendidas mediante la acción de tripsina y cultivadas en cajas independientes hasta 3 pases; posteriormente una alícuota de cada muestra fue sometida a citometría de flujo para su caracterización mediante la evaluación de los anticuerpos CD90, CD 105, CD45, CD34 y STRO-1.

4.5 SEPARACIÓN POR EL MÉTODO DE MILTENYI

Para evaluar la efectividad del método separación por microperlas Miltenyi biotec una alícuota de las muestras fue sometida a la acción de dicha separación y posteriormente fenotipificada mediante citometria de flujo para evaluación de los anticuerpos CD90, CD 105, CD45, CD34 y STRO-1

4.6 OSTEODIFERENCIACIÓN

Para la selección de los medios de osteodiferenciación de las células se plantearon inicialmente 5 medios de diferenciación con las siguientes características:

Medio 1: Control negativo: DMEM low Glucose adicionado de regulador de ph Hepes

Medio 2: Medio base: DMEM low Glucose adicionado de regulador de ph Hepes, 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico.

Dexametasona: concentración de 100nM sigma

Acido ascórbico: concentración 200uM sigma

B-Glicerofosfato: concentración 10mM sigma

Melatonina: concentración 50uM sigma

Medio 3:

Medio de osteodiferenciación comercial StemPro Osteogénesis

Medio 4:

Medio base: DMEM low Glucose adicionado de regulador de ph Hepes, 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico.

Dexametasona: concentración de 100nM sigma

Acido ascórbico: concentración 200uM sigma

B-glicerofosfato : concentración 10mM sigma

Medio 5:

Medio base: DMEM low Glucose adicionado de regulador de ph Hepes, 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico

Dexametasona: concentración 100nM Stemcell Technologies

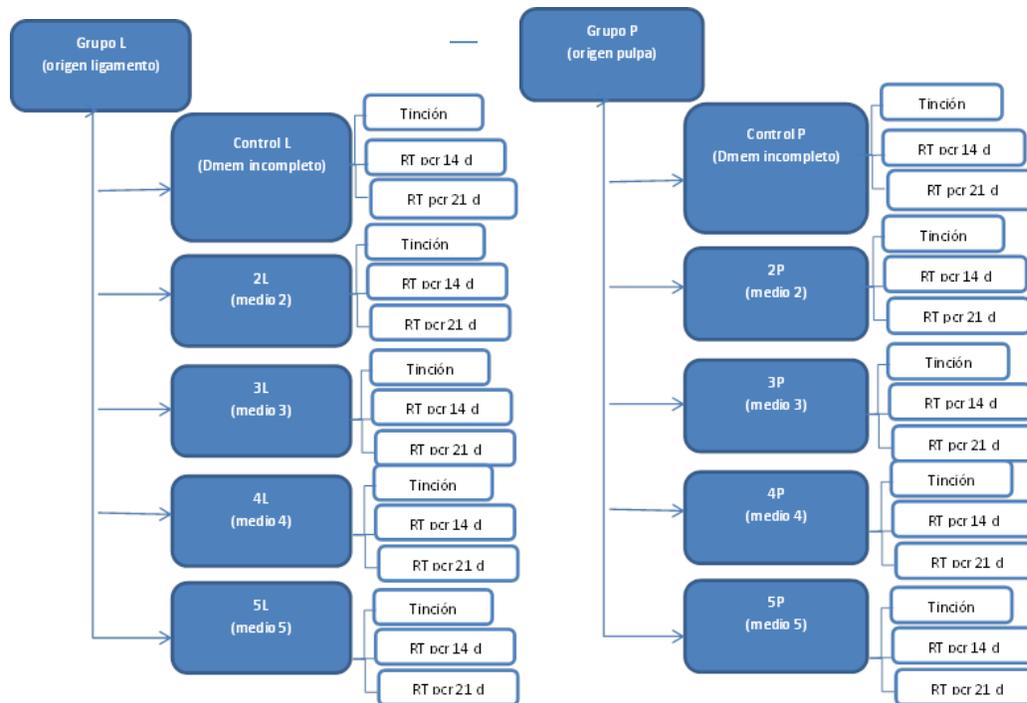
Ascorbato 2-fosfato: concentración 50uM Stemcell Technologies

B-Glicerofosfato: concentración 10mM stem cell Technologies

Adicionalmente se utilizaron como control positivo osteoblastos de la línea Clonetics™ Normal Human Osteoblast Cell System de la casa comercial Lonza.

Las muestras de pulpa y ligamento previamente caracterizadas, fueron sembradas en pozos de 10 cm para su posterior osteodiferenciación constituyendo los siguientes grupos:

Figura 1: Esquema de protocolo de diferenciación



Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ hasta alcanzar confluencia del 100% en cada uno de los pozos, una vez obtenida esta confluencia se utilizó el medio indicado para cada grupo cambiándose 2 veces por semana; un pozo de cada subgrupo de cada muestra fue desprendido mediante la acción de tripsina al día 14 y otro al día 21 de cultivo; los pellets obtenidos fueron almacenados a -70°C; el pozo restante de cada subgrupo se fijó en el día 21 de cultivo para posterior tinción con rojo alizarin.

4.7 EVALUACIÓN DE OSTEODIFERENCIACIÓN

4.7.1 Tinción con rojo alizarin: un pozo de cada uno de los subgrupos de cada muestra cultivado por 21 días, fue fijado con formaldehído bufferado 4% y posteriormente teñido con rojo alizarin con el fin de evaluar los depósitos de calcio

4.7.2 RT-PCR:

4.7.2.1 EXTRACCIÓN DE RNA

Los pellets obtenidos en los días de diferenciación 14 y 21 de cada subgrupo de cada muestra y un control positivo de osteoblastos de la línea Clonetics™ Normal Human Osteoblast Cell System de la casa comercial Lonza, fueron procesados para extracción de RNA mediante el siguiente protocolo de extracción:

Adicionar Proteinasa K 10ul a la muestra

Mantener la muestra con la adición de Proteinasa K a 55°C durante 4 horas

Adicionar 750ul de Trizol, reposar durante 15 minutos

Adicionar 250ul de Cloroformo reposar en hielo durante 15 minutos

Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm 4°C

Transferir la fase acuosa

Adicionar 500ul de Isopropanol

Adicionar 50ul de acetato de sodio 3M

Mantener a -70°C 12 horas

Centrifugar 20 minutos a 14000 rpm 4°C

Descartar sobrenadante

Adicionar 1ml de etanol 75%

Centrifugar 20 minutos a 14000 rpm 4°C

Descartar sobrenadante

Permitir evaporación de líquido restante

Adicionar 30ul de agua DPEC

Una vez obtenido el RNA de la muestra fue sometido a cuantificación por nanodrop

4.7.2.2 RT-PCR

Una alícuota de concentración de 200ng/ul de cada muestra fue sometida a la acción de *DNase I, Amplification Grade invitrogen (18068-015)*, posteriormente se realizó la retrotranscripción utilizando el Kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase de invitrogen(18080-093)*; realizado este proceso se procedió a una nueva cuantificación en nanodrop y preparación de las alícuotas para RT-PCR de 200ng/ul siguiendo las instrucciones del fabricante; las muestras fueron corridas por duplicado.

Los genes cuya expresión fue analizada mediante RT- PCR fueron Colágeno tipo I, OPG, RunX2 y osteopontina, y su expresión fue analizada en comparación con la expresión de housekeeping Actina.

TABLA 2: Expresión genética evaluada por RT PCR

GEN	TM	PRIMERS
Colágeno tipo I	62°	R:GCTGGGGAGGGGGTTAGTGT F:TCGTCCGAGCAGACGGGAGTT
OPG	62°	R:ACGCCGTTGTGGGTGCGATT F:AAGACCGTGTGCGCCCCTTG
Actina	63°	R:AGGGGCCGGACTCGTCAT F:GCCCTGGCACCCAGCACAAT
RunX2	63°	R:TGGCTGGTAGTGACCTGCGGA F:AGAGAACCACAACCTGCGGTGCAA
Osteopontina	66	R:CCTTGGTCGGCGTTTGGCTGA F:GCAGACCACAGCATCGTCGGG

5. RESULTADOS

5.1. AISLAMIENTO:

Siguiendo los procedimientos descritos en materiales y métodos fueron obtenidos 30 terceros molares, de los cuales se extrajeron 24 explantes de pulpa de tercer molar y 30 de ligamento, de estos explantes, hubo migración positiva en 9 de origen pulpar y 4 de origen de ligamento periodontal, 5 de estas migraciones (cuatro pulpas y un ligamento) nunca tuvieron confluencia para ser desprendidos y continuar con la etapa de cultivo razón por la cual fueron descartadas (Tabla 3).

Tabla 3 Obtención de la muestra

MUESTRA	GENERO	NOLLA	DIENTE	MIGRO	DESTINO	LOGRO CONFLUENCIA
M1L	F	10	18	NO	DESCARTADA	NO
M1P	F	10	18	NO	DESCARTADA	NO
M2L	F	10	28	NO	DESCARTADA	NO
M2P	F	10	28	NO	DESCARTADA	NO
M3L	F	10	38	NO	DESCARTADA	NO
M3P	F	10	38	NO	DESCARTADA	NO
M4L	F	10	48	NO	DESCARTADA	NO
M4P	F	10	48	NO	DESCARTADA	NO
M5L	F	10	18	NO	DESCARTADA	NO
M5P	F	10	18	NO	DESCARTADA	NO
M6L	F	8	28	NO	DESCARTADA	NO
M7L	F	8	38	NO	DESCARTADA	NO

M7P	F	8	38	SI	CULTIVADA	NO
M8L	F	8	48	NO	DESCARTADA	NO
M9L	F	9	38	NO	DESCARTADA	NO
M9P	F	9	38	SI	CULTIVADA	NO
M10L	F	9	28	NO	DESCARTADA	NO
M10P	F	9	28	NO	DESCARTADA	NO
M11L	F	9	48	NO	DESCARTADA	NO
M11P	F	9	48	NO	DESCARTADA	NO
M12L	M	10	28	NO	DESCARTADA	NO
M12P	M	10	28	NO	DESCARTADA	NO
M13L	M	10	18	NO	DESCARTADA	NO
M13P	M	10	18	NO	DESCARTADA	NO
M14L	M	10	48	SI	CULTIVADA	SI
M14P	M	10	48	NO	DESCARTADA	NO
M15L	F	9	28	NO	DESCARTADA	NO
M16L	F	8	38	NO	DESCARTADA	NO
M17L	F	8	28	NO	DESCARTADA	NO
M17P	F	8	28	SI	CULTIVADA	SI
M18L	F	8	48	SI	CULTIVADA	SI
M18P	F	8	48	SI	CULTIVADA	SI
M19L	F	8	18	NO	DESCARTADA	NO
M19P	F	8	18	SI	CULTIVADA	SI
M20L	F	8	38	NO	DESCARTADA	NO
M20P	F	8	38	NO	DESCARTADA	NO

M21L	F	8	28	NO	DESCARTADA	NO
M21P	F	8	28	SI	CULTIVADA	SI
M22L	F	8	48	NO	DESCARTADA	NO
M22P	F	8	48	SI	CULTIVADA	SI
M23L	F	8	18	NO	DESCARTADA	NO
M24P	M	8	38	NO	DESCARTADA	NO
M24L	M	8	38	NO	DESCARTADA	NO
M25L	M	8	28	SI	CULTIVADA	NO
M25P	M	8	28	NO	DESCARTADA	NO
M26L	M	8	48	SI	CULTIVADA	SI
M27L	M	10	38	NO	DESCARTADA	NO
M27P	M	10	38	NO	DESCARTADA	NO
M28L	M	10	28	NO	DESCARTADA	NO
M28P	M	10	28	NO	DESCARTADA	NO
M29L	M	10	48	NO	DESCARTADA	NO
M29P	M	10	48	SI	CULTIVADA	NO
M30L	M	10	18	NO	DESCARTADA	NO
M30P	M	10	18	SI	CULTIVADA	NO

