

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III

(Medicina y Cirugía Bucofacial)



**TESIS DOCTORAL**

**Modificación del patrón de expresión genética de células madre mesenquimales de origen de pulpa dental humana mediante medio de diferenciación comercial y medio condicionado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Eva María Notario Martín**

Directores

Luis Blanco Jerez

Rafael Baca Pérez-Bryan

José Antonio Uranga Ocio

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**



**“MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE  
CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES DE ORIGEN DE PULPA  
DENTAL HUMANA MEDIANTE MEDIO DE DIFERENCIACIÓN  
COMERCIAL Y MEDIO CONDICIONADO”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR:**

Eva María Notario Martín

**BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:**

Prof. Luis Blanco Jerez

Prof. Rafael Baca Pérez-Bryan

Prof. Jose Antonio Uranga Ocio

**Madrid, 2015**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

**“MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE  
CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES DE ORIGEN DE PULPA  
DENTAL HUMANA MEDIANTE MEDIO DE DIFERENCIACIÓN  
COMERCIAL Y MEDIO CONDICIONADO”**

**TESIS DOCTORAL**

**EVA M. NOTARIO MARTÍN**

**Madrid, 2015**

TESIS DOCTORAL:

“MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES DE ORIGEN DE PULPA DENTAL HUMANA MEDIANTE MEDIO DE DIFERENCIACIÓN COMERCIAL Y MEDIO CONDICIONADO”

Realizada por:

Eva María Notario Martín

Dirigida por:

- PROF. DR. LUIS BLANCO JÉREZ

Profesor Titular del Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid

- PROF. DR. RAFAEL BACA PÉREZ-BRYAN

Profesor Titular del Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid

- PROF. DR. JOSE ANTONIO URANGA OCIO

Profesor Contratado Doctor de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid.

**"Es verdad que optamos por la risa en casi todas las situaciones, con  
excepción de una que otra visita al dentista."**

(Joseph Heller)

A mi padre por inculcarme disciplina

A mi madre por enseñarme la perseverancia

A mi tutor por compartir su inteligencia

## **Agradecimientos:**

A mis colegas de profesión del máster de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid por implicarse en proporcionar material con el que hemos podido trabajar. A Jose Ramón Lamas y a Pilar Tornero, del Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC) del Hospital Clínico San Carlos de Madrid por su orientación en aislamiento y cultivo de células así como la aplicación de las técnicas de PCR para caracterización de células y expresión génica. A Javier Catón y de nuevo a Jose Ramón Lamas por transmitir la meticulosidad a la hora de procesar las muestras biológicas. A Víctor Valle por su destreza en el manejo de software informático. Y por último, a mis directores de la tesis, Profesor Dr. Rafael Baca Pérez-Bryan, Prof. Dr. Jose A. Uranga Ocio y Prof. Dr. Luis Blanco Jérez por su apoyo incondicional, entusiasmo y su esfuerzo.



# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. RESUMEN</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>II. ABSTRACT</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....                                     | <b>12</b> |
| <b>A. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES:</b> .....                       | <b>12</b> |
| i) Fuentes de obtención de MSCs: .....                             | 16        |
| ii) Criterios de la ISCT: .....                                    | 18        |
| iii) CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL: .....                       | 19        |
| iv) INMUNOFENOTIPO DE CÉLULAS MADRE.....                           | 21        |
| v) INMUNOFENOTIPO DE DPSCs:.....                                   | 28        |
| <b>B. CÉLULAS ÓSEAS: OSTEOLASTOS</b> .....                         | <b>30</b> |
| i) DESCRIPCIÓN DEL OSTEOLASTO.....                                 | 31        |
| ii) MARCADORES DE OSTEOLASTOS.....                                 | 32        |
| iii) EXPRESIÓN GÉNICA DE OSTEOLASTOS .....                         | 34        |
| <b>C. CULTIVO CELULAR:</b> .....                                   | <b>38</b> |
| i) Cultivo primario de Osteoblastos .....                          | 39        |
| ii) Líneas celulares derivadas de tumores óseos.....               | 40        |
| <b>D. METODOS DE CULTIVO DE LOS OSTEOLASTOS</b> .....              | <b>40</b> |
| <b>E. FACTORES QUE ESTIMULAN LA DIFERENCIACIÓN</b> .....           | <b>41</b> |
| <b>F. METABOLITOS o FACTORES SOLUBLES DE LOS OSTEOLASTOS</b> ..... | <b>42</b> |
| <b>IV. JUSTIFICACIÓN:</b> .....                                    | <b>46</b> |
| <b>V. HIPÓTESIS NULA. OBJETIVOS DEL ENSAYO:</b> .....              | <b>49</b> |
| <b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS:</b> .....                               | <b>52</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>A. Criterios de inclusión:</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>B. Criterios de exclusión:</b> .....  | <b>53</b> |
| <b>C. Diseño experimental:</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>D. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:</b> .....  | <b>54</b> |
| <b>E. OBTENCIÓN DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS:</b> .....   | <b>55</b> |
| <b>F. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE PULPA DENTAL</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>G. CARACTERIZACIÓN DE OSTEABLASTOS Y CÉLULAS MADRE MEDIANTE<br/>CITOMETRÍA DE FLUJO</b> ..... | <b>60</b> |
| <b>H. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS POR HISTOQUÍMICA</b> .....                                      | <b>62</b> |
| <b>I. PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE OSTEABLASTOS Y CELULAS MADRE<br/>MEDIANTE PCR</b> .....    | <b>62</b> |
| i) LISADO y OBTENCIÓN RNAm PARA PCR.....   | 63        |
| ii) CUANTIFICADOR.....   | 66        |
| iii) TRANSCRIPCIÓN INVERSA:.....   | 67        |
| iv) PASO DE cDNA A DOBLE HÉLICE Y PCR .....  | 69        |
| <b>J. INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA Y OSTEOGÉNICA DE DPSCs</b> .....                                     | <b>74</b> |
| <b>VII. RESULTADOS:</b> .....  | <b>78</b> |
| <b>A. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO:</b> .....                        | <b>79</b> |
| i) Grupo 0: osteoblastos .....   | 81        |
| ii) Grupo LB: pulpa dental .....   | 84        |
| iii) Grupo S: pulpa dental .....   | 87        |
| iv) Grupo FB: hueso adherido a molar .....   | 90        |
| v) Grupo FT: hueso de triángulo.....   | 93        |
| <b>B. CARACTERIZACIÓN HISTOQUÍMICA</b> .....   | <b>96</b> |
| <b>C. PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA PRIMARIO:</b> .....   | <b>96</b> |
| <b>D. PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA TRAS CULTIVO CON MEDIO COMERCIAL Y</b>                        |           |

|  |            |
|--|------------|
| <b>MEDIO CONDICIONADO.....</b>             | <b>104</b> |
| <b>VIII. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES.....</b> | <b>112</b> |
| <b>IX. ANEXOS.....</b>                     | <b>117</b> |
| <b>X. BIBLIOGRAFIA.....</b>                | <b>124</b> |

## INDICE DE ABREVIATURAS

- ACTB: Actina Beta
- ALP: enzima fosfatasa alcalina
- ALPL: Fosfatasa alcalina.
- APC o FL4: Allophycocyanin. Fluorocromo alofococianina.
- ARN: ácido ribonucleico
- ARN<sub>m</sub>: ácido ribonucleico mensajero.
- ATP: Adenosín trifosfato. Nucleótido fundamental para obtención de energía.
- BGLAP: osteocalcina.
- BM- MSCs: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.
- BM: bone marrow, médula ósea.
- BMP2: Bone Morphogenetic Proteins, proteína morfogenética ósea tipo 2
- BMP7: proteína morfogenética ósea tipo 7
- CD 105 (Cluster de diferenciación 105): También denominada endoglina. Glicoproteína de superficie de membrana que forma parte del complejo receptor TGF-beta (factor de crecimiento)
- CD 34 (cluster de diferenciación 34): glicoproteína de superficie muy implicada en la adhesión.
- CD 45 (cluster de diferenciación 45): proteína tirosin-fosfatasa. Presente en los linfocitos
- CD 90 (cluster differentiation 90): También denominada Thy-1 o THYMocyte differentiation antigen 1. Antígeno de superficie para determinar a los precursores de las células T en el timo.
- CD11 (cluster differentiation 11): Forma parte de la familia de las integrinas. Es una molécula de adhesión propia de monocitos y neutrófilos.
- CD14: cluster differentiation 15
- CD73 (Cluster Differentiation 73) Enzima denominada ecto-5-prime-nucleotidasa (fosfohidrolasa 5-prime-ribonucleótido)
- cDNA: DNA complementario. Es solo una hebra.

- Células AS: células madre de adulto o postnatal
- Células ES: células madre embrionarias
- CO: monóxido de carbono.
- COL1A1: Gen que codifica la síntesis de colágeno tipo I.
- DFPCs: células madre progenitoras del folículo dental o saco pericoronario
- DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium. Medio de cultivo celular.
- DNA: ácido desoxirribonucleico. Es una doble hélice
- DPSCs: células madre de pulpa dental
- EDTA: ácido etildiaminotetraacético
- FCS: suero fetal bovino
- FDA: Foods and Drugs Administration
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.
- FITC o FL1: Fluorescein IsoThioCyanate. Fluorocromo de Isocianato de fluoresceína
- GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Enzima implicada en la glucólisis y presente en todas las células.
- GPT: Guanosín trifosfato. Nucleótido usado en el metabolismo celular.
- HLA-DR: complejo de histocompatibilidad
- HO-1: Hemo-oxigenasa 1
- HSC: células madre hematopoyéticas
- IMF: intensidad media de fluorescencia
- iPS: células madre pluripotentes inducidas
- ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular
- LPS: Proteína de Unión al Lipopolisacárido.
- MAPes: Multi Potent Adult Progenitor. Células adultas progenitoras multipotentes.
- mg: miligramos

- ml: mililitros
- MSCs: células madre mesenquimales
- °C: grados Celsius
- PBS: phosphate buffered saline. Tampón fosfato salino
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PDLSCs: células madre de ligamento periodontal
- PE o FL2: R-Phycoerythrin. Fluorocromo ficoeritrina
- Rpm: revoluciones por minute
- RUNX2: proteína CBFA1 o factor de transcripción asociado a Runt
- SCAPS: células de la papila apical.
- SHEDs: las células madre de dientes caducifolios
- SPP1: Osteopontina
- T25: frasco de cultivo (flask) de 25 cm<sup>2</sup>
- T75: frasco de cultivo (flask) de 75 cm<sup>2</sup>
- TGT-β: Factor de crecimiento transformante beta
- UFC-F: Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1: DIFERENCIACIÓN DE LOS TEJIDOS HUMANOS .....   | 13 |
| FIGURA 2: DIFERENCIACIÓN DE MSCS.....   | 16 |
| FIGURA 3: CÉLULAS MADRE DE ORIGEN DENTAL.....   | 20 |
| FIGURA 4: PROTEÍNAS EXPRESADAS EN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....   | 23 |
| FIGURA 5: CITÓMETRO DE FLUJO Y SORTING. ....  | 29 |
| FIGURA 7: SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....  | 63 |
| FIGURA 12: SOFTWARE NANODROP 1000 V360.....   | 67 |
| FIGURA 15: VIALES PREPARADOS PARA PCR. ....   | 71 |
| FIGURA 18: MULTIWELL.....   | 76 |
| FIGURA 19: MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALIZADOS POR LONZA .....  | 76 |
| FIGURA 20: HISTOGRAMA DE DISPERSIÓN PARA EL GRUPO O .....   | 81 |
| FIGURA 21: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD11B, CD14, CD20, CD44, CD45 MUESTRA O<br>.....                                  | 81 |
| FIGURA 22: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66A/C/E,<br>CD73, CD117, CD29 PARA MUESTRA O.....     | 82 |
| FIGURA 23: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD59, CD105 PARA MUESTRA O. ....  | 83 |
| FIGURA 24: HISTOGRAMA DE DISPERSIÓN PARA EL GRUPO LB. ....  | 84 |
| FIGURA 25: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD11B, CD14, CD20, CD44, CD45 PARA<br>MUESTRA LB. ....                            | 84 |
| FIGURA 26: OVERLAY DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66A/C/E,<br>CD73, CD117, CD29 PARA LA MUESTRA LB ..... | 85 |
| FIGURA 27: OVERLAY DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD59, CD105 PARA LA MUESTRA LB.....  | 86 |
| FIGURA 28: HISTOGRAMA DE DISPERSIÓN PARA EL GRUPO S .....   | 87 |
| FIGURA 29: OVERLAY DE HISTOGRAMA PARA LOS CD11B, CD14, CD20, CD44, CD45 PARA LA<br>MUESTRA S .....                            | 87 |
| FIGURA 30: OVERLAY DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66A/C/E,<br>CD73, CD117, CD29 PARA LA MUESTRA S.....   | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 31: OVERLAY DE HISTOGRAMA PARA LOS CD59, CD105 PARA LA MUESTRA S .....   | 89  |
| FIGURA 32: HISTOGRAMA DE DISPERSIÓN PARA EL GRUPO FB .....  | 90  |
| FIGURA 33: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD11B, CD14, CD20, CD44, CD45 PARA<br>MUESTRA FB .....                            | 90  |
| FIGURA 34: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66A/C/E,<br>CD73, CD117, CD29 PARA MUESTRA FB .....   | 91  |
| FIGURA 35: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD59, CD105 PARA LA MUESTRA FB .....  | 92  |
| FIGURA 36: HISTOGRAMA DE DISPERSIÓN PARA EL GRUPO FT .....  | 93  |
| FIGURA 37: OVERLAY DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD11B, CD14, CD20, CD44, CD45 PARA LA<br>MUESTRA FT .....                          | 93  |
| FIGURA 38: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66A/C/E,<br>CD73, CD117, CD29 PARA LA MUESTRA FT..... | 94  |
| FIGURA 39: OVERLAYS DE HISTOGRAMAS PARA LOS CD59, CD105 PARA LA MUESTRA FT .....  | 95  |
| FIGURA 41: COMPARATIVA DE LA MUESTRA FM CON LA MUESTRA LB .....   | 101 |
| FIGURA 42. COMPARATIVA DE LA MUESTRA O CON LA MUESTRA LB.....   | 102 |
| FIGURA 43: COMPARATIVA DE LA MUESTRA FT CON LA MUESTRA LB .....   | 103 |
| FIGURA 44: GRÁFICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA PCR SECUNDARIA DEL GRUPO S.....   | 108 |
| FIGURA 45: GRÁFICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA PCR SECUNDARIA PARA GRUPO LB.....   | 109 |

## INDICE DE TABLAS

|  |     |
|--|-----|
| TABLA 1: FUENTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....  | 17  |
| TABLA 2: MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS DPSCS .....   | 28  |
| TABLA 3: ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE OSTEÓBLASTOS.....  | 33  |
| TABLA 4. PRIMERS ESPECÍFICOS DE CADA GEN.....  | 70  |
| TABLA 5: CICLOS DEL TERMOCICLADOR PARA LA POLIMERASA.....  | 72  |
| TABLA 6. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA MUESTRA 0 TRAS RESTAR LOS VALORES DE<br>AUTOFLUORESCENCIA.....     | 83  |
| TABLA 7. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA MUESTRA LB TRAS RESTAR LOS VALORES DE<br>AUTOFLUORESCENCIA.....    | 86  |
| TABLA 8: INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA MUESTRA S TRAS RESTAR LOS VALORES DE<br>AUTOFLUORESCENCIA.....     | 89  |
| TABLA 9. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA MUESTRA FB TRAS RESTAR LOS VALORES DE<br>AUTOFLUORESCENCIA.....    | 92  |
| TABLA 10. : INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA MUESTRA FT TRAS RESTAR LOS VALORES DE<br>AUTOFLUORESCENCIA..... | 95  |
| TABLA 11. VALORES CT DE LOS 7 GENES ANALIZADOS EN PCR PRIMARIA .....   | 97  |
| TABLA 12. TABLA DE $\Delta$ CT DE PCR PRIMARIA.....  | 97  |
| TABLA 13. TABLA DE $\Delta\Delta$ CT EN PCR PRIMARIA.....  | 98  |
| TABLA 14: RESUMEN DE LOS CÁLCULOS PARA RT-PCR (PCR DE TIEMPO REAL).....                                      | 99  |
| TABLA 15. CÁLCULOS DE FOLD CHANGE EN PCR PRIMARIA ( $2^{-\Delta\Delta$ CT).....                              | 99  |
| TABLA 16: VALORES DE LOS CT DE LOS 7 GENES EN EL GRUPO PULPA S.....  | 105 |
| TABLA 17: VALORES DE LOS CT DE LOS 7 GENES EN EL GRUPO PULPA LB.....   | 105 |
| TABLA 18: TABLA DE $\Delta$ CT DE PCR SECUNDARIA DE PULPA S.....   | 106 |
| TABLA 19: TABLA DE $\Delta$ CT DE PCR SECUNDARIA DE LB .....   | 106 |
| TABLA 20: TABLA DE $\Delta\Delta$ CT EN PCR SECUNDARIA EN LA PULPA S. ....                                   | 107 |
| TABLA 21: TABLA DE $\Delta\Delta$ CT EN PCR SECUNDARIA. EN LA PULPA CONTROL LB.....                          | 107 |

|  |     |
|--|-----|
| TABLA 22: CÁLCULOS DE FOLD CHANGE EN PCR SECUNDARIA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) PARA PULPA S .....  | 108 |
| TABLA 23: CÁLCULOS DE FOLD CHANGE EN PCR SECUNDARIA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) PARA PULPA LB ..... | 108 |





## I. RESUMEN

El término de célula madre hace referencia a un tipo de célula que es capaz de diferenciarse a distintos tipos de células. En realidad, por motivos técnicos no se experimenta con las mejores células madre que hay que son las embrionarias y que dada su pluripotencialidad, podrían dar lugar a cualquier tipo de célula de un organismo.

Las células madre que tenemos a nuestro alcance son las del adulto o postnatales y son multipotentes, diferenciándose a linajes específicos. Dentro de este grupo, se encuentran las células madre mesenquimales (SCs), que se diferencian a los 3 linajes mesodérmicos: osteoblastos, adipocitos y condrocitos.

Dentro del campo odontológico, hay una fuente muy accesible de SCs: la pulpa dental (DPSC). Son de apariencia más fibroblastoide, pueden ser criopreservadas, proliferan extensamente (hasta 25 pases), son poco inmunogénicas (no producen tanta inflamación) expresan marcadores mesenquimales y tienen mayor plasticidad.

La caracterización de las DPSC en gran medida se basa en el uso de métodos tales como tinciones histoquímicas, marcaje inmune por citometría de flujo y transcripción inversa PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para establecer tanto la identidad de células madre como la función.

Se ha demostrado que las DPSCs pueden diferenciarse a osteoblastos, siendo una fuente de hueso autólogo in vitro. El uso de estas células en medicina regenerativa abre un mundo de posibilidades reduciendo los problemas inmunológicos de compatibilidad entre individuos a cero.

Existen en el mercado medios de cultivo comercializados que favorecen la inducción osteogénica de las DPSC y hemos querido comparar si esta diferenciación es idéntica si se utiliza el medio de cultivo condicionado obtenido de osteoblastos.

OBJETIVO: determinar que no hay diferencia significativa entre los perfiles de expresión genéticos en las DPSCs cultivadas con medio de inducción osteogénico comercializado (Lonza<sup>®</sup>) y las DPSCs cultivadas con medio condicionado obtenido de cultivo de osteoblastos.

MATERIAL y MÉTODOS: Se recolectaron muestras de hueso y pulpa dental de los terceros molares incluidos de donantes voluntarios que asistían al Departamento de Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid para extracción de cordales incluidos. En el caso de las células de pulpa dental se evitó la odontosección para reducir la contaminación. Se cultivaron dichas células, se caracterizaron mediante su inmunofenotipo por citometría de flujo y métodos histoquímicos y se determinó su perfil de expresión genético mediante PCR tanto de osteoblastos como de células madre. Para citometría de flujo, se incubaron las células con los anticuerpos para los antígenos humanos CD11b FITC, CD14 FITC, CD20 FITC, CD44 FITC, CD45 FITC, CD80 FITC, CD90 FITC, HLA-DR FITC, CD34 PE, CD66a/c/e PE, CD73 PE, CD117 PE, CD29 APC, CD59 APC, CD 105 APC, Control FITC, Control PE, Control APC. Los anticuerpos pertenecían a la casa comercial BD Bioscience.

Para caracterización histoquímica a los tres linajes mesodérmicos, se fijaron las células en formol al 10 por ciento y se utilizó tinción de fosfatasa alcalina (KIT- 104 de Sigma) y de cristales de hidroxapatita (Osteomalge LONZA mineralization assay PA-1503) para osteoblastos, tinción oil red para adipocitos y tinción de azul alcian para condrocitos.

Mediante transcripción inversa se estudiaron 7 genes característicos de osteoblastos que incluían ALPL (fosfatasa alcalina), BGLAP (osteocalcina), RUNX2 (CBFA1 o factor de transcripción asociado a Runt), COL1A1 (colágeno tipo I), SPP1 (osteopontina), BMP2 (proteína morfogenética ósea 2) y BMP7 (proteína morfogenética ósea 7) y dos genes control expresados en todas las células: ACTB (Actina Beta) y GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Una vez identificadas, estas células madre se sometieron a protocolos de inducción adipogénica y osteogénica mediante el uso de medios de cultivo específicos comercializados (Lonza) y mediante el medio de cultivo condicionado obtenido del crecimiento de osteoblastos. Posteriormente se volvió a estudiar el perfil de expresión genética por PCR de las células madre inducidas por los medios para hacer la comparativa con los perfiles primarios.

**RESULTADOS:** Las muestras eran positivas para CD44, CD90, CD73, CD29, CD59 y el CD105 y negativas para CD11b, CD14, CD20, CD45, CD80, HLA-DR, CD34, CD 66 a/c/e y CD17. De esta manera se cumplían los criterios de la ITSC (Sociedad Internacional de Terapia Celular) de células madre. El marcador de células hematopoyéticas, CD34, no se detectó.

Existe diferencia entre los perfiles de expresión genética para los genes COL1A1 y

BMP7 y no hay diferencia significativa para la expresión de los genes ALPL, BGLAP, RUNX2, SPP1 y BMP2 en las células madre sometidas a medio de cultivo de inducción osteogénica comercializado y las células madre sometidas al medio condicionado obtenido de cultivo de osteoblastos.

Hubo diferencias de expresión génica de los 7 genes analizados en las MSCs aisladas de diferentes fuentes así como en las sometidas a protocolos de inducción.

**DISCUSIÓN:** Una mayor expresión del gen COLA1 y BMP7 en las DPSCs sometidas a inducción osteogénica por medio comercializado implicaría una mejor osteogénesis que en las DPSCs sometidas a medio condicionado, sin embargo no es concluyente puesto que puede depender que: 1) el tiempo de cultivo sea insuficiente para la expresión de ese gen en el medio condicionado. Éste está más empobrecido de glutamina y las células tardan más en crecer. 2) Haya una supresión en la síntesis de esas proteínas por parte de las células al encontrarlas en el medio condicionado.

**CONCLUSIÓN:** Se necesitan más estudios en diferentes momentos de cultivo celular para poder ver si existe diferencia estadísticamente significativa en el perfil genético de las DPSCs sometidas a inducción osteogénica por los dos medios comentados. Si admitiéramos la hipótesis de que hay diferencia, un cocultivo de osteoblastos del mismo paciente con células madre de pulpa dental favorecería la diferenciación de las células madre a osteoblastos por los propios factores de crecimiento que segregan las células óseas en cultivo y se podría aplicar en cirugías regenerativas disminuyendo el

tiempo de recuperación y minimizando la inflamación.

Los factores solubles liberados por las células implantadas pueden desempeñar un importante papel en la regeneración de los tejidos estimulando a las células normales residentes en el sitio lesionado mediante un mecanismo paracrino. Estas proteínas secretadas pueden también actuar de forma autocrina sobre las propias células trasplantadas que los secretan, favoreciendo su proliferación, autorrenovación y la continuidad de sus funciones.

## II. ABSTRACT

The term stem cell refers to a cell type that is able to differentiate into different cell types. Actually, for technical reasons, experiments are not conducted with the best stem cells available, the embryonic cells. Due to the pluripotency of these cells, they could result in any type of cells of an organism.

We have at our disposal adult or postnatal stem cells. These are only multipotent, and can be differentiated into specific lineages. Within this group there are mesenchymal stem cells (SCs) which differentiate into three mesodermal lineages: osteoblasts, adipocytes and chondrocytes.

Within the dental field, there is a very accessible source of stem cells: the dental pulp (DPSC). They have a more fibroblastoid appearance, can be cryopreserved, proliferate extensively (up to 25 passes), are less immunogenic (they produce less inflammation), express mesenchymal markers and have greater plasticity.

The characterization of the DPSCs is based largely on the use of methods such as histochemical staining, flow cytometry and reverse transcription by PCR (Polymerase Chain Reaction) to establish both the identity and function of stem cells.

It has been proven that DPSCs can differentiate into osteoblasts, being a source of autologous bone in vitro. The use of these cells in regenerative medicine opens up a world of possibilities reducing immunological compatibility problems between patients to zero.

Commercial culture media which favor the osteogenic induction of DPSC are available on the market. We have compared if there is any differentiation between this induction

and the induction obtained with conditioned culture medium produced by osteoblast.

**OBJECTIVE:** To determine that there is no significant difference between gene expression profiles in DPSCs cultivated with commercial osteogenic induction media (Lonza®) and DPSCs cultivated with conditioned culture medium obtained from osteoblasts.

**METHODS:** Samples of bone and dental pulp of the third molars were collected from volunteer donors who attended the Department of Oral Surgery of the School of Dentistry at the Complutense University of Madrid, for removal of impacted wisdom teeth. In the case of dental pulp cells, the odontosection was avoided to reduce contamination. Bone and dental pulp were cultivated. Both osteoblast and stem cells were isolated, were characterized by immunophenotyping and flow-cytometry, histochemical staining methods, and the genetic expression profile was determined by PCR.

For flow cytometry, cells were incubated with antibodies to human antigens CD11b FITC, CD14 FITC, CD20 FITC, CD44 FITC, CD45 FITC, CD80 FITC, CD90 FITC, HLA-DR FITC, CD34 PE, CD66a / c / e PE, CD73 PE, PE CD117, CD29 APC, APC CD59, CD 105 APC, FITC Control, PE Control, APC Control. The antibodies were from BD Bioscience. For the three histochemical characterization mesodermal lineages, cells were fixed in formaldehyde at 10 percent and alkaline phosphatase staining (Sigma KIT- 104) and hydroxyapatite crystals (LONZA Osteomalge mineralization assay PA-

1503) were used for osteoblasts, oil red staining for adipocytes and Alcian blue staining for chondrocytes.

To study the genetic profile, seven characteristic genes of osteoblasts were used. These were: ALPL (alkaline phosphatase), BGLAP (osteocalcin), RUNX2 (or transcription factor CBFA1 associated Runt), COL1A1 (Type I collagen), SPP1 (osteopontin), BMP2 (bone morphogenetic protein 2) and BMP7 (morphogenetic protein bone 7) and two house-keeping genes: ACTB (beta-actin) and GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

Once identified, these stem cells were subjected to protocols for adipogenic and osteogenic induction using specific and commercial culture media and using the conditioned medium obtained from osteoblast growth. Later, we studied again the gene expression profile by PCR of the induced stem cells by media to compare with both the primary profiles of the stem cells and the osteoblast.

RESULTS: Samples were positive for CD44, CD90, CD73, CD29, CD59, and CD105, and negative for CD11b, CD14, CD20, CD45, CD80, HLA-DR, CD34, CD 66 a/c/e, and CD17. Thus the criteria for stem cells set by the ISCT (International Society for Cellular Therapy) were met. Hematopoietic cell marker, CD34, was not detected.

There were differences between gene expression profiles of COL1A1 and BMP7 and no significant difference in gene expression of ALPL, BGLAP, RUNX2, SPP1 and BMP2 in stem cells cultured in commercial osteogenic medium and stem cells cultured in conditioned medium.

There were differences in gene expression of the seven genes analyzed by the MSCs isolated from different sources and in the MSCs subjected to induction protocols.

DISCUSSION: Increased expression of the COL1A1 and BMP 7 genes could mean a better osteogenesis. However a lower expression of these genes in DPSCs with conditioned medium may depend on: 1) the culture time may be insufficient for the expression of that gene in conditioned medium. This medium is glutamine depleted and cells take longer to grow. 2) the cells may have a suppression in the synthesis of these proteins due to their presence in the conditioned medium.

CONCLUSION: Studies at different times in cell culture are needed to see if there is statistically significant difference between the genetic profile of the DPSCs subjected to osteogenic induction means.

A co-culture of osteoblasts with the patient's dental pulp stem cells favours the differentiation of the stem cells into osteoblasts. This induction could be promoted by its own growth factors secreted by bone cells in culture. These proteins secreted could be applied in regenerative surgery to decrease recovery time, histocompatibility problems, and to minimize the inflammatory response.

The soluble factors released by the implanted cells may play an important role in tissue regeneration by stimulating the resident normal cells at the injured site by a paracrine mechanism. These secreted proteins may also act in an autocrine way on the transplanted cells themselves, promoting their proliferation, self-renewal and the continuity of their functions.