Figura 2 Muestras con migración positiva: Para las muestras de pulpa el porcentaje de migración positiva fue 37,5%, para las muestras de ligamento 13,3%

MUESTRAS CON MIGRACIÓN POSITIVA

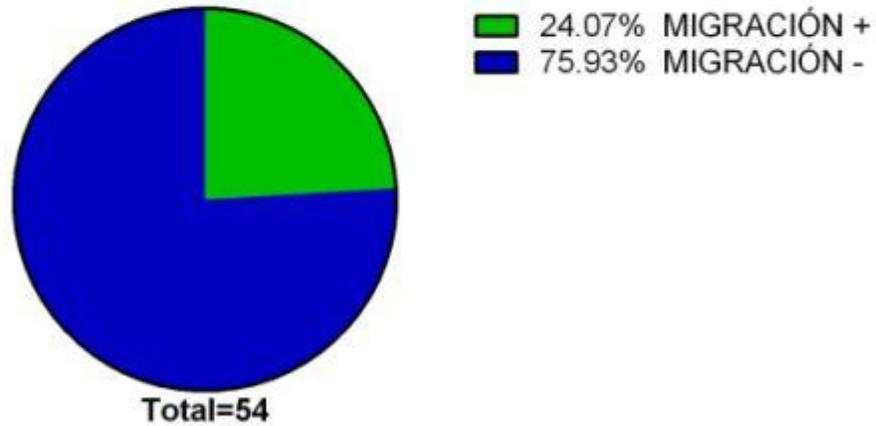


Figura 3 Migración positiva según grado de formación radicular

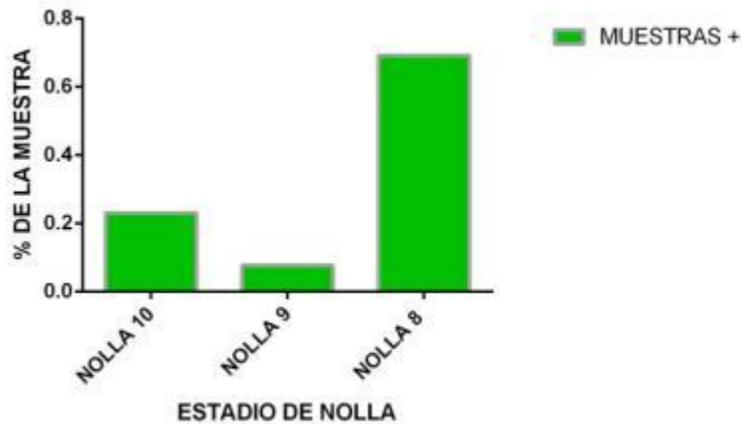


Figura 4 Migración negativa según grado de formación radicular

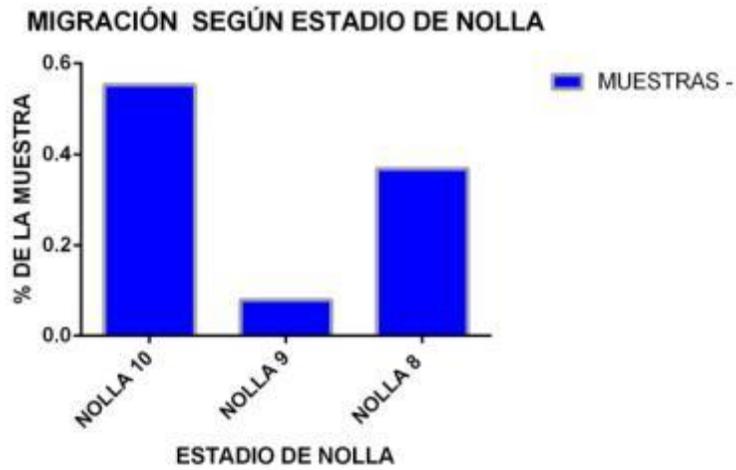
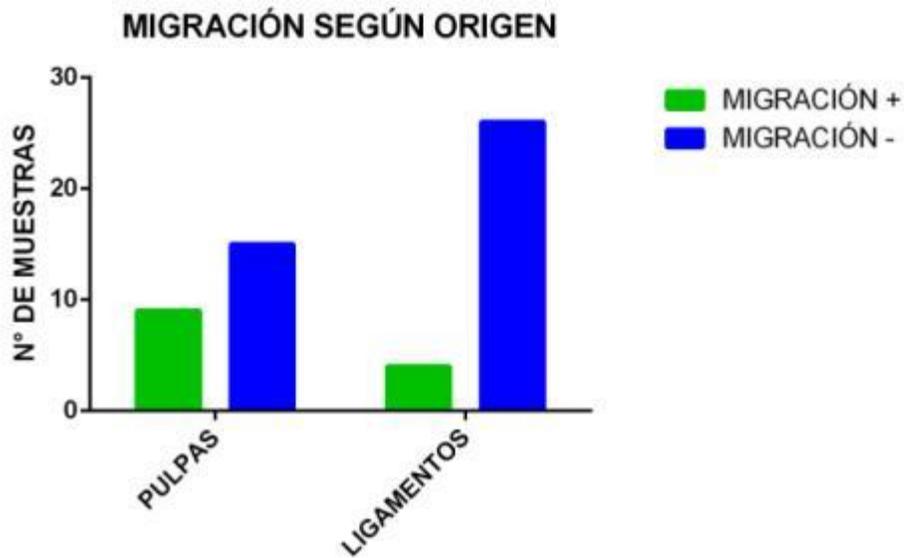


Figura 5: Migración según origen



5.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La caracterización de las células obtenidas, fue realizada mediante citometría de flujo para los marcadores CD 90, CD 105 STRO-1 CD 34 CD 45, (figura 5). Esta citometria fue realizada tanto para las muestras con migración positiva como para sus correspondientes alícuotas separadas por el método de Myltenyi. Posteriormente, los datos obtenidos fueron sometidos al test de normalidad D'Agostino&Pearson, encontrándose que la distribución de la variable CD105 no seguía los parámetros de normalidad, los datos fueron depurados mediante la eliminación de un outlier de este grupo después de lo cual se obtuvo una distribución normal de los mismos. El análisis estadístico para comparar la expresión de los marcadores evaluados en el grupo de células separadas con el método de Miltenyi y el grupo sin esta separación, fue una prueba ANOVA de dos vías con un test de múltiple comparación de Sidak. Los resultados obtenidos mostraron que para el grupo de separación con Miltenyi se presentaba una disminución estadísticamente significativa del número de células positivas para CD 90 ($p < 0,0007$) y CD105 ($p < 0,04$); los demás datos no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

(Ver Anexo 1 Citometrías de flujo)

Figura 6: Citometría de Flujo: Histograma de citometría realizada a muestra de células madre obtenida de ligamento no separada por el método de miltenyi

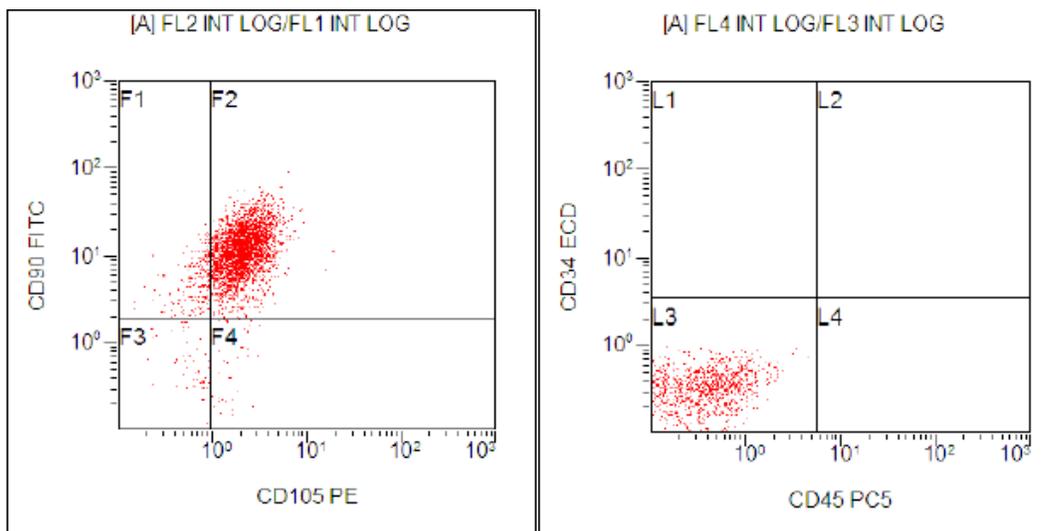
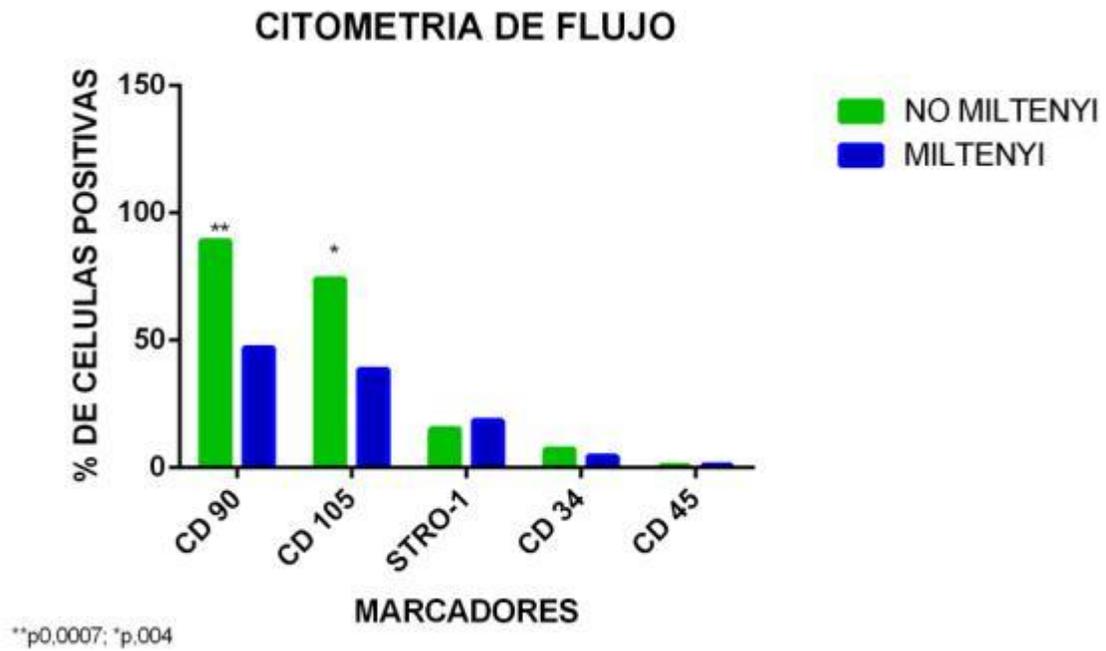


Figura 7: Comparación de citometrías de flujo realizadas sobre todas las muestras con y sin separación por el método de Miltenyi.



Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió que para la etapa de osteodiferenciación solo se utilizaría el grupo de células no separado por el método de Miltenyi.

5.3. OSTEODIFERENCIACIÓN

El proceso de osteodiferenciación fue llevado a cabo a partir de las células aisladas no separadas por el método de miltenyi siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos; durante el protocolo de diferenciación, cada una de las 5 muestras originadas de pulpa y las 3 originadas de ligamento fueron diferenciadas con cada una de las 5 condiciones de cultivo expuestas en materiales y métodos.

En los grupos de muestras tanto de pulpas como ligamentos inducidos con el medio de cultivo StemPro ostegenesis (invitrogen) -Medio 3-, todas las células murieron por lo que se eliminó este medio de diferenciación de los análisis posteriores.