# INTRODUCCIÓN

---

### III. INTRODUCCIÓN

#### ***A. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES:***

EL término de “célula madre” fue propuesto para uso científico por el histólogo ruso Alexander Maksimov en 1909 quien fue el primero en sugerir la existencia de células madre hematopoyéticas (HSC) con la apariencia morfológica de un linfocito, capaces de migrar a través de la sangre a nichos microecológicos que les permitirían proliferar y diferenciarse. (1)

La investigación sobre las células madre surgió de hallazgos por científicos canadienses en la década de 1960. Según su origen, hay dos tipos principales de células madre: las células madre embrionarias (células ES) y células madre postnatales o adultos (células AS). Las células madre embrionarias se obtienen del interior del blastocisto (embrión de etapa temprana, de dos semanas de edad que consta de 50-150 células) de la etapa posterior a mórula. En otras palabras, estas son las células que forman las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo), y que son capaces de desarrollar más de 200 tipos de células. En 1998, la primera línea de células madre embrionarias humanas se llevó a cabo en la universidad de Wisconsin-Madison.(2)

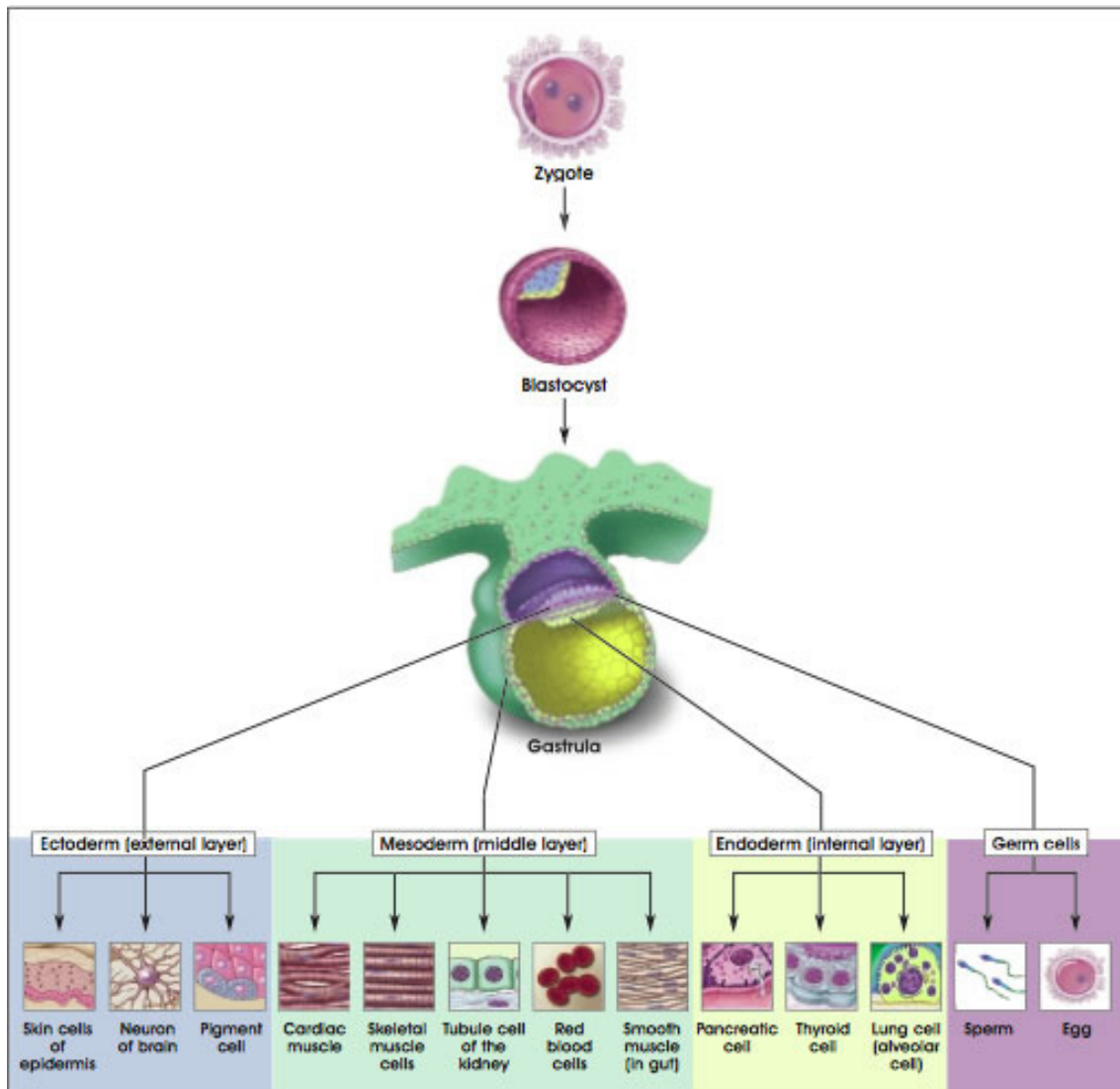


Figura 1: Diferenciación de los tejidos humanos. (©2001 Terese Winslow, Caitlin Duckwall) (3)

Las células madre se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad para diferenciarse como totipotentes, pluripotentes, o multipotentes.

- Las células madre totipotentes son aquellas que pueden ser implantadas en el útero de un animal vivo y dar lugar a un organismo completo.
- Las células madre pluripotentes son aquellas que pueden dar lugar a cada célula de un organismo, excepto sus tejidos extra-embriónicos como la placenta. Esta

limitación impide que las células madre pluripotentes se conviertan en un organismo completo. Las células madre embrionarias (ES) y células madre pluripotentes inducidas (iPS) son células madre pluripotentes.

- Las células madre multipotentes son células madre adultas que sólo generan linajes específicos de células. A este grupo pertenecen las células madre de adultos(4).

La obtención de células madre embrionarias plantea tanto problemas morales como técnicos; debido a que estas células podrán convertirse en un ser humano, por lo que adquirirlas implica la destrucción de un embrión. Técnicamente es difícil controlar el crecimiento de estas células por lo que podrían formar tumores después de su inoculación.

Después de quince años de investigación, en 2010 se aprobó el ensayo fase I y II en pacientes con distrofia macular por parte de la compañía American Cell Tech, pero con resultados aun no concluyentes (5). Las células madre embrionarias siguen siendo una fuente teóricamente potencial de la medicina regenerativa y la sustitución de tejidos después de una lesión o enfermedad por su capacidad de expansión y pluripotencialidad que tienen (6).

Un gran descubrimiento ha sido la generación de iPS a partir de células somáticas. Esto se consigue gracias a la introducción en las células somáticas de 4 genes: Oct-4, Sox2, c-Myc y Klf4. Las iPS han demostrado ser similares a las células madre embrionarias en la morfología, capacidad de proliferación, diferenciación y en genoma (2,7).

Hasta la fecha, las células madre adultas, aunque tienen plasticidad reducida (limitada

capacidad de diferenciarse a tejidos diferentes a los que están destinadas) proporcionan una herramienta prometedora para aplicaciones clínicas debido a su accesibilidad. La posibilidad de uso de estas células en el mismo paciente elimina las dificultades inmunológicas y el riesgo de transmisión de patógenos. Las células madre adultas de origen autólogo son una fuente atractiva y práctica para terapias regenerativas(4).

Alexander Friedenstein en 1970 fue el primero en evidenciar la presencia de una población de células en la médula ósea que no eran hematopoyéticas y que eran capaces de autorrenovarse y diferenciarse a hueso. Posteriormente, se demostró que las células de médula ósea aisladas según la técnica de Friedenstein, también poseían una alta capacidad de proliferación y de diferenciación a tejidos mesenquimales (tejidos que surgen del mesodermo). Por lo tanto, Caplan en 1991 utiliza el término de “células madre mesenquimales” (MSCs) (8).

En resumen, las células madre adultas (también conocidas como células mesenquimales (MSCs *mesenchymal stem cells*)) son células del estroma no hematopoyéticas que residen en un nicho perivascular. Son células adherentes de morfología fibroblastoide con capacidad de diferenciarse a células de origen mesodérmico como son los osteoblastos, condrocitos y adipocitos (9).

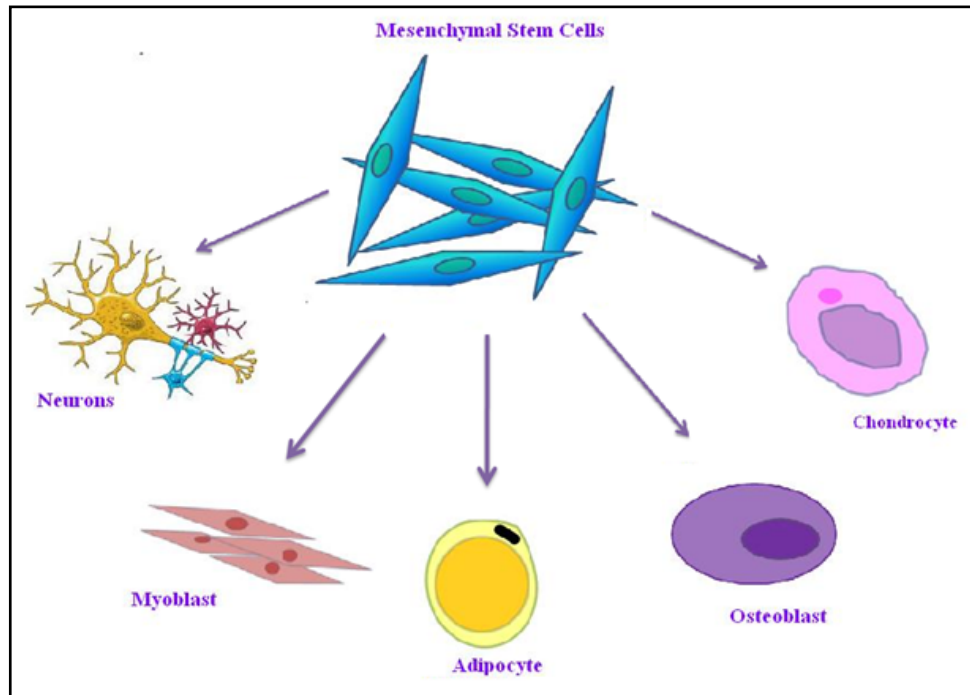


Figura 2: Diferenciación de MSCs (10)

### i) Fuentes de obtención de MSCs:

Las primeras células madre mesenquimales se aislaron de la médula ósea (BM) y aunque es la mayor fuente de células madre, hay otras fuentes de donde pueden obtenerse como tejido adiposo, placenta, páncreas, cerebro, hueso trabecular, pulpa dental, membrana sinovial, sangre periférica, folículo piloso, ligamento periodontal, endometrio, cordón umbilical y sangre del cordón umbilical. (9,11,12)

**Tabla 1: Fuente de células madre mesenquimales**

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| <b>FUENTES DE CÉLULAS<br/>MADRE MESENQUIMALES<br/>(STEM CELLS)</b> | Médula ósea                     |
|  | Tejido adiposo                  |
|  | Placenta                        |
|  | Páncreas                        |
|  | Cerebro                         |
|  | Hueso trabecular                |
|  | Membrana sinovial               |
|  | Sangre periférica               |
|  | Endometrio                      |
|  | Folículo piloso                 |
|  | Cordón umbilical y su<br>sangre |
|  | Hígado                          |
|  | Pulpa dental                    |
|  | Ligamento periodontal           |

Esta amplia distribución de MSCs puede ser explicada por la teoría de que estas células provienen de vasos sanguíneos, por eso están presentes en todos los tejidos del organismo. De esta manera el número de células madre en cada tejido es limitado, no se dividen en circunstancias normales porque están inactivas pero cuando hay una lesión tisular, se dividen y diferencian siendo su principal función la reparación (13).

La obtención de MSCs de la BM presenta limitaciones como es el riesgo en la toma de la muestra así como la capacidad de proliferación y diferenciación de las células según la edad del donante. Por esta razón la obtención de MSCs de fuentes menos invasivas y con mayor capacidad de proliferación como es la pulpa dental, es muy atractiva.

Dependiendo de la fuente de la que se obtenga la célula madre su morfología será más fibroblastoide (como la gran mayoría de las células madre aisladas de médula ósea) o más ovoide. Esto demostraría que el fenotipo de las células depende de su origen. Según Chang YJ et al. (14), las células madre derivadas de cordón umbilical no presentan el marcador de superficie CD90 mientras que en las de médula ósea está presente en todas aunque esto no es concluyente.

Según los estudios pueden nombrarse como células de estroma medular, Unidades Formadoras de colonias Fibroblastoides, Precursores Estromales o células adultas progenitoras multipotentes.

### **ii) Criterios de la ISCT:**

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios para determinar una célula madre mesenquimal:

1. Adherencia al plástico in vitro. Capacidad que no presentan las células madre hematopoyéticas.
2. Inmunofenotipo: expresan los siguientes marcadores de la superficie celular como el CD73, CD90, y CD105 y la ausencia de los marcadores hematopoyéticos como el CD45 (proteína tirosina fosfato receptor tipo C, es un marcador de leucocitos), y CD 34 (marcador celular de progenitores hematopoyéticos y endoteliales), CD14 y CD11b (marcadores de monocitos y macrófagos), CD79a y CD19 (marcadores de células B) y expresión de HLA-DR (complejo de histocompatibilidad).
3. Limitada Plasticidad: Capacidad de diferenciación a tres linajes celulares como

son osteoblastos, condroblastos y adipocitos in vitro bajo condiciones estándar de cultivo (15-17).

Además de lo propuesto por la ISCT, también se debe tener en cuenta dos aspectos adicionales para clasificarlas como células madre: que las MSCs realicen procesos de autorenovación, es decir, durante la división celular solo una de las células hijas debe iniciar programas de diferenciación celular y que sean capaces de desarrollar «plasticidad clonogénica» o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo (neuronas) y endodermo (hepatocitos).

La capacidad de diferenciación y proliferación decrece a medida que aumenta la edad del donante, así como el tiempo en que permanecen las células en cultivo.

Las MSCs tienen la capacidad de “Homing” o anidamiento. Esto consiste en que migran y se acumulan en las zonas del cuerpo donde existe una lesión y por tanto mayor concentración de quimioquinas dado que tienen receptores para éstas.

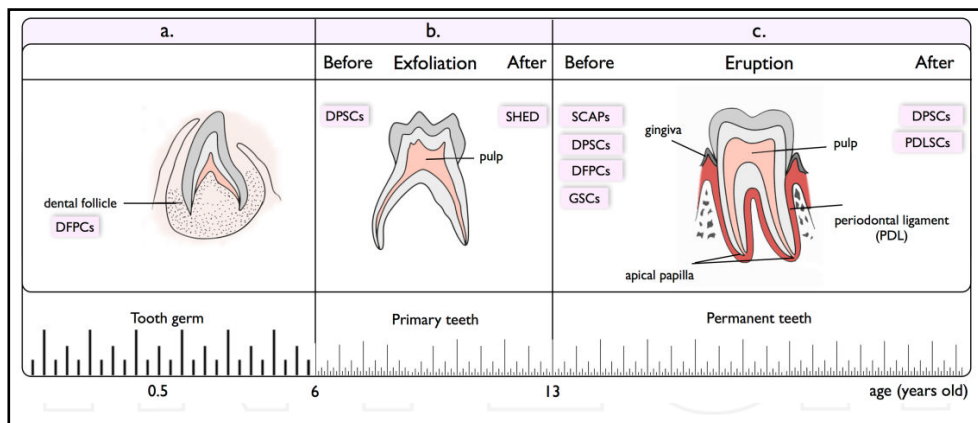
En el año 2012, Shinya Yamanaka y John Gurdon han realizado un excelente trabajo sobre iPSs derivadas de células somáticas adultas. Se propusieron que las células madre de la pulpa dental (DPSCs) pueden desarrollar iPSCs que pueden ser utilizados para las terapias de diversas enfermedades (12).