5.3.1 RTPCR

Un pozo de cada uno de los subgrupos cultivados, fue desprendido al día 14 y 21 de cultivo para análisis de RTPCR siguiendo los protocolos descritos en materiales y métodos, los análisis de RTPCR se realizaron por duplicado.

Adicional a los pellets obtenidos para los días 14 y 21 de los medios 1(Control Negativo),2, 4 y 5 se realizaron RT PCR para células de osteoblastos de la línea Clonetics™ Normal Human Osteoblast Cell System de la casa comercial Lonza como control positivo.

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico ANOVA Doble vía complementado con un test de comparaciones múltiples de Tukey con el fin de evaluar si había diferencias estadísticamente significativas entre las expresiones genéticas de los diferentes grupos.

Figura 8. Comparación de expresión de genes en pulpas y ligamentos diferenciados

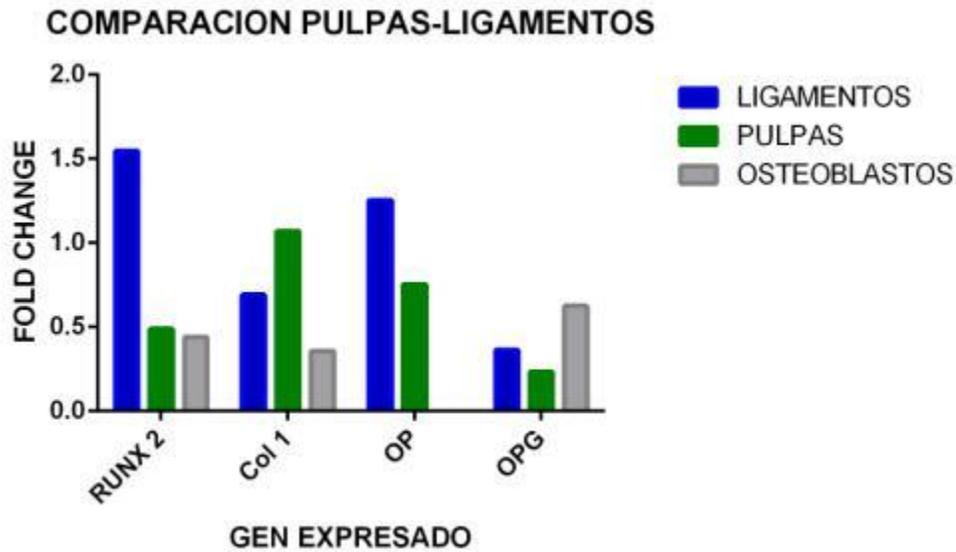


Figura 9 Comparación de expresión de genes en los diferentes medios de diferenciación

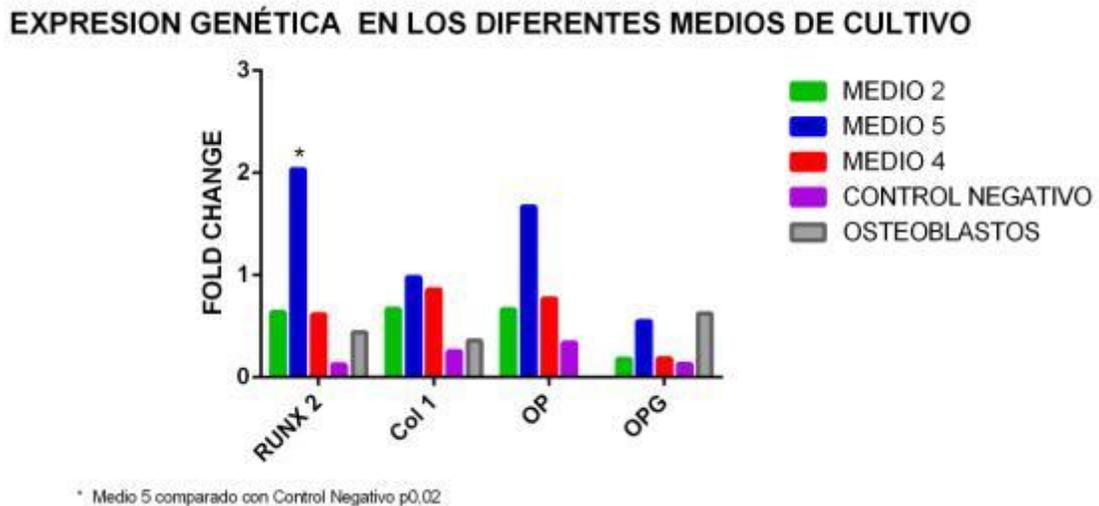


Figura 10 Comparación de expresión de genes día 14 y 21

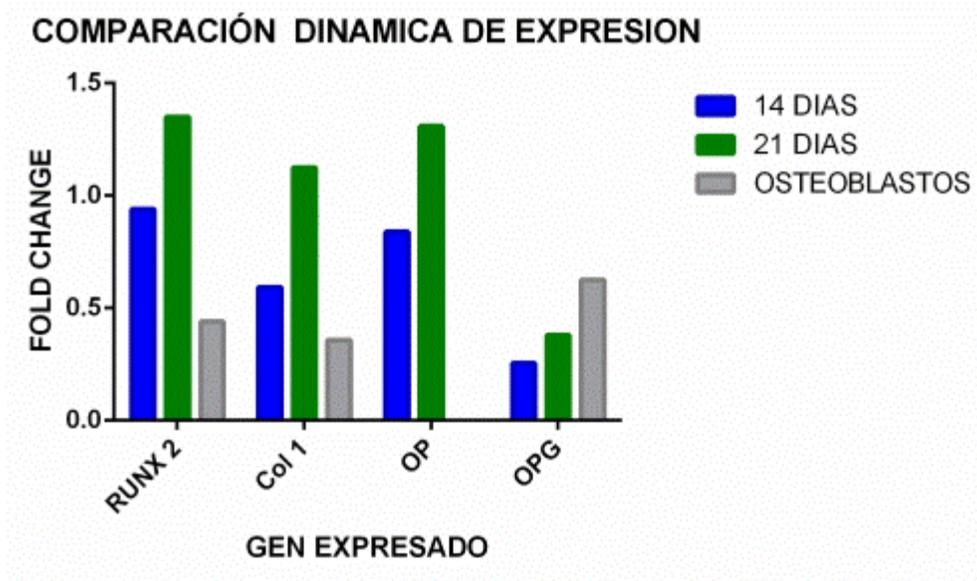


Figura 11 Comparación de expresión génica en muestras aisladas de ligamento según los medios de diferenciación

DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN EN LIGAMENTOS CON DIFERENTES MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN

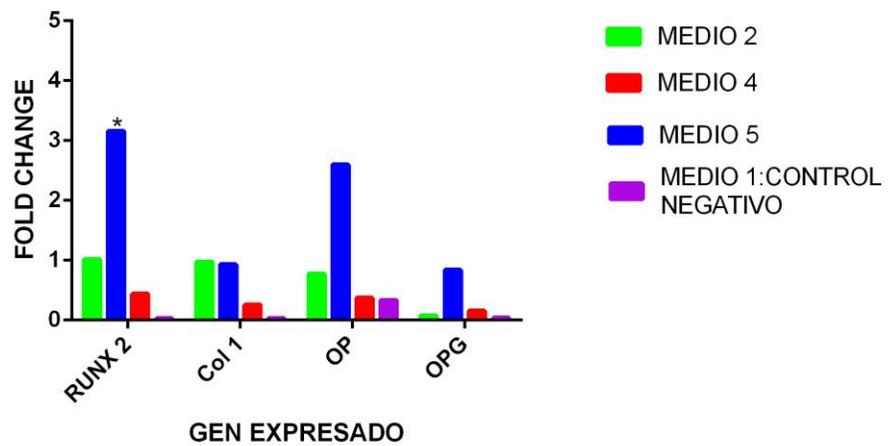


Figura 12 Comparación de expresión de genes en muestras aisladas de pulpa según los grupos de diferenciación

EXPRESION DE MARCADORES EN MUESTRAS OBTENIDAS DE PULPA

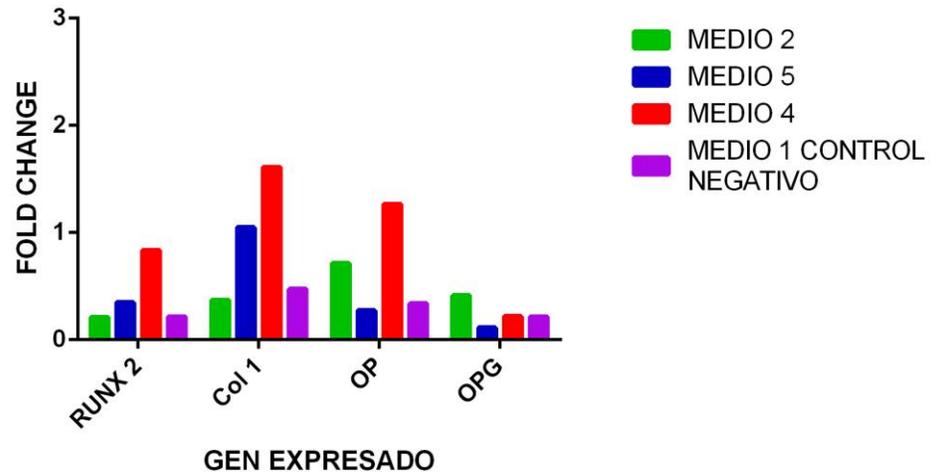
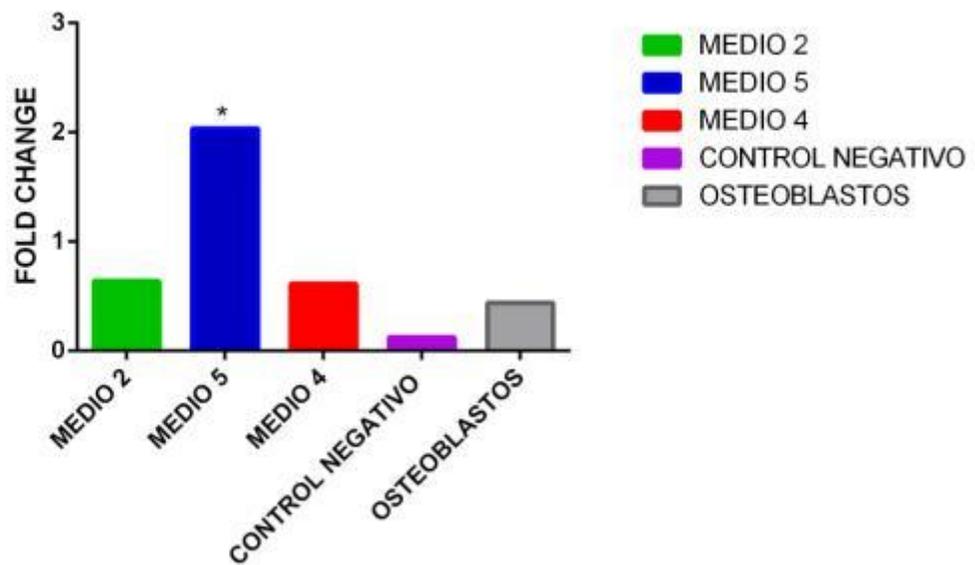