### **iii) CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL:**

Hasta la fecha, varios tipos de células madre mesenquimales adultas han sido aisladas de los dientes (Mesenchymal dental stem cells (MDSCs)), incluyendo las células madre de la pulpa dental (DPSCs), las células madre de dientes caducifolios (SHEDs), células de ligamento periodontal madre (PDLSCs), células madre progenitoras del folículo

dental o saco pericoronario (DFPCs), y células de la papila apical (SCAPS).

MDSCs son células multipotentes que proliferan extensamente (durante al menos 25 pasajes), pueden ser criopreservadas, poseen propiedades inmunosupresoras, y expresan marcadores mesenquimales. MSDSCs se pueden aislar a partir de cultivos de explantes o digestión enzimática de las muestras.



**Figura 3: Células madre de origen dental. Localización según el estadio de la vida humana (18).**

Las DPSCs fueron descubiertas en el año 2000 por Gronthos et al. (19) quienes las describieron como un nuevo tipo de células madre de pulpa dental humana adulta con la capacidad de diferenciarse en odontoblastos / osteoblastos, adipocitos y células neuronales.

Shi et al. (20) demostraron el potencial de las DPSCs derivadas de la pulpa dental de los terceros molares impactados para regenerar tejidos vivos dentales en vivo.

Las DPSCs tienen un fenotipo de células madre mesenquimales y se diferencian en neuronas, cardiomiocitos, condrocitos, osteoblastos, las células del hígado y las células beta de los islotes del páncreas. Por lo tanto, DPSCs han mostrado un gran potencial para su uso en la medicina regenerativa y el tratamiento de varias enfermedades humanas (12). Hay ensayos clínicos muy prometedores para tratar enfermedades mediante el uso de DPSCs como la diabetes tipo 1, enfermedades neurológicas, enfermedades de inmunodeficiencia y enfermedades de los huesos y cartílagos (19). Se ha demostrado que la diferenciación de DPSCs pueden ser modulada con factores de crecimiento, factores de transcripción, proteínas de matriz extracelular y moléculas de receptores en diferentes tipos de células como odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, cardiomiocitos, células neuronales, adipocitos, células epiteliales de la córnea, células de melanoma y las células beta secretoras de insulina (14).

Los trasplantes de DPSC mezclados con hidroxiapatita/fosfato tricálcico forman de forma ectópica complejos de dentina/pulpa en ratones inmunodeprimidos.

En general, la caracterización de las DPSC en gran medida se basa en el uso de métodos tales como microscopía invertida, citometría de flujo y transcripción inversa PCR para establecer tanto la identidad de células madre y la función.

### **iv) INMUNOFENOTIPO DE CÉLULAS MADRE**

La nomenclatura de CD (cluster of differentiation o grupos de diferenciación) fue concebida para clasificar a los antígenos o marcadores de superficie de los leucocitos en el 1<sup>er</sup> Congreso internacional sobre antígenos de diferenciación en Linfocitos humanos

celebrado en París en 1982.

Antes de este congreso, los antígenos se nombraban según los anticuerpos monoclonales que se unían a ellos. Muchas veces un mismo anticuerpo monoclonal comercializado se unía a varios antígenos por lo que hubo mucha confusión hasta que se llegó a este consenso de clasificación de CD seguida de un número.

De esta manera, los marcadores propuestos para MSCs se dividen en dos:

- Los marcadores más expresados (CD73, CD90 y CD105)
- Los marcadores de estaminidad (capacidad de que una célula funcione como célula madre): son marcadores menos expresados pero que permiten identificar a un subconjunto de MSCs con gran multipotencialidad.

Ambos tipos de marcadores se encuentran en las MSCs derivadas de médula ósea (BM-MSCs) pero no está tan claro si también se encuentran en otros tipos de MSCs (11).

Otros antígenos de superficie generalmente expresados por células mesenquimales son CD13, CD24, CD49 y CD10.

Como se ha mencionado anteriormente, según la ISCT, las células madre presentan los marcadores de superficie CD44, CD73, CD90 y CD105 y carecen de los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 y HLA-DR.

Los diferentes marcadores de membrana o grupos de diferenciación (Cluster of differentiation: CD) se encuentran expresados en la figura 4 agrupados según su función.

| NOMBRE   | MARCADOR DE MEMBRANA |
|--|----------------------|
| <b>Moléculas de adhesión</b>                             |                      |
| ALCAM  | CD66                 |
| ICAM-1   | CD54                 |
| ICAM-2   | CD102                |
| ICAM-3   | CD50                 |
| L-selectina  | CD62L                |
| LFA-3  | CD58                 |
| NCAM   | CD56                 |
| HCAM   | CD44                 |
| VCAM   | CD106                |
| <b>Factores de crecimiento y Receptores de citocinas</b> |                      |
| IL-1 R   | CD121                |
| IL-3 R   | CD123                |
| IL-4 R   | CD124                |
| IL-6 R   | CD126                |
| IL-7 R   | CD127                |
| Interferón $\alpha$ R                                    | CDw119               |
| Factor de Necrosis tumoral $\alpha$ 1 – R                | CD102a               |
| Factor de Necrosis tumoral $\alpha$ 2 – R                | CD102b               |
| Receptor de transferian                                  | CD71                 |
| <b>Integrinas</b>  |                      |
| VLA - $\alpha$ 1   | CD49a                |
| VLA - $\alpha$ 2   | CD49b                |
| VLA - $\alpha$ 3   | CD49c                |
| VLA - $\alpha$ 5   | CD49e                |
| VLA – $\beta$  | CD29                 |
| $\beta$ 4 – integrina                                    | CD104                |
| <b>Marcadores específicos</b>                            |                      |
| Tetraspan  | CD9                  |
| 5' nucleotidasa  | CD73                 |
| Thy – 1  | CD90                 |
| Endoglina  | CD105                |
| MUC-18   | CD146                |
| BST-1  | CD157                |
| <b>Marcadores de matriz extracelular</b>                 |                      |
| Colágeno tipo I, II, IV y V                              |                      |
| Proteoglicanos   |                      |
| Laminina   |                      |
| Hialuronan   |                      |

Figura 4: Proteínas expresadas en las células Madre Mesenquimales (9)

### **1) CD44**

Es una glicoproteína de adhesión celular implicada en las uniones intercelulares y entre la célula y la matriz celular. El principal ligando del CD44 es el ácido hialurónico; pero también se han reportado otros ligandos como el colágeno, osteopontina, laminina y fibronectina. Entre sus funciones se encuentra la de adhesión celular manteniendo la estructura tridimensional de órganos y tejidos y presentación de factores de crecimiento y citoquinas. Se encuentran en los linfocitos T que muestran un aumento de esta glicoproteína cuando se encuentran con su antígeno y está relacionado con la extravasación de estos en las zonas de inflamación. (21)

### **2) CD73**

La Sociedad Internacional de Terapia Celular propone la molécula CD73 o 5' ectonucleotidasa como un marcador de linaje para las MSCs. Ésta es una glicoproteína cuya función biológica consiste en hidrolizar nucleótidos extracelulares para permitir el ingreso de nucleósidos y así generar ATP y GTP como fuente de energía celular en células diferenciadas. No obstante, el papel que juega CD73 en células madre mesenquimales se cree que está más relacionado con mecanismos de adhesión celular ya que se ha encontrado co-expresada con moléculas tipo integrinas, lo que ha postulado a CD73 como un mediador de adhesión celular. El mecanismo de acción del marcador CD73 no es del todo conocido pero recientes estudios revelan una relación con la diferenciación osteoblástica por la vía del receptor de la adenosina (A2AAR y A2BAR) (16,22)

### **3) CD90 ó Thy-1**

También denominada Thy-1 o THYMocyte differentiation antigen 1. Antígeno de superficie para determinar a los precursores de las células T en el timo. Es una proteína cuyo principal ligando es CD45. Se expresa entre el 10-40% de las células CD34 positivas, y en mayor proporción en tejido conectivo y en células del estroma medular y aunque no se conoce su función en células madre mesenquimales, un estudio muestra que si son sometidas a estrés celular mecánico se diferencian hacia células similares a osteoblastos disminuyendo notablemente la expresión de CD90, lo que podría mostrar que este antígeno es un marcador de precursores mesenquimales tempranos que pueden diferenciarse en osteoblastos.

### **4) CD105 o Endoglina**

Es una glicoproteína que forma parte del complejo del receptor del Factor Transformante de Crecimiento- $\beta$  y se expresa en monocitos activados, macrófagos activados, precursores eritroides, fibroblastos, células foliculares dendríticas, melanocitos, células cardiacas, células vasculares de músculo liso, células endoteliales. CD105 interviene en la regulación de distintos componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno razón por la cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular y se sugiere que su expresión en células madre humanas es determinante en la generación de cardiomiocitos (9)

### **5) CD45**

Cluster of differentiation 45 en ingles, pertenece a la familia de las proteínas tirosina fosfatasas cuya función es clave para el control del crecimiento y la división de las

células eucariotas. El CD45 se descubrió de manera fortuita y se expresa exclusivamente en células del sistema hematopoyético. El CD45 es la proteína de superficie mas abundante que hay en los leucocitos. Se encuentra presente en todos ellos: linfocitos expresan altos niveles de CD45, monocitos expresan niveles intermedios de CD45, mientras granulocitos expresan bajos niveles de CD45.

Existen 8 isoformas de CD45, cinco de las cuales son expresadas en células T

CD45 se ha establecido como un componente crítico de la maquinaria de transducción de señales de los linfocitos. En particular, la evidencia de los experimentos genéticos indica que CD45 desempeña un papel fundamental en la proliferación estimulada por antígenos de los linfocitos T y en el desarrollo tímico (23).

### **6) CD34**

Cluster de differentiation 34 en inglés. En una glicoproteína de membrana que es expresada tempranamente por células madre hematopoyéticas. Estas células que se encuentran en médula ósea y cordón umbilical son CD34<sup>+</sup>.

Dentro de sus funciones se encuentra la adhesión de los linfocitos al endotelio vascular de los tejidos linfoides, mejorar la proliferación y el bloqueo de la diferenciación de células madre.

La detección del CD34 se utiliza para cuantificar y purificar células madre progenitoras hematopoyéticas para el trasplante de médula ósea clínica (24).

### **7) CD14**

CD14, uno de los principales marcadores de diferenciación en la superficie de las

células de linaje mieloide (monocitos, macrófagos y células dendríticas). Actúa como clave en la activación de monocitos inducida por la unión a la proteína de unión a lipopolisacárido (LPS). De esta manera el CD14 es un co-receptor de lipopolisacáridos bacterianos y junto con el LPS hace que los monocitos se diferencien.

El CD14 se utiliza como marcador para la detección de células mieloides. (25)

### **8) STRO-1:**

Proteína tipo I que sirve de poro o canal de la membrana celular y que libera las proteínas desde el retículo endoplasmático a la membrana de la célula en respuesta a la reducción de calcio intracelular.

Este marcador puede estar involucrado en la capacidad de clonogenicidad, angiogénesis y reparación cardíaca de algunas células madre. El Stro-1 no está expresado en todas las MSCs:

- Se expresa en MSCs derivados de pulpa dental, de membrana sinovial, de parietalis deciduos y de fibroblastos dérmicos multipotenciales.
- No se expresa o se expresa muy poco en MSCs derivados de sangre periférica, de cordón umbilical, sangre del cordón umbilical y del tejido adiposo.

Las MSCs derivadas de placenta pierden la expresión de Stro-1 al cultivarlas mientras que las MSCs derivadas de médula ósea aumentan la expresión de Stro-1 al cultivarlas.

No está claro si el Stro-1 está relacionado con la multipotencialidad. (11)

STRO-1 es un marcador que se expresa en el desarrollo temprano de dichas células, declinando su expresión cuando genes asociados a la diferenciación y expansión

osteogénica como el Factor de Unión Core A1 (CBFA1 o RUN-X2) interactúa con osteopontina y osteocalcina (9)

Se ha demostrado que el anticuerpo Stro-1 es extremadamente poderoso para identificar células mesenquimales con potencial osteogénico. La tinción de Stro-1 en combinación con la expresión de fosfatasa alcalina en células activadas usando fluorescencia, ha demostrado la presencia temprana de células precursoras osteogénicas Stro-1 positivas y fosfatasa-alcalina negativas. Durante la diferenciación la expresión de Stro-1 se pierde mientras que la de la fosfatasa alcalina aumenta (26).

#### v) INMUNOFENOTIPO DE DPSCs:

Las DPSCs son un tipo de MSCs y por tanto cumplen los criterios de la ISCT en cuanto a los marcadores de superficie. Sin embargo los 15 años de estudio de las DPSCs han proporcionado un perfil de marcadores de superficie que se resumen en la Tabla 2 (27-30)

**Tabla 2: Marcadores de superficie de las DPSCs**

| DPSCs<br>CD (+) | DPSCs<br>CD (-) |
|-----------------|-----------------|
| CD 10           |                 |
| CD 29           |                 |
| CD 44           | CD 14           |
| CD 59           | CD 19           |
| CD 73           | CD 24           |
| CD 90           | CD 34           |
| CD105           | CD 45           |
| CD 106          | HLA-DR          |
| CD 117          |                 |
| CD 146          |                 |

Para detectar estos marcadores de superficie se recurre a la citometría de flujo. Esta

técnica permite mediante ligandos marcados con fluorocromos detectar a través de un software la emisión de dichos fluorocromos al ser excitados por un láser. En la figura 5 se representa el mecanismo