Figura 13: Comparación de la expresión de Runx2 en los diferentes medios

EXPRESION RUNX2 EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO



* Medio 5 comparado con control negativo p0,021

Figura 14: Comparación de la expresión de Colágeno I en los diferentes medios

EXPRESION Col I EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

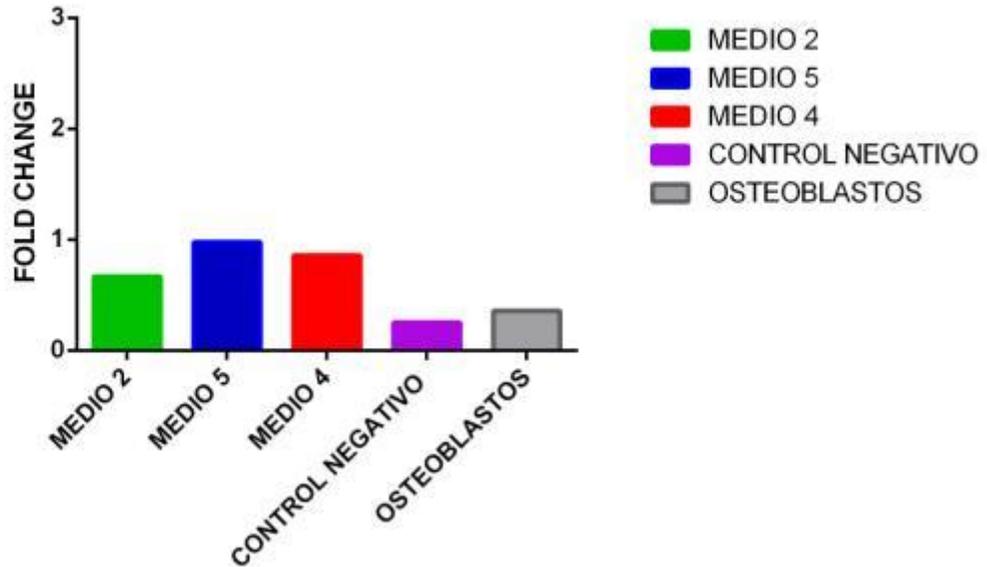


Figura 15: Comparación de la expresión de Osteopontina en los diferentes medios

EXPRESION OP EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

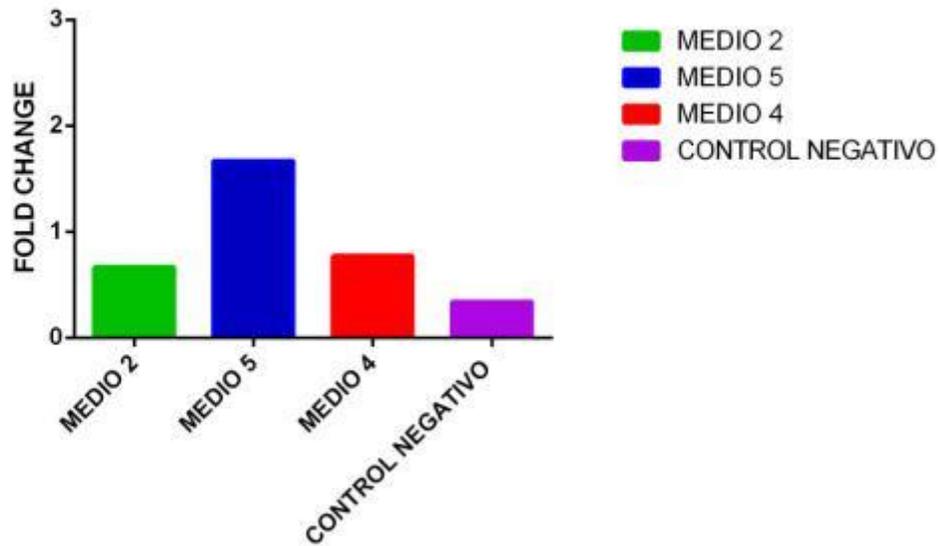


Figura 16: Comparación de la expresión de Osteoprotegerina en los diferentes medios

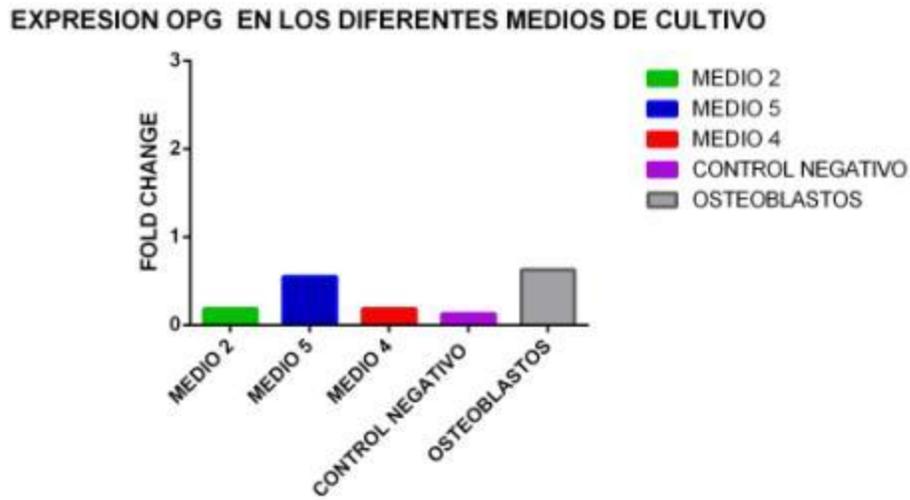
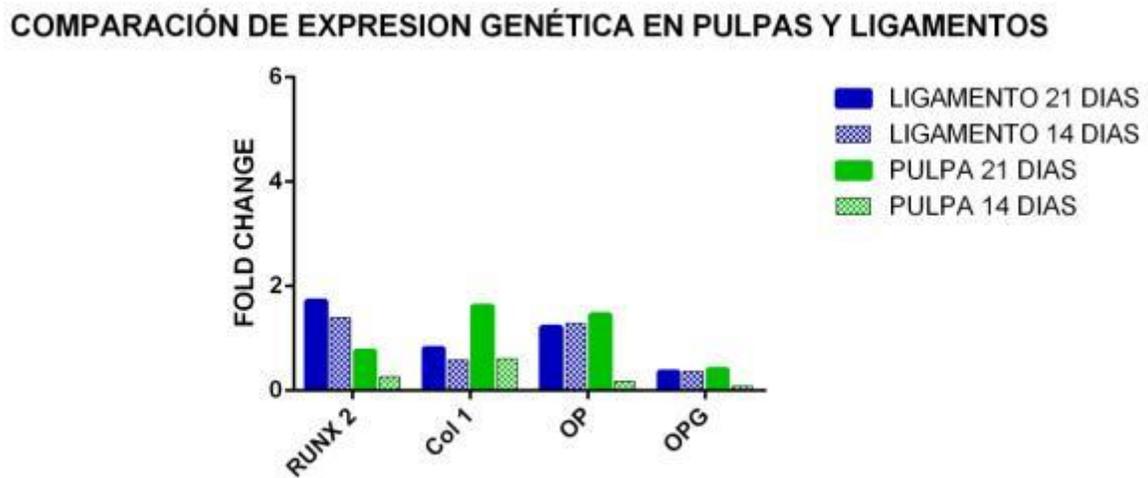


Figura 17: Comparación de la expresión genética de pulpas vs ligamentos



5.3.2. TINCIONES

Un pozo de 21 días de cultivo en cada uno de los subgrupos fue sometido a tinción con rojo alizarin para evaluar la expresión de fosfatasa alcalina, una vez realizado este procedimiento se encontró un resultado altamente positivo para el pozo cultivado con el medio numero 5 por lo cual se decidió hacer una tinción de confirmación para Fosfatasa Alcalina Leucocitaria (sigma Aldrich) para este subgrupo. (Ver anexo 2 Coloraciones)

Resultado de las tinciones con rojo alizarin día 21:

Figura 18 Tinción con Rojo Alizarin medio 5 10X

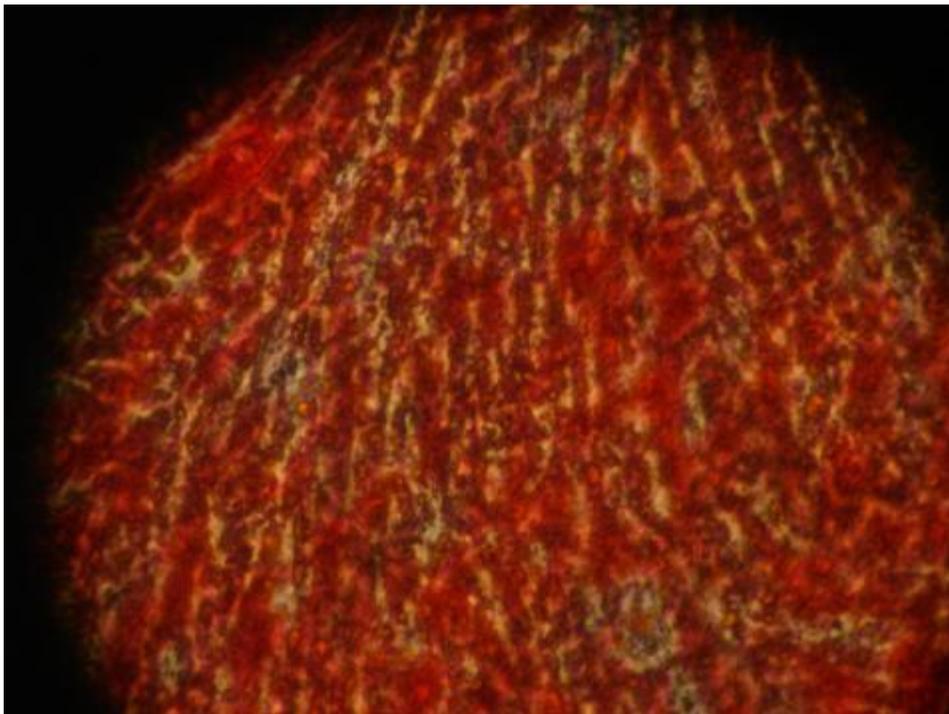


Figura 19 Tinción con Rojo Alizarin medio 4 10X

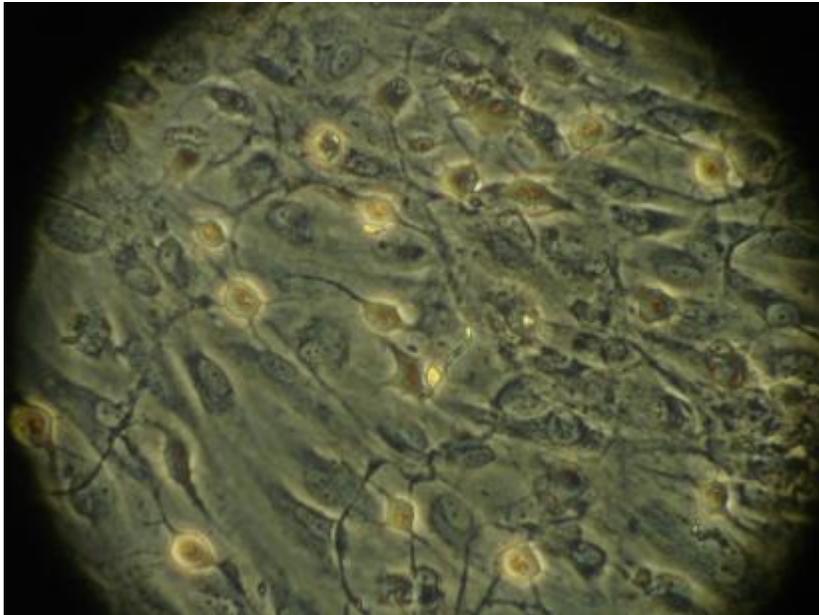


Figura 20 Tinción con Rojo Alizarin medio 2 10X

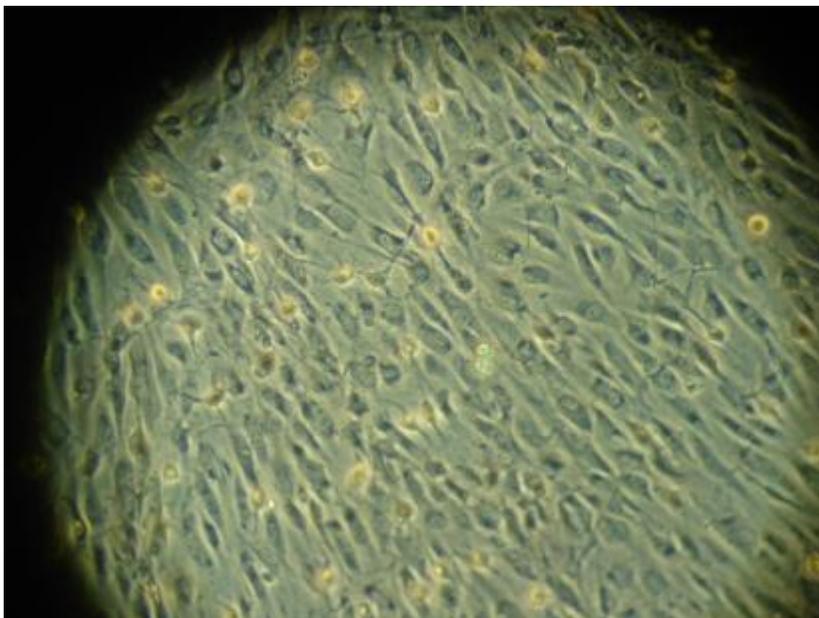
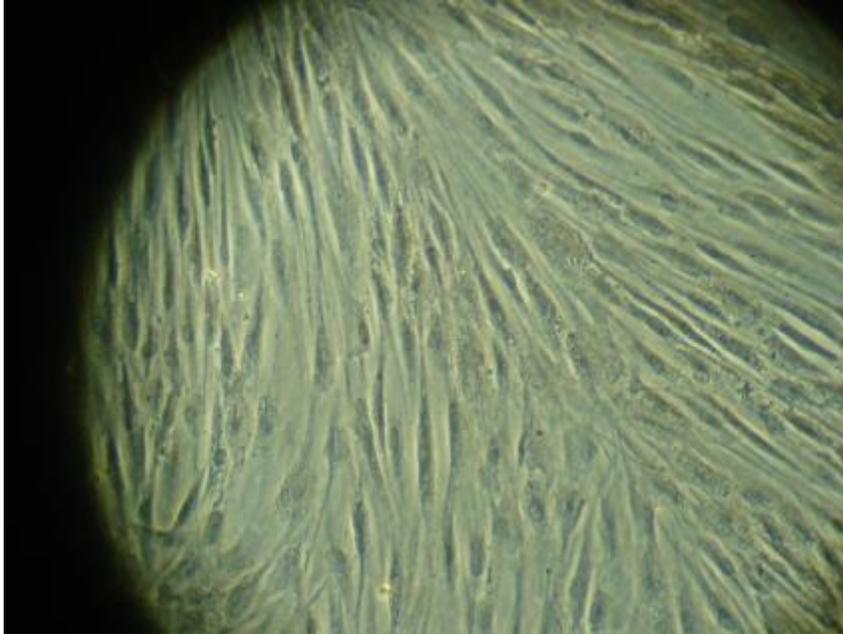


Figura 21 Tinción con Rojo Alizarin Medio 1: Control Negativo 10X



Resultado de tinción específica para fosfatasa alcalina leucocitaria (sigma Aldrich)

Figura 22 Tinción específica para fosfatasa alcalina leucocitaria Medio 5 10X

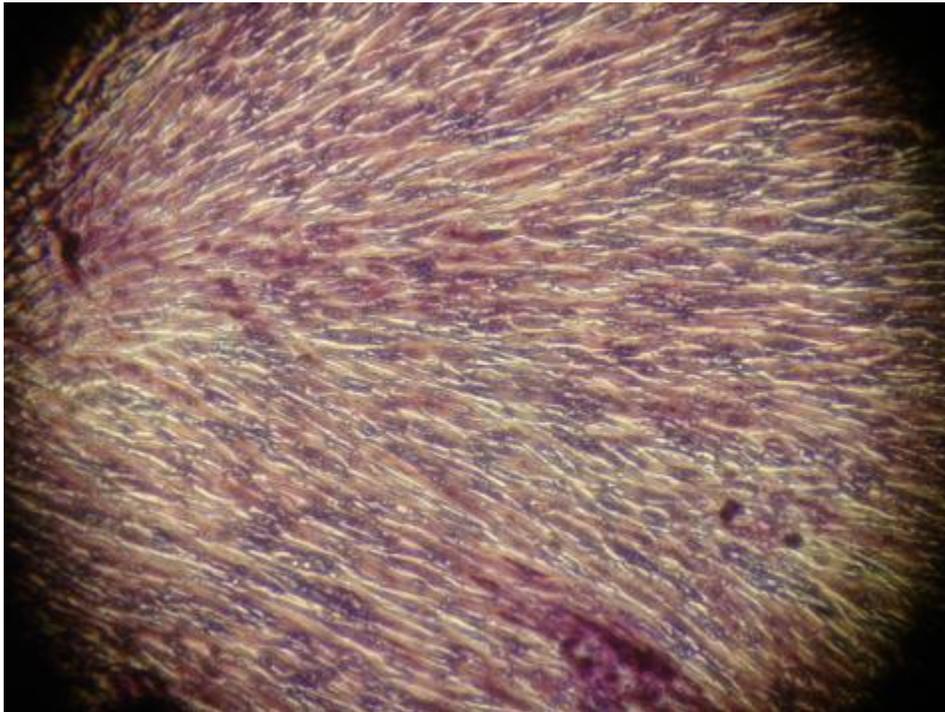


Figura 23 Tinción específica para ALP leucocitaria Medio 1: Control Negativo 10X



6. DISCUSIÓN

El aislamiento de células madre de origen dental como alternativa viable en bioingeniería de tejidos ha sido ampliamente descrito en la literatura^{5,6,9,10}, sin embargo, los datos referentes a la tasa de éxito en la recuperación son escasos^{59, 60}.

En el presente estudio fueron tomadas en condiciones estandar 30 muestras de ligamento periodontal y 24 de pulpa que fueron procesadas para aislamiento de células madre mediante el método de explantes, obteniendo una tasa de migración positiva total de 24,07%; este hallazgo evidencia que el método de aislamiento de células madre por explante no es 100% reproducible lo que está de acuerdo con lo reportado por Huang y cols⁵⁹ (2006) quienes encontraron que las células madre obtenidas de pulpa mediante el método de explantes presentaban un porcentaje de expresión de BrdU como marcador de la capacidad de proliferación del 40%, mientras que en las células extraídas por el método de digestión era de 60%. Sin embargo en este mismo estudio se concluye que los dos métodos de extracción de células madre pulpares dan como resultado diferentes poblaciones celulares durante la expansión *in vitro* y que el método de explantes minimiza daños sobre las células. En contraposición Zhang y cols (2012)⁶¹ reportaron una migración del 100% de 90 muestras extraídas de ligamento periodontal por el método de explantes, sin embargo, el medio de cultivo utilizado por Zhang fue suplementado desde el inicio con ácido ascórbico a una concentración de 100um/l lo que si bien favorece la recuperación de las células por su efecto en el ciclo celular, puede también influir tempranamente en su diferenciación hacia el linaje osteogénico. En este estudio no se llevó a cabo una comparación entre los métodos de explantes y digestión enzimática para obtención de células madre, un estudio futuro en este sentido sería de gran utilidad para el establecimiento de protocolos reproducibles para la obtención de células madre de origen dental.

Adicionalmente, en el presente experimento, se observó una migración positiva de 37,5% para células de pulpa y 13.3% para células de ligamento, lo que sugiere que el sitio de origen de extracción (pulpa vs ligamento periodontal) es una variable que afecta el porcentaje de migración de células madre siendo mayor la recuperación en células de pulpa. Estas diferencias podrían ser explicadas por el tamaño de los explantes obtenidos para

pulpa y ligamento periodontal ya que el volumen de las pulpas es superior al obtenido en muestras de ligamento, tal como lo reportan Iwata y cols (2010)⁶² al afirmar que las muestras obtenidas de ligamento periodontal son tan pequeñas que presentan una densidad celular inferior a 50 células/cm². Sin embargo es necesario establecer en estudios posteriores, si el número de células madre que se encuentran en condiciones de salud en el tejido pulpar es proporcionalmente mayor al número de células madre del ligamento para definir si son estas características de celularidad iniciales las que causan las diferencias de migración.

Otro cuestionamiento que ha surgido respecto a la obtención de células madre de origen dental, está relacionado con el efecto que el grado de formación radicular tiene en la migración positiva de dichas células. En el presente estudio, el grado de formación radicular fue evaluado según el método de Nolla⁶³, encontrándose que de las 54 muestras obtenidas, 24 presentaban un grado de formación radicular de 10, 7 de nolla 9 y 23 muestras tenían un estado de Nolla 8; en el grupo de muestras clasificado como nolla 10 se presentó una migración positiva del 12,5% de las muestras, mientras que del grupo de nolla 9 hubo una migración positiva de 14,2% y en el grupo catalogado como nolla 8 se observó una migración positiva de 39,1%. Esto puede ser explicado porque en la zona apical de los dientes con ápice inmaduro se pueden obtener células de cuatro diferentes fuentes anatómicas: el saco dental que rodea la vaina radicular epitelial, responsable del desarrollo del periodonto, la pulpa dental radicular, la papila apical mesenquimal y la papila dental mesenquimal encerrada por la vaina radicular epitelial que es ampliamente reconocida como parte de la pulpa radicular y que constituye una zona apical rica en células⁶⁴. Estas dos últimas zonas podrían presentarse como una fuente adicional de células madre para el grupo de dientes con ápice inmaduro. Teniendo en cuenta que en el presente estudio no se tomaron muestras con formación radicular inferior a Nolla 8, se sugiere que posteriores estudios pueden esclarecer la capacidad de migración de células madre originadas de tejidos pulpar y periodontal en dientes más inmaduros.

Las poblaciones celulares obtenidas en este estudio fueron caracterizadas mediante citometría de flujo para los marcadores CD 90 CD105, STRO-1, CD34 Y CD45. Los resultados fueron positivos para CD90 (90+/-4,9), CD105 (74,1+/-23), STRO (15,2+/-9,8)

y negativos para CD34 (7,1+/-6,2), CD 45 (0,7+/-0,1). Estos resultados permiten afirmar que las células obtenidas son células madre, ya que cumplen con los criterios de identificación sugeridos por la sociedad internacional para terapia celular⁶⁵. Adicionalmente, los datos del presente estudio son coincidentes con los obtenidos por Wang¹⁴ quien reporta valores positivos para los marcadores CD105 de 78,6% y STRO 7,3% en células madre obtenidas de tejido pulpar, Huang y cols¹⁰, quienes reportan valores de STRO 5-10%, resultados positivos para CD90, CD105 y negativos para CD 34 y CD45 y Patil y colaboradores en 2004 con reportes de CD90 99,5% CD 34 4.2% y CD 45 5.2%⁶⁶.

Según lo reportado por Kramer y cols (2004)⁶⁷, el aislamiento de células madre de ligamento periodontal usando los marcadores STRO-1 y CD146 da como resultado células con propiedades clonogénicas y potencial de diferenciación multilínea, lo que posiblemente representa una población de células madre enriquecida que también contiene células progenitoras. En un intento por mejorar la selección de las células se utilizó sobre una alícuota de cada muestra el método de separación de Miltenyi para células madre con microperlas (CD146), las células resultantes de separación fueron sometidos nuevamente a citometría de flujo, observándose una disminución estadísticamente significativa en la positividad de los marcadores CD90 (p=0,0007) y CD105 (p=0,04); estos resultados sugieren que para las poblaciones celulares obtenidas, no todas las células positivas para CD146 son positivas para los marcadores CD90 y CD105. Si bien estos resultados están de acuerdo con los de Wang(2012)¹⁴ que reporta valores de CD 146+ para células madre extraídas de pulpa de 17% se contraponen con los resultados de Bakopolou y cols (2011)⁶⁸ que presentan valores de CD 146+ en el 83,33% de sus células madre extraídas de pulpa con el método de digestión enzimática. Estas diferencias pueden estar relacionadas con los reportes de Tormin (2011)⁶⁹ que afirman que las células mesenquimales con mayor expresión de CD146 están ubicadas más cerca de las zonas vasculares y no en áreas de revestimiento óseo.