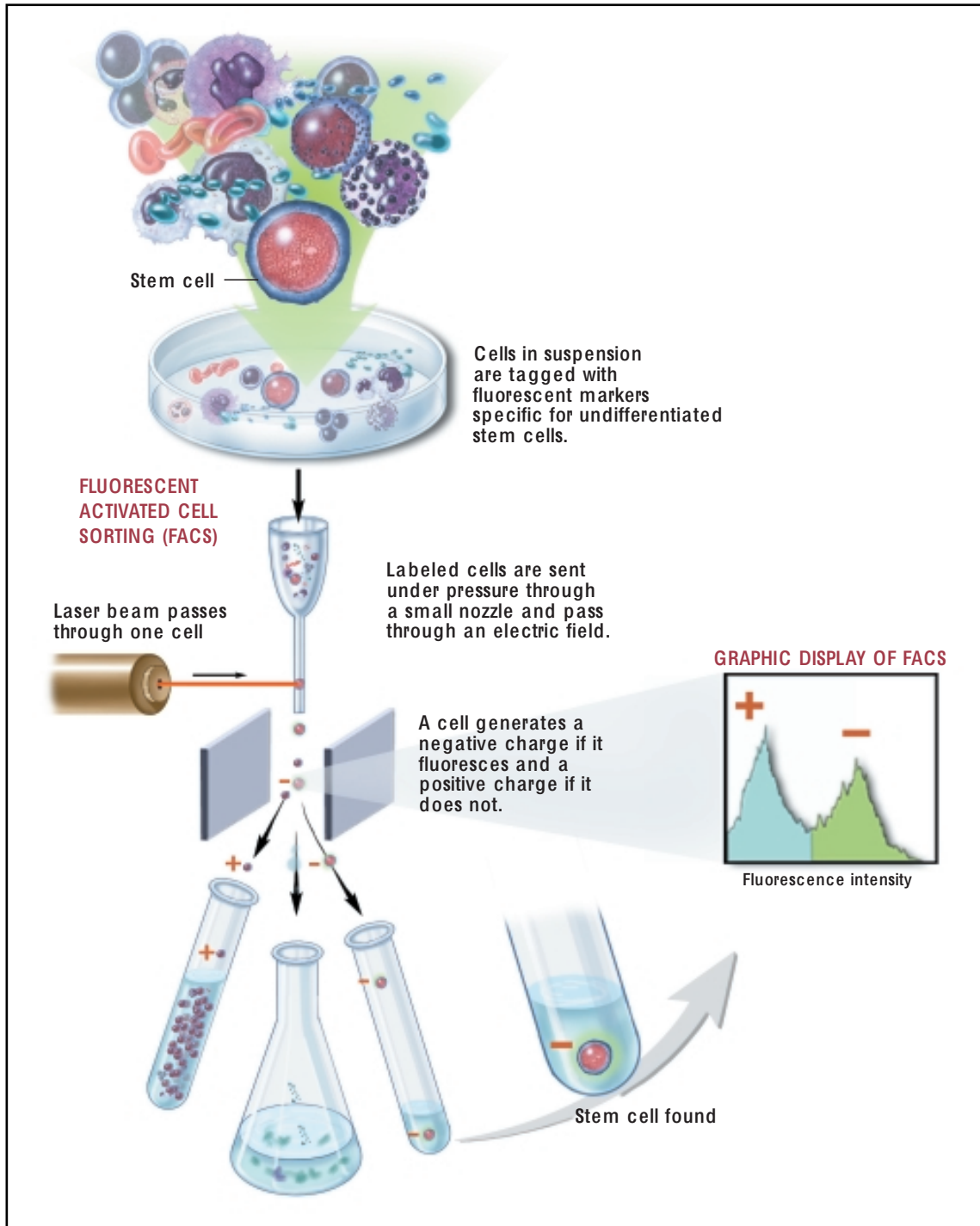


Figura 5: Citómetro de flujo y sorting. (©2001 Terese Winslow, Caitlin Duckwall) (31)

## **B. CÉLULAS ÓSEAS: OSTEOLASTOS**

El hueso es un tejido conectivo especializado que junto con el cartílago, forma el esqueleto humano. Tiene tres funciones principales: mecánica (soporta el cuerpo y es zona de unión de la musculatura), protectora (de los órganos vitales y médula ósea) y metabólica (reserva de iones, especialmente el calcio y el fosfato) (32)

Desde el punto de vista anatómico, en el esqueleto se distinguen dos tipos de hueso: los huesos planos (como los huesos craneales, escápula, mandíbula, ilion...) y los huesos largos (como tibia, fémur, húmero...)

A nivel histológico, el hueso humano está formado por hueso cortical o compacto (el 80% del volumen del hueso) que es quién mantiene la estabilidad mecánica, y el hueso trabecular o esponjoso (20% del volumen de hueso) que es el que responde a las demandas metabólicas.

El hueso cortical constituye la mayor parte de las diáfisis de los huesos largos y la parte externa de todos los huesos del cuerpo. Está organizado por unos conductos de Havers (donde discurren los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios) que se extienden longitudinalmente y alrededor de los cuales se disponen concéntricamente laminillas óseas donde hay pequeños orificios (lagunas u osteoplasmas) en los que se sitúan los osteocitos (33).

El hueso esponjoso se localiza en las epífisis de los huesos largos y en el interior de los huesos planos. En él, no hay osteonas, sino que las laminillas óseas se distribuyen de forma irregular creando tabiques que se denominan trabéculas. Entre trabécula y trabécula hay médula ósea. Dentro de estos tabiques se encuentran los osteocitos dentro

de sus lagunas mientras que en la superficie de las trabéculas se encuentran los osteoblastos y los osteoclastos.

Estos tres tipos de células óseas se encuentran en el propio tejido óseo embebidas o en el estroma conjuntivo de la médula ósea. En este estroma se hayan también las MSCs (34-36).

### **i) DESCRIPCIÓN DEL OSTEOLASTO**

Citológicamente son células grandes de 20-30µm poliédricas de citoplasma basófilo y retículo endoplasmático rugoso y grande. La membrana plasmática se caracteriza por ser rica en fosfatasa alcalina y por poseer receptores para la hormona paratiroidea (PTH), esteroides, estrógenos, 1.25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (vitamina D) (37).

Proceden de células mesenquimales de médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares (36).

Los osteoblastos y osteocitos se ponen en contacto mediante pedículos citoplasmáticos comunicándose por la proteína transmembrana (o integrina) Conexina 43, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas.

Los osteoblastos tienen 5 funciones: sintetizar la matriz osteoide 2-3 µm/día (proteínas colágenas y no colágenas); dirigir la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular; expresar la enzima fosfatasa alcalina (ALP) que permite la mineralización de esa matriz osteoide a un ritmo de 1- 2 µm/día; mediar la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y sintetizar factores de crecimiento.

La vida media de un osteoblasto es de 1-10 semanas, después pueden sufrir apoptosis o transformarse en células de revestimiento o limitantes (bone lining cells) o un 15% en osteocitos. Las células limitantes son elongadas y se disponen a lo largo del endostio para crear una capa protectora que juega un papel importante en el remodelado óseo.

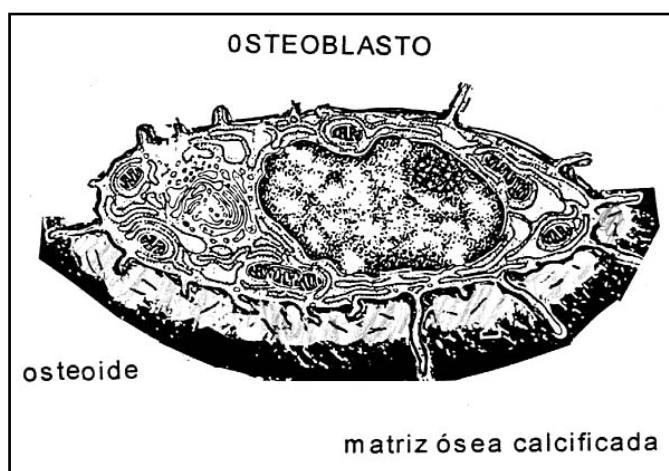


Figura 6: Osteoblasto (31)

Los osteoblastos tienen capacidad de sintetizar colágeno tipo I (95% del colágeno de la matriz ósea), osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea, osteocalcina y actividad fosfatasa alcalina así como respuesta a hormonas y a factores de crecimiento.

## ii) MARCADORES DE OSTEÓBLASTOS

Estudios del 2002 en la Universidad de Granada, Reyes Botella y cols (38) mostraron que los osteoblastos cultivados humanos se caracterizan por un fenotipo antigénico inusual que consiste en una combinación de antígenos de diferente linaje celular. Se comprobó que estas células expresan CD10, CD44, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR positivo.

El CD10 es una endopeptidasa neutra. El CD54 es una molécula de adhesión.

En 2006 se llevó a cabo otro estudio (39) que utilizó osteoblastos in vivo incluidos en parafina y no cultivados en medio de cultivo con suero fetal bovino ya que la presencia de ciertas biomoléculas en este suero puede modular la expresión antigénica comprometiendo los resultados, concluyó con una intensa positividad para CD10, CD44 y los antígenos fosfatasa alcalina. Así pues según se observa en la Tabla 3 se consideraron CD10, CD44 y fosfatasa alcalina para ser antígenos constitutivos y la expresión de CD54, CD80 y HLA-DR no constitutiva (39).

**Tabla 3: Antígenos específicos de Osteoblastos según estudio de García-Martínez et al (39)**

| <b>Marcador de superficie</b>  | <b>Intensidad del marcaje con Anticuerpos</b> | <b>% de células positivas</b> |
|--|---|-------------------------------|
| CD10   | ++  | 90-100                        |
| CD44   | +   | 90-100                        |
| CD54   | +/-   | 20-40                         |
| CD80   | -/+   | 10-20                         |
| HLA-DR   | -/+   | 10-20                         |
| ALPL   | +   | 90-100                        |
| La intensidad (-): negative; (-/+): débil; (+): moderado y (++) : fuerte |   |                               |

Sin embargo hay estudios de 2013 y 2014 de Manzano Moreno y cols (40,41) que estudian la variación de expresión de antígenos de superficie de los osteoblastos al uso del láser de diodo de baja intensidad o a la presencia de bifosfonatos con nitrógenos. En estos estudios se valoraba el siguiente perfil antigénico del osteoblasto CD54, CD80, CD86, HLA-DR.

### **iii) EXPRESIÓN GÉNICA DE OSTEÓBLASTOS**

El perfil genético de los osteoblastos viene marcado por los genes que codifican a las principales proteínas que sintetizan y que son propias de estas células. Estos genes son: ALPL (fosfatasa alcalina), BGLAP (osteocalcina), RUNX2 (CBFA1 o factor de transcripción asociado a Runt), COL1A1 (Gen que codifica la síntesis de colágeno tipo I), SPP1 (Osteopontina), BMP2 (proteína morfogenética ósea 2) y BMP7 (proteína morfogenética ósea 7)

#### **1) Fosfatasa Alcalina:**

Enzima que libera fosfato inorgánico. Sintetizado por osteoblastos, es un buen indicador de actividad de los mismos. Se encuentra generalmente adherida en la superficie extracelular de la membrana celular mediante un anclaje a través del terminal carboxilo del fosfatidilinositol-glicano. Existen en forma general dos tipos de fosfatasa alcalina codificadas por 4 genes diferentes. El primer tipo está constituido por la fosfatasa tejido-dependiente, expresada en el intestino y placenta madura y la fosfatasa no dependiente del tejido (*tissue non-specific*) la cual es expresada en numerosos tejidos, incluyendo principalmente el hueso, hígado y riñones. La fosfatasa alcalina es un indicador precoz de la diferenciación osteoblástica y juega un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular. La función de la fosfatasa alcalina es hidrolizar el fósforo orgánico y liberar fósforo inorgánico para la formación de la hidroxiapatita del hueso. Este enzima es indispensable para la formación del hueso, y su secreción o actividad indica la formación de hueso o el inicio de la etapa de diferenciación.

#### **2) Osteocalcina:**

También llamada *bone Gla-protein (BGLAP)*, es una proteína de bajo peso molecular de 49 aminoácidos, específica del hueso y dentina que supone el 20% de las proteínas no colágenas de la matriz ósea. Tiene un aminoácido derivado del ácido glutámico (que se modifica en presencia de vitamina K) llamado *Gamma-carboxyglutamic acid (gla)*. Es sintetizada por osteoblastos y plaquetas, dependiente de vitamina K y estimulada por la presencia de vitamina D. Cuando hay concentraciones fisiológicas de calcio, los residuos gla hacen que se una con la hidroxiapatita favoreciéndose la mineralización (42). Sus niveles plasmáticos indican la osteogénesis y actividad y número de los osteoblastos. La osteocalcina contiene 3 residuos de ácido gammacarboxiglutámico (Gla), requeridos para la unión con el  $\text{Ca}^{2+}$ , y es una de las proteínas de la matriz ósea más estudiadas. Su expresión está altamente restringida al tejido óseo, específicamente a las regiones destinadas a la mineralización. No sólo es sintetizada por los osteoblastos maduros, sino también por los odontoblastos y condrocitos hipertróficos y participa en los procesos de regeneración del hueso. Es una proteína altamente conservada entre las especies vertebradas. Se piensa que marcador tardío de la diferenciación y adquiere sus máximos niveles de expresión durante el período de mineralización.

### **3) RUNX2**

La proteína RUNX2, es también conocida como CBFA1 (core-binding factor subunit alpha-1). En humanos está codificado por el gen RUNX2. E

Es un factor de transcripción óseo homólogo a la proteína Runt de la *Drosophila*. Esta proteína es esencial para la diferenciación de los osteoblastos a partir de

MSCs.

Runx2 puede estimular directamente la transcripción de genes relacionados con osteoblastos tales como los que codifican la osteocalcina, colágeno tipo I, y la colagenasa 3. La presencia de la proteína RUNX2 precede en varios días a la diferenciación osteoblástica y a la producción de osteocalcina por lo que hay un desfase entre la expresión de esta proteína y las consecuentes que estimula.

Los mismo puede ocurrir en el cultivo primario de osteoblastos en los cuales sí podremos encontrar una buena expresión génica de proteínas como la osteocalcina, fosfatasa alcalina y sialoproteína ósea y sin embargo poca expresión inicial de RUNX2 (43).

#### **4) COL1A1**

Gen que codifica el colágeno tipo I. El colágeno tipo I es la forma más abundante de colágeno en el cuerpo humano.

Su mutación está relacionada con la osteogénesis imperfecta tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV, osteoporosis y síndrome de Ehlers-Danlos. (44)

#### **5) OSTEOPONTINA**

Proteína que pertenece a las llamadas también SIBLING small integrin-binding ligand, N-linked Glycoprotein, **Proteínas con el Tripeptido RGD (Arg-Gly-Asp)**. Son 5: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Este tripéptido es reconocido por las integrinas de los osteoclastos

provocando la solubilización de las proteínas.

### **6) BMPs (bone morphogenetic proteins):**

Grupo de 15 proteínas que están incluidas en la familia de los TGF- $\beta$  capaces de transformar tejido conectivo en tejido óseo, es decir, son osteoinductivas. Estimulan la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). *Son los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica.* In vivo, son capaces de estimular la formación ectópica de hueso (45).

- **BMP-1 a 7:** Se hallan en tejidos humanos. La BMP 2,3 y 4 son expresadas por los osteoblastos que se diferencian.
- **BMP-2 exógena** mejora la mineralización ósea in vitro y es responsable de las etapas finales de la diferenciación celular ósea y la formación de hueso mineralizado normal (45).
- **BMP-2 y BMP-7 son osteoinductivas.** Están autorizadas para uso clínico por la FDA (Foods and Drugs Administration)

Las BMPs tienen receptores de superficie celular análogos a la serotonina/trionina quinasa lo que fosforila intracelularmente a un número de proteínas finales como las Smad 1, 5, 8 y Factor de crecimiento transformante TGF $\beta$  quinasa activada 1 (TAK1) que permite una mejor diferenciación de osteoblastos (26,46).

Las BMPs se han aislado repetidamente en el desarrollo embrionario de los

dientes, la iniciación, morfogénesis y la secreción de matriz. Seis diferentes BMPs (BMP2-BMP7) fueron coexpresadas temporal y espacialmente en cultivos de células de la pulpa dental. BMPs se han aplicado con éxito para la regeneración del tejido periodontal. (2)

### **C. CULTIVO CELULAR:**

Desde hace años se demostró que las células podían extraerse de los tejidos y proliferar *in vitro* en condiciones de esterilidad rigurosa. Para ello había que reproducir en laboratorio las condiciones físicas (pH, osmolaridad), necesidades nutritivas (aminoácidos, purinas y pirimidinas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, coenzimas y sales) factores de crecimiento y medios de defensa contra las infecciones. Era importantísimo reproducir y mantener los valores exactos de estos requerimientos pero no se conocían. Por eso, el primer medio de cultivo fue el suero salino u otros líquidos biológicos pero hacían fallar el cultivo porque los nutrientes que había en ellos eran muy difíciles de controlar. De ahí que se empezaran a comercializar medios de cultivo definidos químicamente. Una evolución más en el cultivo celular es la de introducir en los medios de cultivo factores de crecimiento. Sin embargo estos factores son difíciles de aislar, actúan normalmente en colaboración con otros factores e interaccionan con otros nutrientes.

Los cultivos celulares han permitido un estudio minucioso de los fenómenos celulares. Permiten obtener cantidades suficientes de poblaciones de células homogéneas de manera reproducible, por lo que se pueden utilizar como modelos en el estudio de los mecanismos celulares. Pueden realizarse estudios sobre metabolismo celular, control de crecimiento, mecanismos moleculares de diferenciación,

requerimientos nutritivos, análisis clonal de los descendientes individuales de cada célula...

Las diferencias de comportamiento que puede exhibir un mismo tipo celular *in vivo* e *in vitro* hacen que no puedan extrapolarse sin más los resultados obtenidos *in vitro* a la situación real *in vivo*.

Los principales tipos de técnicas para cultivos animales son tres: en medios semisólidos, en monocapa y en suspensión.

### **i) Cultivo primario de Osteoblastos**

Con los primeros trabajos de Peck y cols en 1964 se reconoció la posibilidad de aislar y cultivar células óseas. (47)

*Mills* y colaboradores en 1979 fueron los primeros en describir el aislamiento de células humanas derivadas de hueso y posteriormente otros grupos describieron los métodos para el aislamiento de células óseas humanas con fenotipo osteoblástico específico. *Beresford* y colaboradores en 1986 demostraron que las células que crecían a partir de fragmentos de hueso trabecular desarrollaban un fenotipo osteoblástico. La expresión génica de algunos marcadores osteoblásticos en las células derivadas de hueso, se comparó con la expresión génica en fibroblastos de la piel y se encontraron grandes diferencias. De esta manera, las células derivadas de hueso trabecular tenían elevados niveles de actividad fosfatasa alcalina (ALP) y secretaban osteocalcina en los sobrenadantes celulares (48). *Robey* y *Termin* en 1985 usaron un nuevo método de aislamiento celular basado en un pretratamiento con colagenasa de los explantes óseos para eliminar todas las células, menos las situadas de forma adyacente al hueso. Con

este método se pretendía obtener líneas osteoblásticas más puras. (49,50)

## **ii) Líneas celulares derivadas de tumores óseos**

Otras líneas celulares que también se han empleado en investigación han sido obtenidas de osteosarcoma (51), que es un tumor formador de hueso y se ha visto que muchas líneas celulares derivadas de osteosarcoma son capaces de mantener su capacidad osteogénica al inyectarlas en animales y de mantener las características osteoblásticas en cultivo celular. Una característica importante que no ocurre en el tejido normal es que estas células pueden diferenciarse y seguir teniendo capacidad proliferativa. Aún así, esto no excluye que pueda expresarse la anomalía cromosómica. Con los avances en biología celular, se ha conseguido immortalizar líneas celulares sanas con un fenotipo deseado.

Se han obtenidos líneas celulares como la TE-85, la MG-63 y la SaOS-2. La MG-63 es una línea celular de osteosarcoma humano adquiridas en la ATCC (*American Type Culture Collection*), referencia CRL-1427.

## **D. METODOS DE CULTIVO DE LOS OSTEBLASTOS**

Según la bibliografía (44), hay tres medios de cultivo para la proliferación de células mesenquimales y su diferenciación a osteoblastos o para cerciorarnos que las células cultivadas sean osteoblastos (52):

- Medio reconstituído compuesto por alfa-MEM al que se le añade 100 nM dexametasona, 10 mM beta-glicerofosfato, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 0.25 µg/ml anfotericina B y suero fetal bobino al 15% (16). Es un medio de mantenimiento para que las células se expandan pero sin

diferenciarse.

- Medio diferenciación osteogénica: los hay de diferentes casas comerciales (NH OsteoDiff Medium de Miltenyi Biotec, Promocell de Labclinic, Lonza de Cultek...). Los medios de diferenciación osteogénica están suplementados con ácido ascórbico, glicerofosfato y dexametasona.
- Los medios condicionados: Sustratos en los que previamente se ha cultivado células ya diferenciadas que liberan al medio factores solubles activos de tal manera que al retirar dichas células queda un medio en el que posteriormente se cultivará otro tipo celular distinto al original.

### ***E. FACTORES QUE ESTIMULAN LA DIFERENCIACIÓN***

Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* evidencian una relación inversamente proporcional entre la diferenciación de células madre a osteoblastos frente a la diferenciación a adipocitos. (46)

Los factores implicados en la estimulación de la diferenciación de osteoblastos para formar osteoblastos maduros no han sido claramente definidos. *In vitro*, las BMPs son los agentes con mayor poder de diferenciación aunque también se han utilizado otros agentes como el ácido ascórbico, la dexametasona, el  $\beta$ -glicerofosfato, ión fluoruro, 1,25 hidroxivitamina D<sub>3</sub> y ácido retinoico. (45,53)

El **ácido ascórbico o vitamina C** induce la síntesis de colágeno tipo I en varios tipos de tejido conectivo tanto por osteoblastos como condrocitos. Esta vitamina estimula la producción extracelular de colágeno por un aumento de la secreción del procolágeno tipo I y la estabilización del RNA mensajero. Tiene capacidad de inducir la

diferenciación osteoblástica en células osteogénicas.

La **dexametasona** es un glucocorticoide sintético que es osteoinductivo y favorece la diferenciación osteoblástica de células mesenquimales de médula ósea. Evita la proliferación celular, favoreciendo la diferenciación o maduración incrementando la expresión de fosfatasa alcalina y la formación de nódulos de mineralización. (53) El rango de concentración de dexametasona requerida para la formación de tejido óseo in vitro es del  $10^{-9}$  M a  $10^{-7}$ M

El  **$\beta$ -glicerofosfato** es añadido al medio como una fuente de fosfato orgánico, que facilita el proceso de mineralización de la matriz ósea. Mientras que la concentración del DMEM se encuentra en un rango fisiológico. (52)

El hueso que se forma al añadir  $\beta$  –glicerofosfato a las células cultivadas es histológicamente y estructuralmente normal siempre y cuando la concentración del  $\beta$ -glicerofosfato sea menor a 3mmol/L. (45)

Recientemente se ha comprobado el papel de **17 $\beta$ -estradiol** en la actividad cementoblastica. Un estudio in vitro con fibroblastos procedentes de pulpa mostraron una mayor actividad de fosfatasa alcalina y formación de nódulos de mineralización cuando se añadió 17 $\beta$ -estradiol al medio de cultivo celular. (54)

## ***F. METABOLITOS o FACTORES SOLUBLES DE LOS***

### ***OSTEOBLASTOS***

En el cultivo de osteoblastos, en su crecimiento, estas células segregan diferentes metabolitos entre los que se encuentran: FGF (Fibroblast growth factor o factor de

crecimiento fibroblástico,) TGT- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), BMPs, VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) y HO-1 (hemo-oxigenasa 1). De gran relevancia es este último factor.

La HO-1 es la enzima limitante de la velocidad en la degradación del hemo, que cataliza la escisión del anillo de hemo para formar hierro ferroso, monóxido de carbono (CO) y biliverdina. HO-1 tiene fuertes implicaciones en la médula ósea en la diferenciación de células madre. Estudios recientes han demostrado que el VEGF puede activar la expresión de HO-1, también se ha demostrado que aumenta la concentración de HO-1 durante la diferenciación de las células madre a osteoblastos. Además, la sobreexpresión de HO-1 aumenta dicha diferenciación.

A pesar de la ausencia de receptores de VEGF en las células madre mesenquimales adultas humanas, VEGF-A puede estimular los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), regulando de este modo la migración y la proliferación de las BM-MSK. Estudios han confirmado que el VEGF es un potente factor en la proliferación de BM-MSK, y facilita la presencia de BMP4 y BMP7 secretadas durante la osteogénesis. La inhibición de la síntesis y función de VEGF por un oligonucleótido antisentido y por suramina, ha detenido la actividad de la fosfatasa alcalina inducida por BMP-7 y la formación de nódulos de hueso mineralizado. Estudios con ratones en el Hospital Universitario de Soochow, China, en 2014 revelaron que el VEGF puede promover la proliferación de BM-MSK, y regular al alza los niveles de ARNm de genes como osterix, Runx2 y la fosfatasa alcalina y osteocalcina, y regular a la baja los niveles de mRNA de los genes PPAR- $\gamma$  y / EBP  $\alpha$ -C en BM-MSKs lo que se traduce en la activación de la osteogénesis y la represión de la adipogénesis. Los osteoblastos que

carecen del gen VHL (Enfermedad de Von Hippel Lindau) puede producir y secretar un gran número de VEGF, y promover la proliferación y diferenciación de los osteoblastos.

Por lo tanto, existe la hipótesis de que el VEGF sintetizada y secretada por los osteoblastos puede inducir de manera paracrina la expresión de HO-1 en BMSCs, y promover su proliferación y diferenciación.

La expresión de HO-1 se incrementa durante la diferenciación de células madre a osteoblastos, y este aumento de HO-1 precede a un aumento de mRNA para la fosfatasa alcalina, la proteína morfogenética ósea, osteonectina, y el RUNX-2 (55-62).

Mundy et al en 1999 y Armour et al en 2001 con sus estudios con roedores, demostraron que eNOS (sintasa endotelial de óxido nítrico) es una enzima expresada en osteoblastos que, cuando es deficiente, conduce a una reducción significativa en la formación de hueso. Tanto eNOS y NO (óxido nítrico) son estimuladores de BMP-2 y aumentan la diferenciación de los osteoblastos según estos estudios en ratones (63,64).

# JUSTIFICACIÓN

---

## IV. JUSTIFICACIÓN:

Los estudios *in vitro* son ideales para la observación y el análisis de una determinada línea celular bajo condiciones específicas ya que los cultivos celulares no cuentan con el gran número de variables presentes en un estudio *in vivo*.

El trasplante de células madre adultas se emplea en distintos campos de la medicina como en la regeneración cardíaca, cirugía ortopédica y traumatología. La terapia celular avoga por impulsar la capacidad regenerativa del propio organismo disminuyendo el uso de materiales artificiales.

Existe la hipótesis de que factores solubles liberados por las células implantadas desempeñen una acción paracrina en la regeneración de los tejidos estimulando a las células normales residentes en el sitio afectado. Estos productos solubles pueden también actuar de forma autocrina, sobre las propias células trasplantadas que los secretan, modulando su biología y favoreciendo su autorrenovación, proliferación y sus funciones (65).

El uso clínico de las MSCs o de sus factores solubles es muy prometedor en los campos de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. En el campo odontológico, implicarían una mejora en los tratamientos de regeneración ósea y una reducción del tiempo de recuperación tras tratamientos implantológicos.

El fin de esta Tesis Doctoral es corroborar si los factores de crecimiento secretados al medio por los osteoblastos en cultivo favorecen y pueden ser empleados en la diferenciación celular de las células madre a osteoblastos.

La detección de los metabolitos secretados al medio por parte de los osteoblastos abrirá

un nuevo abanico de posibilidades en cuanto a la regeneración ósea de un paciente sin la necesidad de recurrir a xenoinjertos ni sustitutos óseos y favorecerá la que este proceso biológico concluya en menor tiempo.

# OBJETIVOS

---

## V. HIPÓTESIS NULA. OBJETIVOS DEL ENSAYO:

Se ha llevado a cabo numerosos estudios en cuanto al cultivo de osteoblastos y células mesenquimales así como el estudio de sus marcadores para corroborar su diferenciación hacia los primeros pero se han encontrado escasos estudios in vitro que comparen las variaciones en el perfil de expresión genético de células madre al ser sometidas a un medio de cultivo condicionado específico comercializado y a un medio de cultivo condicionado obtenido de osteoblastos cultivados previamente.

Se busca rechazar la siguiente **hipótesis nula ( $H_0$ )**: Hay diferencias entre el perfil de expresión genético de células madre de pulpa dental sometidas medio de cultivo condicionado comercializado y entre el perfil de las células madre de pulpa dental sometidas a medio de cultivo condicionado de osteoblastos. La presencia de determinados metabolitos liberados por el cultivo de osteoblastos y su uso para el cultivo de células mesenquimales, no induce la diferenciación de éstas a osteoblastos.

Así pues, nuestra **hipótesis alternativa o de trabajo ( $H_1$ )** consiste en determinar que no hay diferencia significativa entre los perfiles de expresión genéticos en las DPSCs cultivadas con medio de inducción osteogénico comercializado (Miltenyi®) y las DPSCs cultivadas con medio condicionado obtenido de cultivo de osteoblastos. Para confirmar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- A. Obtener una línea celular de osteoblastos (cultivo primario) y caracterizarla según su inmunofenotipo por citometría de flujo.
- B. Obtener una línea celular de DPSCs y caracterizarla según su inmunofenotipo por citometría de flujo
- C. Determinar el perfil de expresión genética de cada población mediante PCR antes de cultivar las DPSCs a medios de cultivo condicionados.
- D. Determinar el perfil de expresión genética de las DPSCs tras ser cultivadas con diferentes medios de cultivo condicionados (comercializado y obtenido de osteoblastos).

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS:**

El estudio se realizó *in vitro* mediante el cultivo de líneas celulares. La línea celular osteoblástica se obtuvo mediante una muestra tomada de pacientes voluntarios, tanto hombres como mujeres, con un rango de edad entre 18 y 30 años de una población de personas que acudían a consulta del Departamento de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid solicitando extracción de cordales. La línea celular de células madre de pulpa dental se obtuvo de los cordales de pacientes voluntarios, tanto hombres como mujeres, con un rango de edad entre 18 y 60 años que acudieron o fueron derivados a la clínica de la Universidad solicitando extracción de cordales.

A todos los pacientes se les informó de la sistemática del estudio y firmaron el correspondiente documento de consentimiento informado(ver anexo 1).

### ***A. Criterios de inclusión:***

- Características clínicas:
  - Pacientes mayores de 18 años comprendidos entre 18 y 30 años de edad
  - Pacientes con necesidad de extracción de cordales
  
- Características geográficas y temporales: pacientes que acudan a la Clínica del

Master de Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid demandando extracción de cordales en un periodo de 4 meses.