Para este estudio, y teniendo en cuenta que los marcadores CD 90 y CD 105 son considerados como requisitos mínimos para clasificación de una célula como célula madre^{65, 25}, se decidió que el proceso de selección era desfavorable y este grupo de células separadas fue descartado para la etapa de osteodiferenciación del estudio.

Si bien las células madre provenientes de pulpa y ligamento periodontal tienen un origen embriológico similar, se desarrollan en nichos distintos, por lo que establecer diferencias en su respuesta a los estímulos de oseodiferenciación constituye un punto importante en la bioingeniería de tejidos. A este respecto, los resultados del presente estudio muestran que las células madre extraídas de ligamento periodontal y cultivadas con medios suplementados para osteodiferenciación durante 21 días, presentan una mayor expresión de Runx2 comparadas con células madre extraídas de tejido pulpar, que presentan una mayor expresión de Colágeno tipo I, estos hallazgos sugieren que si bien las dos poblaciones celulares se diferencian hacia el linaje osteogénico, tienen respuestas diferentes a los estímulos osteodiferenciadores, lo que previamente había sido descrito por Seo en el 2004⁷⁰ quien reporta menores depósitos cálcicos para células de ligamento comparadas con células pulpa y Liu en 2009⁷¹ quien muestra mayor expresión de fosfatasa alcalina en células extraídas de ligamento periodontal comparadas con células pulpares.

Teniendo en cuenta las variaciones de expresión sucedidas en el tiempo, en este estudio se puede observar que las células obtenidas de ligamento periodontal diferenciadas hacia el linaje osteogénico, presentan valores mayores de expresión para Runx2 mostrando un leve incremento desde el día 14 hasta el día 21, contrastado con las células de pulpa que presentan niveles inferiores de expresión de Runx2 tanto en el día 14 como en el día 21; si se considera Runx2 como un marcador de osteodiferenciación temprana debido a su característica de factor de transcripción regulador de la expresión de los genes que codifican para las principales proteínas constitutivas de hueso⁷², se podría sugerir que la etapa de osteodiferenciación en la que se encuentran las células originarias de tejido periodontal es inmadura en comparación con las células obtenidas de tejido pulpar, ya que estas últimas presentan un marcado incremento de la expresión de genes característicos de osteoblastos maduros como osteopontina y colágeno tipo I entre el día 14 y el día 21. Este hallazgo está de acuerdo con lo reportado por Seo y cols⁷⁰ (2004) quienes encuentran una menor cantidad de depósitos cálcicos en células madre extraídas de ligamento inducidas al linaje osteogénico durante 4 semanas comparado con células originadas de tejido pulpar inducidas bajo las mismas condiciones.

Estos hallazgos podrían sugerir que las células madre pulpares diferenciadas hacia el linaje osteoblastico se transforman en un menor tiempo en osteoblastos maduros mientras que podría requerirse un tiempo de diferenciación mayor a 21 días para observar marcadores de osteodiferenciación tardía en las células madre extraídas de ligamento. A este respecto, estudios experimentales en perros indican que las fases 3 y 4 del movimiento dental que se conocen como fases de aceleración y lineal, comienzan alrededor del día 40 posterior a la activación y se caracterizan marcadamente por evidencia de células osteoblásticas positivas para fosfatasa alcalina⁷³, lo que podría corroborar la diferenciación tardía de células del ligamento periodontal hacia el linaje osteoblastico. Este hallazgo que puede ser relacionado con los reportes de Florez⁷⁴ y cols (2013) quienes encuentran un incremento en la relación de los mediadores del metabolismo óseo RANKLs/OPG entre la quinta y octava semana posterior a la activación correspondiente a la fase de aceleración y lineal del movimiento dental. Teniendo en cuenta que en los tratamientos ortodónticos se realizan reactivaciones de la aparatología cada 30 días en promedio, estos resultados podrían sugerir que en este tiempo las células madre del ligamento periodontal pueden estar en un estado de osteoblasto inmaduro por lo que podría ser necesario aumentar el periodo de tiempo entre activaciones. Esta hipótesis debe ser confirmada en estudios posteriores, sometiendo las células madre extraídas de ligamento periodontal a suplementos osteodiferenciadores durante tiempos superiores a 21 días, de esta forma se permitirá confirmar su respuesta tardía a la osteodiferenciación.

Por otro lado, los dos grupos celulares también responden en forma diferente a los diferentes medios de cultivo, en los resultados del presente estudio, hubo una expresión significativamente mayor de Runx2 para las células de ligamento periodontal cuando estas fueron cultivadas con el medio número 5, comparado con otros medios (medio 4 $p=0,04$) y con el medio sin suplementos de osteodiferenciación ($p=0,02$), mientras que las células obtenidas de pulpa presentaron una mejor respuesta al medio 4 particularmente para la expresión de Colageno tipo I. estos hallazgos están de acuerdo con lo reportado por Seo⁷⁰ y cols, quienes al someter células madre extraídas de pulpa y de ligamento periodontal a las mismas condiciones de osteodiferenciación observaron una menor expresión de marcadores de osteodiferenciación en las células de ligamento.

Respuestas diferentes de células madre ante estímulos similares también han sido reportadas por Tsumanuma y cols (2011)⁷⁵ quienes encontraron que células madre derivadas de ligamento periodontal mostraban mayor capacidad regenerativa para tejido periodontal comparadas con células madre mesenquimales extraídas de médula ósea. Estas diferencias pueden ser explicadas mediante la hipótesis de Brawley y cols (2004)⁷⁶ quienes proponen que el nicho es el factor dominante en el control del destino de las células madre y provee una gran cantidad de pequeñas señales que le confieren a estas células su capacidad de indiferenciación o de diferenciación parcial, principalmente mediante variaciones en la orientación de los husos mitóticos durante la división⁷⁷. Teniendo en cuenta que el nicho de las células madre originadas de pulpa difiere del de las células madre de ligamento periodontal, se podría inferir que esta variación en las señales de las células de soporte pueden ser responsables de su diferente respuesta ante un mismo estímulo.

Respecto a los diferentes medios de cultivo, los resultados del presente estudio muestran que ninguna de las células madre aisladas de pulpa y ligamento periodontal cultivadas con el medio de diferenciación número 3 Stempro osteogénesis invitrogen sobrevivieron. Por otro lado se encontró que los mejores resultados de osteodiferenciación (expresión de proteínas características de osteoblastos y tinción con rojo alizarin y fosfatasa alcalina) fueron obtenidos con el medio número 5, caracterizado por una concentración de ácido ascórbico de 50uM, como la reportada por Patil y cols⁶⁶ quienes presentan tinciones positivas para rojo alizarin con células madre de origen pulpar y reportan una expresión moderada de Runx2. Estos resultados son similares a los del presente estudio para células de origen pulpar, sin embargo, para las células de ligamento periodontal en nuestro estudio se observa una marcada expresión de Runx2 lo que confirma las diferencias de respuesta según origen. Por otro lado el medio 4 que tenía una composición similar al medio 5 con una concentración superior de ácido ascórbico (200uM), se correlacionó con una mayor expresión de Colágeno tipo I en células de pulpa; hallazgo que puede ser explicado por la importante función del ácido ascórbico como cofactor de la prolyl-4-Hidroxilasa en la hidroxilación de residuos de prolina necesaria para la adecuada síntesis de colágeno⁷⁸. Este hallazgo permite concluir que el suplemento de ácido ascórbico es de gran importancia para la inducción de síntesis de colágeno en células madre extraídas de pulpa dental.

Pese a que se obtuvo una muestra importante de explantes de pulpa y ligamento periodontal la migración final fue limitada, por esto es importante realizar estudios futuros que permitan evaluar en una muestra mayor si existe diferencia entre la respuesta de las células madre extraídas de pulpa y ligamento dental con medios enzimáticos y de explantes ante los estímulos de oseodiferenciación. Estos avances permitirán acercarse a protocolos más reproducibles para la obtención de células madre de tejidos dentales, sistematizando este proceso para convertirlo en un recurso válido de obtención de células madre mesenquimales para uso clínico.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio nos permiten concluir que:

- Las células obtenidas por el método de explantes en este estudio tanto de pulpa como de ligamento se caracterizaron como células madre
- La tasa de migración positiva de células madre total en esta muestra es de 24,07%
- El sitio de origen de extracción (pulpa vs ligamento periodontal) es una variable que afecta el porcentaje de migración de células madre siendo mayor en este estudio la migración de células de origen pulpar.
- El grado de formación radicular es una variable que afecta el porcentaje de migración de células madre de origen dental, siendo inversamente proporcional a la migración positiva de células madre de origen dental.
- Al realizarse el proceso de separación con el sistema de Miltenyi Biotec Cd 146 en células madre de origen dental se disminuye el número de células positivas para los marcadores CD90 y CD 105.
- Para la muestra que fue tomada en este estudio se observó una mayor expresión colágeno tipo I para células de pulpa y de Runx2 para células de ligamento periodontal

- Las células Madre de ligamento periodontal de esta muestra presentaron unas mejores características de osteodiferenciación cuando fueron cultivadas en el medio 5 (concentración de ácido Ascórbico de 50uM)
- Las Células madre extraídas de pulpa presentaron unas mejores características de osteodiferenciación cuando fueron cultivadas en el medio 4 (concentración de ácido Ascórbico 200uM) particularmente para la expresión de Colágeno tipo I
- El medio que mejores resultados presentó en este estudio fue el medio número 5

8. BIBLIOGRAFÍA

¹ Cambron J, King T, The Bone and Joint Decade: 2000 to 2010, *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics* V 29 (2), February (2006), 91–92

² Park B, Kang E, Byun j, Son, M, Kim H, Hah Y, Kumar M, Ock S, Rho G; In vitro an in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived form skin, bone marrow and dental follicle tissues; *Differentiation* 83 (2012), 249-259

³ Vater C, Kasten P, Stiehler M, Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells, *Acta Biomateriala* 7 (2011) 463-477

⁴ Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Yoshimi R, Ueda M, Nagasaka T, A Feasibility of Useful Cell-Based Therapy by Bone Regeneration with Deciduous Tooth Stem Cells, Dental Pulp Stem Cells, or Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Study Using Tissue Engineering Technology, *Tissue Engineering: Part A* 16 (2010) 6, 1891-1900

⁵ Felthaus, Viale-Bouroncle S, Driemel O, Reichert T, Schmalz G, Morsczeck C; Transcription factors TP53 and SP1 and the osteogenic differentiation of dental stem cells; *Differentiation* 83 (2012), 10-16

⁶ Zhou Q, Zhao Z, ChengJ, Zhang B, Xu J Huang F, Zhao R, Chen Y; Ibandronato promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating the expression of microRNAs; *Biochemical and biophysical Research Communications* 404 (2011), 127-132

⁷ Kilian K, Bugarija B, Lahn B, Mrksich M; Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells; www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0903269107

⁸ Malgieri, A, Kantzari, E, Patrizi MP, Gambardella S, Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cell: state of the art; *int J clin Exp Med* 3(4) (2010), 248-269

⁹ Atari M, Caballe-serrano J, Recio C, Giner-Delgado C, Martinez Sarra E, Garcia Fernandez D, Barajas M, Hernandez-Alfaro F, Rerres Padro E, Giner tarrida L; The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D; *Bone* 50(2012) 930-941

¹⁰ Huang G, 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* 88 (2009) 9, 792-806

¹¹ Kawanabe N, Murata S, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Yanagita E, Ono E, Hurosaka H, Kamioka H; Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells; *Experimental cell Research* 318 (2012), 453 – 463

¹² Chen F M, Sun H H,Lu H, Yu Q, Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration, *Biomaterials* 33 (2012), 6320-6344

¹³ Roeder I , Loeffler M , Glauche I, Towards a quantitative understanding of stem cell–niche interaction: Experiments, models, and technologies, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 46 (2011), 308–317