### ***B. Criterios de exclusión:***

Se excluirán a aquellos pacientes que:

- Con patologías sistémicas u orales que requieran tratamiento más oportuno y urgente que el entregado como parte del estudio.
- Enfermedad sistémica no controlada o no tratada: HTA, Diabetes no controlada, Anticoagulantes no controlados
- Sinusitis aguda.
- Disminución de la capacidad de regeneración ósea: Osteoporosis, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo y Menopausia.
- Sean fumadores, porque el tabaco se ha visto que disminuye la osteogénesis.
- Embarazadas.

### ***C. Diseño experimental:***

Es un tipo de estudio preclínico. Se evaluaron las características morfológicas por microscopio invertido, se determinó el inmunofenotipo por citometría de flujo, se caracterizaron por su diferenciación a los tres linajes osteoblásticos por histoquímica y la expresión genética mediante PCR de las poblaciones celulares (células madre de pulpa dental y osteoblastos). Teniendo en cuenta estas características previas, se

sometieron los cultivos a protocolos de inducción adipogénica y osteogénica mediante el uso de medios de cultivo de específicos comercializados y protocolos de inducción osteogénica mediante medio de cultivo condicionado secretado por los propios osteoblastos en cultivo. Pasados 3 semanas, se volvió a realizar el estudio por PCR de la expresión genética para hacer una comparativa con respecto a los valores primarios.

#### ***D. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:***

La cavidad bucal se lava con clorhexidina 0,2% durante un minuto para reducir la flora microbiana, posteriormente se tomó una muestra del hueso del paciente mediante una trefina previo en la osteotomía previa a la extracción de un cordal. En el caso del cordal, la extracción de dicho diente fué sin odontosección para que no hubiera contaminación de la pulpa. Dichas muestras tomadas en quirófano se depositaron en solución de Hank o medio de cultivo DMEM con antibiótico a 4°C en recipientes de plástico estériles y procesadas en las siguientes 4 horas. De esta manera tuvimos diferentes grupos de estudio:

- grupo 0 (osteoblastos obtenidos de maxilar con trefina),
- grupo FM (hueso adherido a un cordal durante su extracción),
- grupo FT (hueso extraído del trígono retromolar en la osteotomía previa a la extracción del cordal)
- grupo LB (pulpa dental de cordales incluidos)

### ***E. OBTENCIÓN DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS:***

La obtención de células osteoblásticas se realizó según el método de **Nacher y col, 1994**, variación de la metodología empleada por Marie en 1989. Una vez obtenida la muestra de hueso, se separó el hueso trabecular del cortical y de la médula ósea de forma macroscópica mediante material quirúrgico estéril bajo la campana de flujo laminar. El hueso trabecular se cortó en fragmentos de 1y 2mm (explantes). Estos explantes o fragmentos se lavaron 3 veces con una solución tampón fosfato (PBS: Phosphate buffered Saline Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, NaCl 150mM, pH 7.4) estéril para eliminar células hematopoyéticas y adherentes de la médula ósea. Así, la superficie del hueso trabecular quedó expuesta. Posteriormente, se añadió a un falcon con 10ml de colagenasa tipo I filtrada (1mg/ml de colagenasa constituida con PBS) y se introdujeron en una estufa a 37°C durante 30 minutos mientras se agitaba. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se añadió 10ml de cultivo Dulbecco's modified Eagle's médium (Lonza BioWhittaker®): DMEM (4500mg/l de glucosa); suplementado con glutamina (2mM), penicilina (100UI/ml), estreptomycin (100UI/ml) y con un 15% de suero bovino fetal (FCS, fetal calf serum). Se cultivó todo en frasco de 25 cm<sup>2</sup> (T-25) o en placas Petri de 10cm de diámetro. Este suero fetal bovino al 15%, provee a las células de factores de crecimiento. De esta manera, las únicas células que quedaron en estos fragmentos óseos son los osteocitos dentro de las trabéculas (antiguos osteoblastos en fase terminal) posibles osteoblastos y osteoclastos activos unidos a superficies óseas remanes (que estaban realizando su función de reabsorción versus formación en las zonas de remodelado óseo), células estromales y células mesenquimatosas y precursores de osteoblastos en diferentes etapas de diferenciación presentes en el endostio.

Por esta razón, un cultivo primario de células osteoblásticas nunca podemos decir que es puro donde todas las células que lo formen sean la misma estirpe celular. Es un cultivo de osteoblastos con una fracción de algunos de otros tipos celulares. Es importante minimizar la contaminación por fibroblastos que procedan de tejidos colindantes al hueso puesto que es una célula que prolifera más que el osteoblasto.

Durante el cultivo, los osteocitos no migran de su posición dentro de las trabéculas porque no tienen capacidad proliferativa por lo que no ocupan la superficie de la placa petri y sufrirán muerte celular. Los osteoclastos presentes en zonas de remodelado óseo, no proliferan y pierden su actividad no interfiriendo en el cultivo. Si en éste se ve algún osteoclasto es fruto de la diferenciación a partir de células mesenquimales que no hayan sido eliminadas en el lavado inicial previo al cultivo celular. En gran medida se puede afirmar que la mayoría de las células que forman el cultivo primario provienen de células mesenquimales precursoras de osteoblastos presentes en el endostio. Estas células precursoras pueden estar ya marcadas para la formación específica de osteoblastos o estar en fases precoces de diferenciación celular. Las primeras migran y forman la monocapa de células en la superficie de la placa. Las segundas podrían formar cualquier tipo celular derivado de células mesenquimales y se diferencian a osteoblasto bajo el estímulo de factores locales como el FGF, BMPs, las proteínas Wnt y también factores de transcripción Runx2/Cbfa1 y Osterix. Aunque estas células precursoras formaran otros tipos celulares como los adipocitos o las células musculares, estas no proliferarían porque necesitan un medio de cultivo con requerimientos diferentes. De esta manera, los únicos tipos celulares que podrían formarse serían los osteoblastos o fibroblastos porque sus requerimientos son muy parecidos. Algunos autores suplementan el medio de cultivo con ácido ascórbico que favorece la

diferenciación celular.

Para minimizar la contaminación por otros tipos celulares, algunos autores incorporan a su protocolo de cultivo el uso de colagenasa para digerir el tejido conectivo presente. Sin embargo según estudios, esta digestión enzimática puede alterar la integridad de las células y enlentecer la migración celular y no se ha visto diferencia con respecto a cultivos celulares sin el uso de la colagenasa. (66)

La problemática de la contaminación por fibroblastos consiste en que morfológicamente son muy difíciles de diferenciar con respecto a los osteoblastos por lo que es necesaria la caracterización celular para corroborar la pureza del cultivo (inmunofenotipo determinado por citometría de flujo y caracterización por histoquímica)

Estas placas Petri o frasco de T-25 se incubaron a 37 °C y un 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda (95%). Las células sin capacidad de adhesión, se eliminaron en los sucesivos cambios del medio de cultivo. Una vez empezó la incubación, no se cambiaron los medios de cultivo en una semana puesto que es lo que tardan los osteoblastos humanos de migrar del explante a la placa Petri. A partir de una semana, el medio de cultivo se fué cambiando cada 2 o 3 días (2 veces por semana) en condiciones estériles bajo la campana de flujo laminar. En una semana, aproximadamente, se visualizó la migración de células adherentes sobre la placa Petri. En unos 10 días, se consiguió una monocapa de células que tapizaban casi el 90% de la superficie de la placa Petri (CULTIVO PRIMARIO). Se procedió a lavarse abundantemente con PBS estéril y posteriormente tratarse con 2ml de tripsina al 0.25%/ EDTA 0.2% (Ácido etilendiaminotetraacético sin calcio ni magnesio) (Imperial, U.K.) durante 5 minutos a 37°C en agitación para

despegar la capa de células. Para neutralizar a la tripsina se añadió nuevo DMEM reconstituido con micropipeta estéril. No se centrifugó sino que se agitó y se subcultivó en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (T-75). En 3 días se cambió el medio porque ya estaban adheridas al plástico y así nos asegurábamos que no había nada de tripsina.

El trabajar con un subcultivo a partir del cultivo primario, conlleva minimizar el crecimiento de otros tipos celulares presentes en el cultivo primario. Por eso se suelen hacer tres pases antes de empezar a trabajar con las células. Así se trabaja con una muestra celular mucho más homogénea. Sin embargo requieren de un periodo de latencia antes de empezar de nuevo su ciclo celular, un proceso de adaptación.

En el tercer pase celular, se despegaron las células con tripsina. Esta tripsina se eliminó de la suspensión celular centrifugando a 4 minutos a 1200rpm a 4°C y eliminando el sobrenadante. El precipitado formado por las células, se resuspendió en un volumen de DMEM para realizar un test de viabilidad.

La viabilidad de las mismas se comprobó mediante el test de exclusión (tinción vital) con azul tripan al 0.05% (67). Este método se basa en el principio de que las células vivas (viables) no dejan entrar el colorante dentro de la célula mientras que las células muertas tienen la membrana citoplasmática desestructurada o rota y dejan pasar el colorante dentro de ellas.

Se preparó el mismo volumen de la solución de Trypan blue que de células a testar y se añadió a éstas. Pasados 15 minutos de incubación se realizó el contaje de número de

células no teñidas (viables) en un hemocitómetro (una cámara de Neubauer). Esta cámara tiene un objetivo de 10 aumentos (microscopía óptica) que efectúa el recuento de células en un área de  $1\text{mm}^2$  definida por las triples líneas paralelas de la cámara.

(66)

### ***F. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE PULPA DENTAL***

Tras la extracción del cordal sin odontosección, se bañó el mismo en clorhexidina 0.2% durante 5 minutos. A posteriori se lavó con PBS para eliminar los restos de clorhexidina. Se procedió a la fractura mediante presión en medio aséptico entre gasas estériles y dentro de una bolsa de exploración estéril.

Posteriormente y bajo la campana de flujo laminar se extrajo la pulpa dentaria con cucharilla de black esterilizada. Se lavó la pulpa en una placa Petri con solución de Hanks y se fragmentó con una hoja de bisturí y/o agujas.

Se depositó en un tubo Falcon con 10ml de Hank's con colagenasa tipo IA (Sigma, St. Louis, MO, USA). La proporción fue de 10 mg de colagenasa en polvo por 10ml de PBS en un tubo falcon y después filtrada con filtro biológico 2mm antes de añadirlo a la pulpa fragmentada. Se digirió con colagenasa tipo I para generar suspensiones de células individuales.

Se introdujo en un baño termoestabilizado en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora y posteriormente se procedió a su centrifugado a 1800 r.p.m durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$

El sedimento se redisolvió en 5ml de DMEM reconstituido. No se despreció ese sobrenadante porque contenía células despegadas.

Se sembró el sedimento recogido en placa T75 con su DMEM reconstituído. Este frasco se incubó en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C

Los clones comenzaron crecer a las 48 horas aproximadamente. Se cambió el medio cada 72 horas.

A los 15 días aproximadamente (cuando a través de microscopio invertido se vió un amplio crecimiento de células) se procedió al levantamiento de las mismas por tripsinizado y al cambio de medio. Pasando del primer pase al segundo pase y así hasta el tercer pase en el que al llegar al 90% de confluencia se despegaron y se realizó el test de viabilidad y su contabilización por hemocitómetro.

## ***G. CARACTERIZACIÓN DE OSTEOLASTOS Y CÉLULAS***

### ***MADRE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO***

La citometría de flujo se realizó usando FACSCalibur (BD Biosciences, EE.UU.) de acuerdo con los estudios de Karao et al (68).

Una cantidad de  $20 \times 10^3$  células fueron incubadas (15 minutos a temperatura ambiente) con los anticuerpos para los antígenos humanos CD11b FITC, CD14 FITC, CD20 FITC, CD44 FITC, CD45 FITC, CD80 FITC, CD90 FITC, HLA-DR FITC, CD34 PE, CD66a/c/e PE, CD73 PE, CD117 PE, CD29 APC, CD59 APC, CD 105 APC, Control FITC, Control PE, Control APC. Los anticuerpos pertenecían a la casa comercial BD Bioscience.

Los fluorocromos usados fueron marcadores fluorescentes de unión covalente como el

FITC (isocianato de fluoresceína, también llamado FL1) con un canal de fluorescencia verde, PE (ficoeritrina, también llamado FL2) con un canal de fluorescencia amarilla y APC (aloficocianina, también llamado FL4) con un canal de fluorescencia roja.

Luego las células fueron lavadas dos veces con PBS (1800 rpm durante 5 minutos) y finalmente resuspendidas en 200µl de PBS para realizar la lectura del Inmunofenotipo en el citómetro de flujo (FacsCalibur, BD) en el que previamente se determinó el canal de lectura correspondiente a la luz emitida (verde, amarilla y roja). Este citómetro de flujo funciona con la combinación de dos láseres, de argón y de diodo y puede medir hasta 4 fluorescencias.

Mediante el uso del programa de análisis Penta Gate (BD), se determinó el *side-scatter* (dispersion lateral de la luz emitida, que indica la granulosidad o complejidad de las células y por tanto la homogeneidad o no de la muestra) y el *forward-scatter* (dispersion frontal de la luz emitida hacia el haz del laser y que es proporcional al tamaño celular). A partir de esta región celular seleccionada, se realizaron diferentes histogramas en logaritmo decimal para calcular la intensidad de fluorescencia en relación con el número de células para cada uno de los antígenos de interés a través de las herramientas estadísticas ofrecidas por el programa de análisis. La población positiva fué identificada como células que expresaban niveles específicos de la actividad fluorescente frente a la autofluorescencia no específica de los isotipos controles.

Se necesitan controles negativos para descartar unión inespecífica del fluorocromo y seleccionar el umbral de autofluorescencia. Son causas de tinción inespecífica los fragmentos inmunoglobulinas aunque no sean específicas (por su fragmento Fc), las células muertas y los restos celulares.

Se registró la media (mean) como la media geométrica (geo mean) tanto como el número de eventos (células) medidos.

## ***H. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS POR HISTOQUÍMICA***

Se fijaron los pocillos con formol al 10% y luego se evaluó la posible diferenciación a las tres estirpes celulares.

Para caracterizar osteoblastos se utilizó la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (KIT- 104 de Sigma) y la presencia de depósitos minerales mediante el kit de tinción fluorescente para Hidroxiapatita (Osteomalge, LONZA mineralization assay PA-1503)

Para caracterizar los adipocitos se utilizó Red Oil que es una tinción específica para marcaje de células adiposas.

Para caracterizar los condrocitos se utilizó el azul alcian.

## ***I. PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE OSTEOLASTOS Y CELULAS MADRE MEDIANTE PCR***

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) permite detectar determinadas secuencias de ADN de una célula. Para ello se utilizan kits comercializado y primers específicos de cada gen a analizar, es decir, una muestra exacta del gen a determinar.

Técnicamente consiste en realizar el proceso de transcripción que ocurre en cada célula pero a la inversa (Figura 7 ). De esta manera, partiendo de RNAm se obtiene un DNAc (una cadena de DNA complementario) y por ultimo el DNA del gen a estudiar.