¹⁴ Wang X, Sha X, Li G, Yang F , Ji K, Wen L, Liu S, Chen L, Ding Y, Xuan K; Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells; *Archives of Oral Biology* (2012), doi:10.1016/j.archoralbio.2012.02.014

¹⁵ Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 274 (1999), 22041–22047

-
- ¹⁶ Krebsbach, P, Gehron P. Dental and skeletal Stem Cells: potential Cellular tjerapeutics for craniofacial regeneration, *J of Dental education* V 66 (6) (2002), 766-771
- ¹⁷ Verfaillie C, Adult stem cells: assessing the case for pluripotency, *Trends in Cell Biology* V12 (11) November (2002), 502-508
- ¹⁸ Herberts C, Kwa M, Hermesen H, Risk factors in the development of stem cell Therapy, *Journal of Translational Medicine* (2011), 9:29
- ¹⁹ Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM, Stem cells in the periodontal ligament, *oral diseases* 12 (2006), 358-363
- ²⁰ Prowse A, Chong F, Gray P, Munro T, Stem cell integrins: Implications for ex-vivo culture and cellular therapies, *Stem Cell Research* 6 (2011), 1–12
- ²¹ Hackett C, Fortier L, Embryonic Stem Cells and iPS Cells: Sources and Characteristics, *Vet Clin Equine* 27 (2011), 233–242
- ²² Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K, Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources, *Journal of Prosthodontic Research*, Received 1 June 2012; accepted 14 June (2012) Article in press
- ²³ Pourrajab F, Forouzannia S, Tabatabaee S Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine *Int J Cardiol* (2011), doi:10.1016/j.ijcard.2011.11.017
- ²⁴ Stewart M, Stewart, A, Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action, *Vet Clin Equine* 27 (2011), 243–261

-
- ²⁵ Dominici M, Blanc K Lec, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F C, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* V 8 (4), (2006), 315-317
- ²⁶ Van Le B, Franke D, Svergun D, Han T, Hwang H Y, Kima K, Structural and functional characterization of soluble endoglin receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 (2009), 386–391
- ²⁷ Mancini M, Verdi J, Conley B, Nicola T, Spicer D, Oxburgh L, Vary C, Endoglin is required for myogenic differentiation potential of neural crest stem cells, *Developmental Biology* 308 (2007), 520–533
- ²⁸ Hansen K, Resta R, Webb C, Thompson L, Isolation and characterization of the promoter of the human 5'-nucleotidase (CD73)-encoding gene, *Gene*, 167 (1995), 307-312
- ²⁹ Rege T, Hagood J, Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses, *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (2006), 991–999
- ³⁰ Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 2002;170(2–3), 73–82.
- ³¹ Wang H, Zhang P, Liu L, Zou L Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 85 (2013), 1–8
- ³² Burn TC, Satterthwaite AB, Tenen DG. The human CD34 hematopoietic stem cell antigen promoter and a 3' enhancer direct hematopoietic expression in tissue culture. *Blood* 80(12), (1992), 3051–3059.

³³ <https://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001700/IM0001775.a.shx>

³⁴ Fiorentini E, Granchi D, Leonardi E, Baldini N, Ciapetti G, Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells, *Int J Artif Organs* 34 (10), (2011), 998-1011

³⁵ Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* 42 (2007), 231-239

³⁶ Radio N, Witt-Enderby P. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade *J. Pineal Res.* 40 (2006), 332–342

³⁷ Li JH, Liu DY, Zhang FM, Wang F, Zhang WK, Zhang ZT, Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chin Med J (Engl)*. December 124(23), (2011) 4022-4028.

³⁸ Mori G. Brunetti G. Oranger A. Carbone C. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1237, (2011), 47-52.

³⁹ Zhang W. Yang N. Shi XM Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *J Biol Chem*. February 283(8), (2008), 4723-4729.

⁴⁰ Suehiro F. Nishimura M. Kawamoto T. Kanawa M. Yoshizawa Y. Murata H. Kato Y, Impact of zinc fingers and homeoboxes 3 on the regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation, *Stem Cells & Development*. Sep 20(9), (2011)), 1539-1547.

⁴¹ Kim BS, Kim JS, Sung HM, You HK, Lee J. Cellular attachment and osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells on natural cuttlefish bone J Biomed Mater Res A. Mar 23 (2012). doi: 10.1002/jbm.a.34113

⁴² Biman B. Mandal, Subhas C. Kundu, Osteogenic and adipogenic differentiation of rat bone marrow cells on non-mulberry and mulberry silk gland fibroin 3D scaffolds, Biomaterials V30 (28), October (2009), 5019–5030.

⁴³ Hichem Miraoui, Karim Oudina, Herve´ Petite, Yukiho Tanimoto, Keiji Moriyama, and Pierre J. Marie, Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Promotes Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Cells via ERK1/2 and Protein Kinase C Signaling, The journal of biological chemistry V 284,(8), February 20, (2009) 4897–4904.

⁴⁴ Kilian K, Bugarija B, Lahn B, and Mrksich M, Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells, PNAS March V107 (11), (2010),4872-4877

⁴⁵ Polini A, Pisignano D, Parodi M, Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors, PLoS ONE 6(10): e26211. doi:10.1371/journal.pone.0026211.

⁴⁶ Schantti O., Grad S, Goldhahn J, A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of HMSC Eur Cell Mater.22 (2011), 214-225

⁴⁷ Mitsiadis T, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari Y; Stem cell niches in mammals; Experimental Cell Research 313 (2007), 3377 – 3385

⁴⁸ Fuch E., Tumber T., Guasch G., Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche, Cell 116 (2004), 769–778

⁴⁹Laine S.K, Hentunen T, Laitala-Leinonen T, Do microRNAs regulate bone marrow stem cell niche physiology?; *Gene* 497 (2012) 1–9, *Eur Cell Mater.*22 (2011). 214-225.

⁵⁰ Sperber G.H. *Craniofacial Embriology*. Dental Handbook. Fourth Edition. Wright. Great Britain.1989

⁵¹ Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000), 13625–13630.

⁵² Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81 (2002), 531–5.

⁵³ La Noce M, et al. Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2014.02.018>

⁵⁴ Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambaro G, De Angelis L, Mancini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (2010), 1635–1644.

⁵⁵ McCulloch CA. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec* 211 (1985), 258–262

⁵⁶ Gronthos S, Mrozik K, Shi S, et al. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif Tissue Int* 79 (2006), 310–317.

⁵⁷ Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* 10 (2007), 149–160.

⁵⁸ Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 8 (2005), 191–199.

⁵⁹ Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res.* 324 (2006), 225-236.

⁶⁰ Eubanks E, Tarle S, Kaigler D Tooth Storage, Dental Pulp Stem Cell Isolation, and Clinical Scale Expansion without Animal Serum JOE, (2014) in press

⁶¹ Zhang J, An Y, Gao L, Zhang Y, Jin Y, Chen F, The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells *Biomaterials* 33 (2012) 6974-6986

⁶² Iwata T, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, Feijen J, Okano T, Ishikawa I. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol*; 37 (2010), 1088–1099

⁶³ Nolla, C. M. The development of the permanent teeth. *Journal of Dentistry for Children*, 27 (1960), 254–266

⁶⁴ Tziafas D, Kodonas K, Differentiation Potential of Dental Papilla, Dental Pulp, and Apical Papilla Progenitor Cells *JOE* V 36 (5), May (2010), 781-789.

⁶⁵ Rosenbaum A, Grande D, Dines J, The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering *Organogenesis* 4(1) (2008), 23-27.

⁶⁶ Patil R, Kumar M, Lee W, Jeon R, Jang S, Lee J, Park B, Byun J, Ahn C, Kim J, Rho G, Multilineage potential and proteomic profiling of Human dental stem cells derived from a single donor, *Experimental cell Research* 320 (2014), 92 – 107.

⁶⁷ Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M, Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res* 83,(2004), 27–34

⁶⁸ Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP) archives of oral biology 5 (6) (2011), 709 – 721

⁶⁹ Tormin A, Li O, Brune JC, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* 117 (2011), 5067–77.

⁷⁰ Seo B, Miura, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Gehron Robey P, Wang C, Shi S Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *Lancet* 364 (2004), 149–155

⁷¹ Liu L, Ling J, Wei X, Wu L, Xiao Y Stem Cell Regulatory Gene Expression in Human Adult Dental Pulp and Periodontal Ligament Cells Undergoing Odontogenic/Osteogenic Differentiation *JOE* 35 (10), October (2009), 1368-1376

⁷² Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2 *Front Biosci.* Jan 1(13) (2008), 898-903.

⁷³ Pilon JJAM, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement: an experimental study in beagle dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 110 (1996), 16-23.

⁷⁴ Florez G, Isaza D, Tobon S, Time-related changes in salivary levels of the osteotropic factors sRANKL and OPG Through orthodontic tooth movement. *AJODO* 143 (1) (2013), 92-100.

⁷⁵ Tsumanuma Y., Iwata T., Washio K. et al., Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model, *Biomaterials*, V32 (25) (2011), 5819–5825.

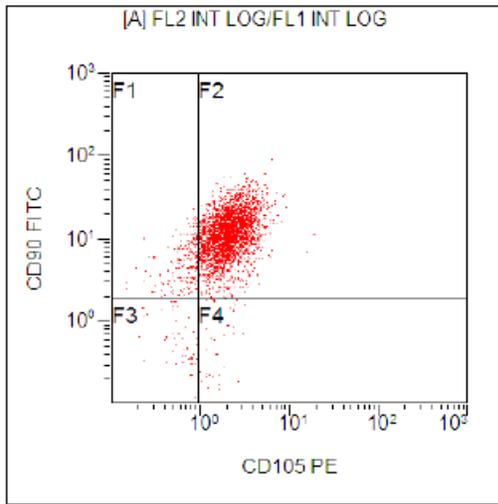
⁷⁶ Brawley C, Matunis E. Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science* 304 (2004), 1331–1334.

⁷⁷ Januschke J, N athke I. Stem cell decisions: A twist of fate or a niche market? *Semin Cell Dev Biol* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.014>

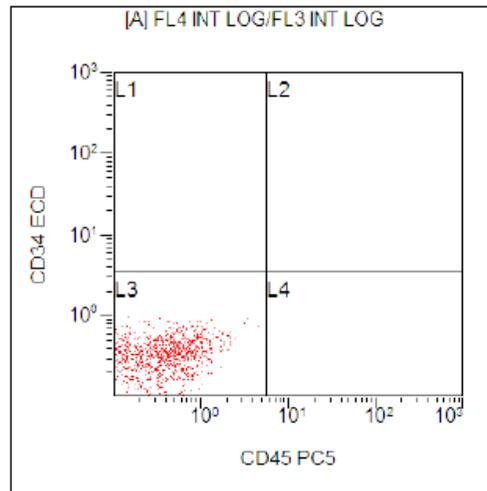
⁷⁸ Pustylnik S, Fiorino C, Nabavi N, Zappitelli T, da Silva R, Aubin J, Harrison R, EB1 Levels Are Elevated in Ascorbic Acid (AA)-stimulated Osteoblasts and Mediate Cell-Cell Adhesion-induced Osteoblast Differentiation *J. Biol. Chem* 288 (2013), 22096-22110.

ANEXO 1
GRAFICAS DE CITOMETRÍAS

Citometría M14L sin separación por método de Miltenyi:

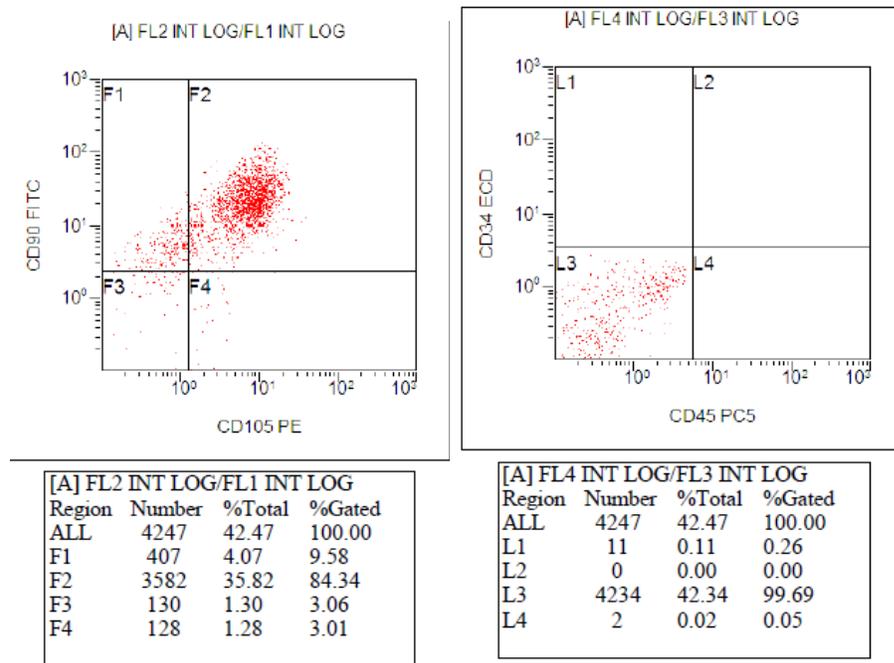


[A] FL2 INT LOG/FL1 INT LOG			
Region	Number	%Total	%Gated
ALL	6241	62.41	100.00
F1	400	4.00	6.41
F2	5596	55.96	89.67
F3	140	1.40	2.24
F4	105	1.05	1.68

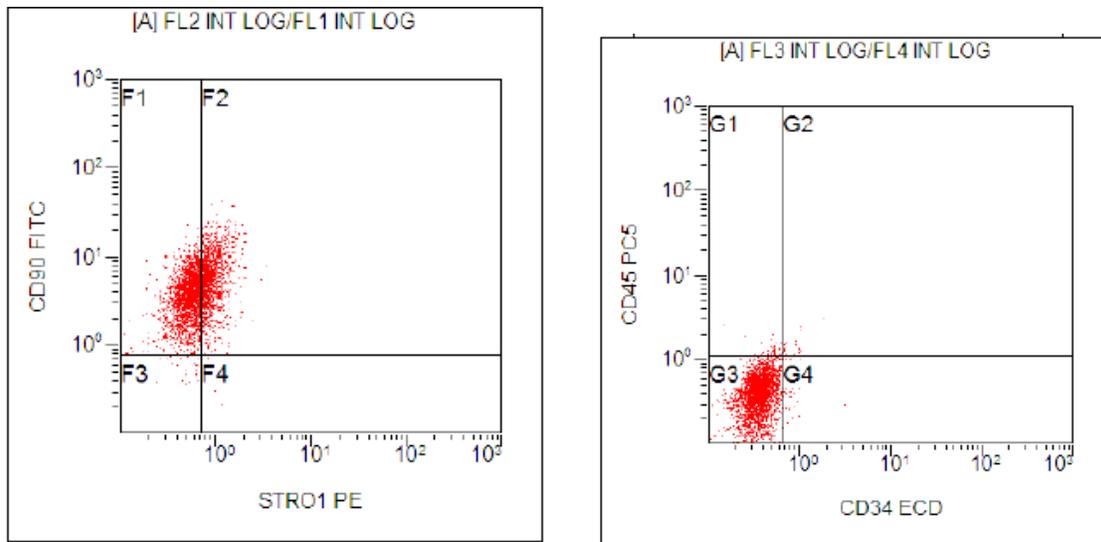


[A] FL4 INT LOG/FL3 INT LOG			
Region	Number	%Total	%Gated
ALL	6241	62.41	100.00
L1	1	0.01	0.02
L2	0	0.00	0.00
L3	6240	62.40	99.98
L4	0	0.00	0.00

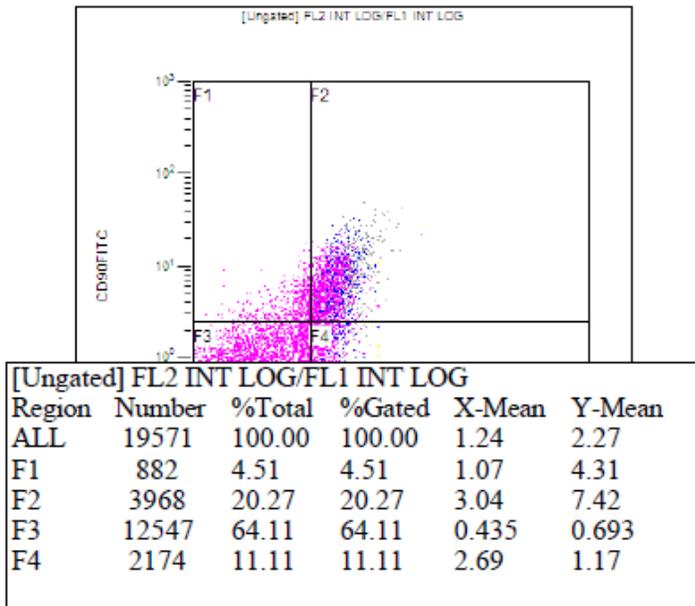
Citometría M14L separada por el método de Miltenyi



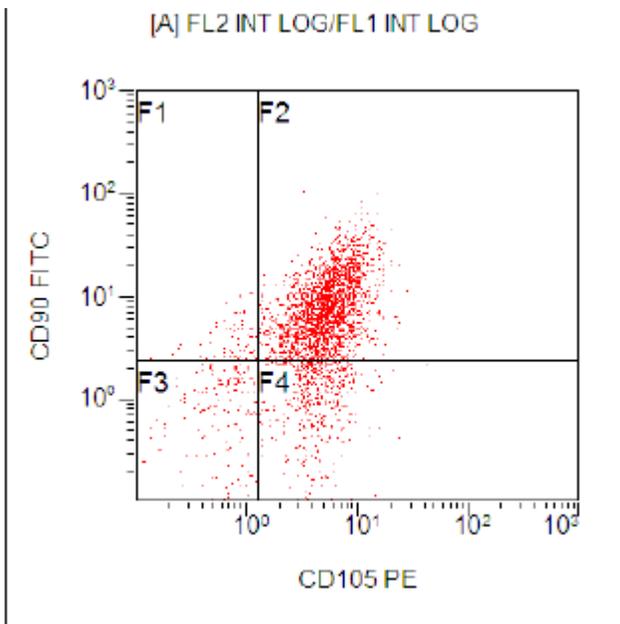
Citometría M18 L sin separación por el método de Miltenyi



Citometría M 18 L con separación por el método de Miltenyi

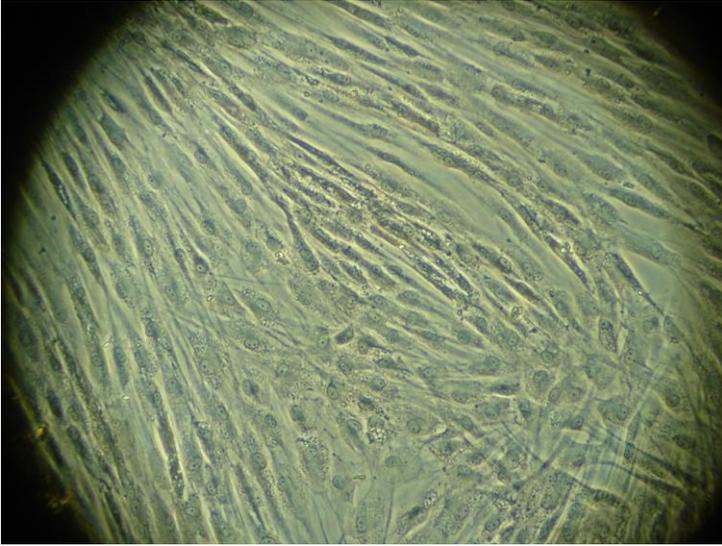


Citometría M 18 p sin separación por el método de Miltenyi

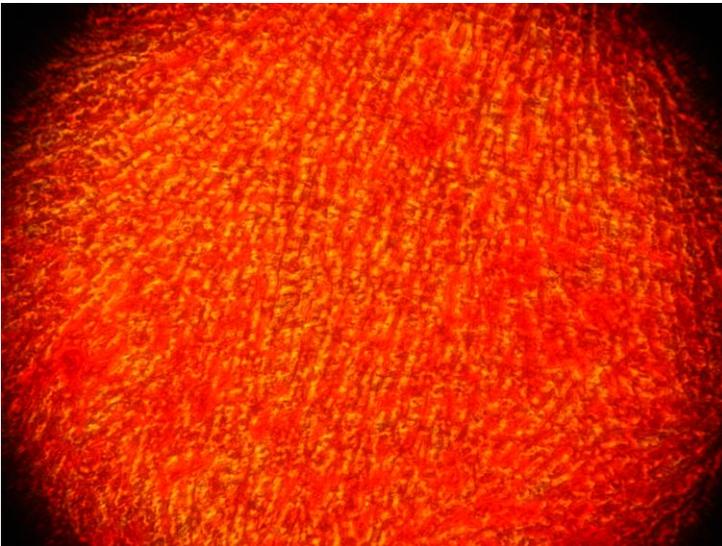


ANEXO 2
TINCIONES

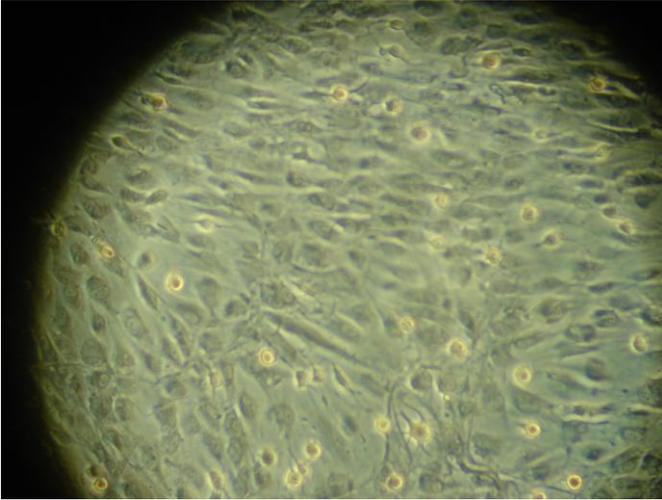
Tinción con rojo alizarin 22P medio 1 (negativo)



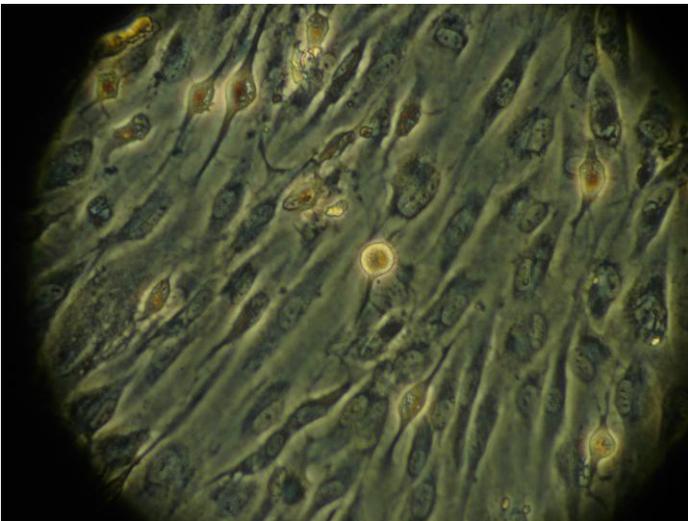
Tinción con rojo alizarin 22 P medio 5



Tinción con rojo alizarín 26L medio 4



Tinción con rojo alizarín 26 L medio 2



Tinción con fosfatasa alcalina leucocitaria 14 L medio 5