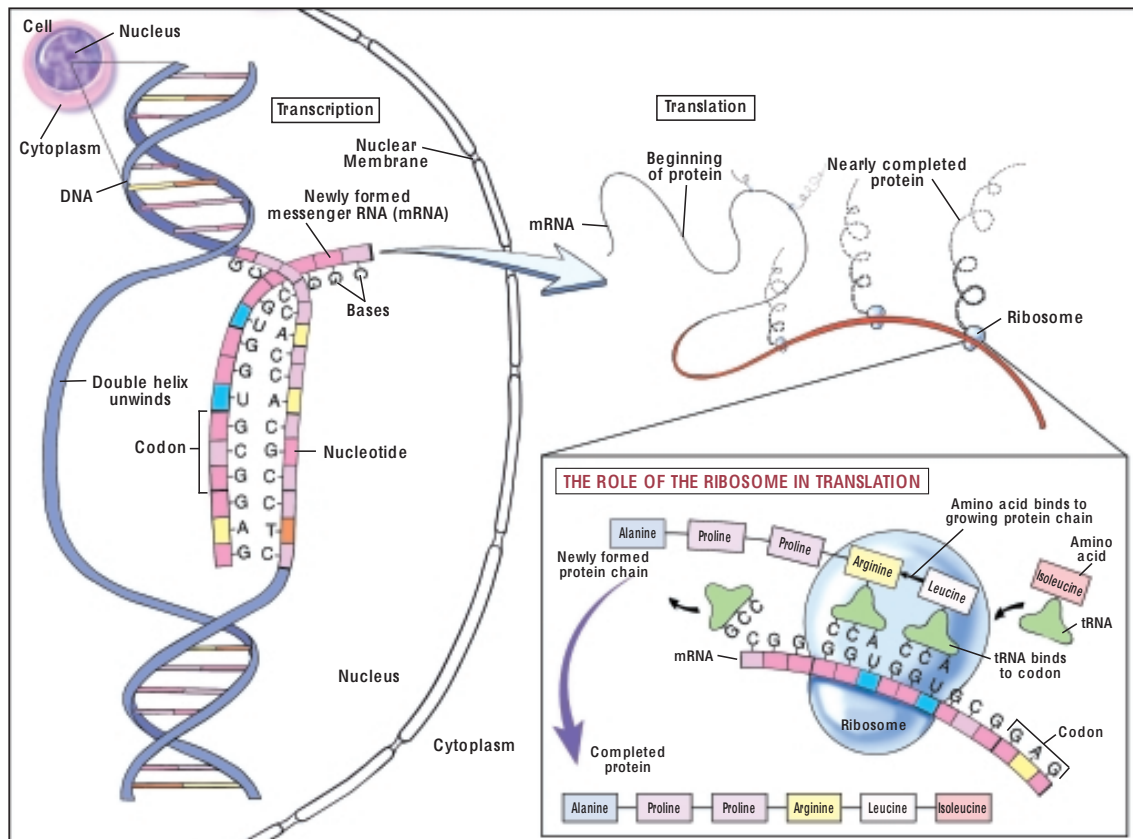


Figura 7: Síntesis de proteínas. (©2001 Terese Winslow, Caitlin Duckwall) (69)

## i) LISADO y OBTENCIÓN RNAm PARA PCR

Para poder extraer el RNAm presente en las células hay que lissarlas y seguir el protocolo de purificación de RNA según la casa comercial.

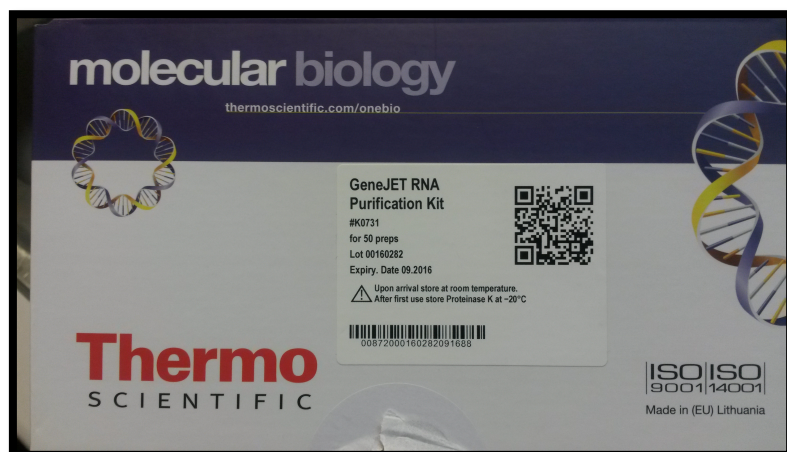
En el análisis primario del perfil genético teníamos 4 poblaciones de células, tres de hueso y una de pulpa dental. Cada población celular se identificó con siglas.

- GRUPO FM: hueso adherido a un molar
- GRUPO 0: hueso de alrededor de un implante explantado

- GRUPO LB: pulpa dental
- GRUPO FT: hueso de trígono molar

En el análisis secundario tras la inducción osteogénica de las DPSCs por medios de cultivo condicionado y medio de inducción osteogénica (LONZA) teníamos 6 poblaciones celulares ya que tanto el grupo control como los grupos inducidos estaban duplicados:

- Grupo Pulpa control S
- Grupo Pulpa S medio condicionado
- Grupo Pulpa S con medio de diferenciación osteogénica (LONZA)
- Grupo Pulpa LB control
- Grupo Pulpa LB medio condicionado
- Grupo Pulpa LB con medio de diferenciación osteogénica (LONZA)



**Figura 8: Kit para obtener RNA de Thermo Scientific**

Cada población se encontraba en un falcon con DMEM. Cada falcon se centrifugó y se recogió el pellet que se trató con un kit para extracción de RNA mensajero (Figura 8 Thermo Scientific) mediante el siguiente protocolo: (a) se añadió 600µl de buffer de lisis con 360 µl de etanol; (b) se vibró; (c) se agitó con micropipeta; (d) se recogieron 700µl y se depositaron en un “spin column” o columna de centrifugación con una columna de hidroxapatita que retiene el RNA por cargas; (e) se centrifugó 1minuto a 12000g; (f) se despreció el sobrenadante de debajo de la columna; (g) se puso el resto de los 700µl de la solución preparada y se volvió a centrifugar 1min 12000g; (h) se despreció el sobrenadante de debajo de la columna; (i) se añadió el buffer 1 que llevaba etanol y se centrifugó a 12000g 1min y se despreció otra vez el sobrenadante de debajo de la columna; (j) se añadió el buffer 2 y se centrifugó a 12000g 1min y se despreció el sobrenadante; (k) se volvió a añadir el buffer 2 y se centrifugó 2 minutos y se despreció el sobrenadante; (l) se introdujeron las columnas en 100µl de agua purificada cada uno en su vial y se centrifugó a 12000g durante 1 minuto; (m) se despreciaron las columnas puesto que el RNA ya había quedado disuelto en el agua (figura 9,10 y 11).

Posteriormente se cuantificó la cantidad de RNAm había en cada µl.





Figura 10: Buffer, Buffer 1 y Buffer 2 para la obtención de RNAm



Figura 11: Centrifugadora

## ii) CUANTIFICADOR

Un cuantificador es un instrumento que se basa en la absorbencia que tiene una gota de la solución problema cuando pasa un haz de luz. Va unido a un software (programa NanoDrop 1000 V360. Figura 12) que según el parámetro que se elija determina el peso de las partículas por cada  $\mu\text{l}$  de solución. Se eligió el parámetro de ácidos nucleicos en el programa. El resultado que nos proporciona el cuantificador son ng (nanogramos) de RNA por cada  $\mu\text{l}$  de solución

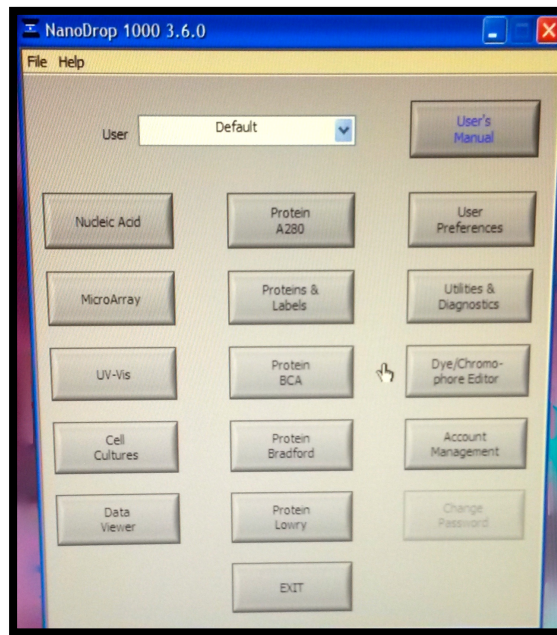


Figura 12: Software NanoDrop 1000 V360

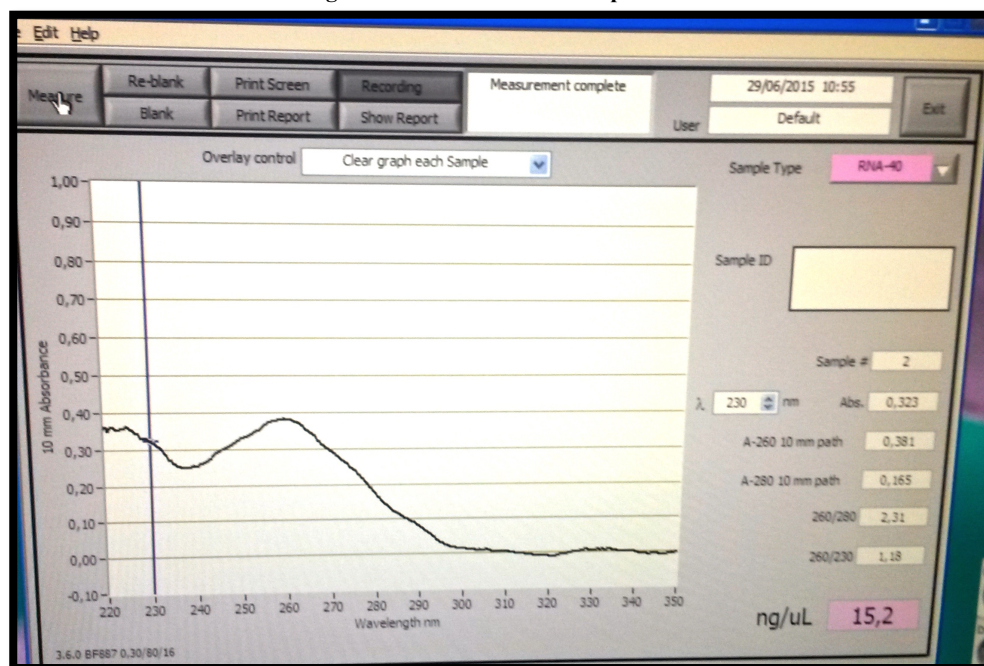


Figura 13. Cuantificación de una muestra de la cantidad de ácidos nucleídos por cada  $\mu\text{m}$

### iii) TRANSCRIPCIÓN INVERSA:

La transcripción inversa consiste en la síntesis de ADN complementario (monocatenario) por la enzima transcriptasa inversa usando el ARNm como molde

De esta manera, a partir del RNA mensajero que había en cada célula, se transcribió a cDNA (DNA complementario) que es de una sola hebra y más estable. Para esta reacción necesitábamos enzima transcriptasa inversa, primers (específicos del gen que queremos localizar) y bases nitrogenadas.

Se creó un master mix que para añadir a las soluciones de ARNm que contenía agua purificada, la transcriptasa, los primers específicos de cada gen y los nucleótidos.

La proporción de master mix era 1:1 con respecto a la solución de ARN que queríamos transcribir.

Según la casa comercial para obtener cDNA es necesario partir de 2 µg de mRNA, por lo tanto, se calculó el volumen de muestra necesario para obtener 2 µg finales de mRNA en la mezcla de reacción. Esto nos aseguraba tener la misma cantidad de cDNA en cada reacción independientemente de si en cada muestra teníamos más población celular y por tanto más RNAm. Al haber hecho la cuantificación previa, es sencillo calcular la cantidad necesaria para obtener estos 2µg. Se mezcló la misma cantidad de master mix que de volumen de cada muestra y los viales se introdujeron en un termociclador de tiempo final (que sólo se ve la cuantificación al final mediante un gel). La secuencia del termociclador fue 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C (momento en que la transcriptasa se desnaturaliza perdiendo su función), 4°C para mantener los ácidos nucleicos a la espera de la realización de la PCR.

De este proceso se obtuvo 1 hebra de DNA complementario que es más estable y de ahí se añadirán los cebadores específicos de cada gen que queremos detectar si está.

#### **iv) PASO DE cDNA A DOBLE HÉLICE Y PCR**

Se analizaron las muestras para 9 reactivos: ALPL (fosfatasa alcalina), BGLAP (osteocalcina), RUNX2 (CBFA1 o factor de transcripción asociado a Runt), COL1A1 (Gen que codifica la síntesis de colágeno tipo I), SPP1 (Osteopontina), BMP2, BMP7, ACTB (Actina Beta) y GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)

Los dos últimos reactivos son genes house-keeping genes (HK), es decir, genes internos que suelen estar involucrados en funciones básicas en la supervivencia celular por lo que se expresan en todas las células y nos sirven de control. El gen ACTB está implicado en la síntesis de las proteínas actinas para formar el citoesqueleto celular y el gen GAPDH sintetiza una enzima implicada en la glucólisis. De esta manera se hace una cuantificación relativa del gen de estudio respecto a uno de estos genes house-keeping. Es una PCR a tiempo real semicuantitativa.

Todos los reactivos comercializados son sondas de oligonucleótidos específicos de cada gen.

Tabla 4. Primers específicos de cada gen que queremos analizar. Facilitados por la casa comercial

| OSTEOGENESIS RELATED GENES            |   |                             |                        |                                  |
|---------------------------------------|---|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|
| <b>ALPL</b><br>Forward:<br>Reverse:   | <b>Primers</b><br>TCTTCACATTTGGTGGATAC<br>ATGGAGACATTCTCTCGTTC  | <b>GeneSymbol</b><br>ALPL   | <b>Gene ID</b><br>249  | <b>RefSeq ID</b><br>NM_000478    |
| <b>BGLAP</b><br>Forward:<br>Reverse:  | <b>Primers</b><br>TTCTTTCCTCTTCCCCTTG<br>CCTCTTCTGGAGTTTATTGG   | <b>GeneSymbol</b><br>BGLAP  | <b>Gene ID</b><br>632  | <b>RefSeq ID</b><br>NM_199173    |
| <b>RUNX2</b><br>Forward:<br>Reverse:  | <b>Primers</b><br>AAGCTTGATGACTCTAAACC<br>TCTGTAATCTGACTCTGTCC  | <b>GeneSymbol</b><br>RUNX2  | <b>Gene ID</b><br>860  | <b>RefSeq ID</b><br>NM_001015051 |
| <b>COL1A1</b><br>Forward:<br>Reverse: | <b>Primers</b><br>GCTATGATGAGAAATCAACCG<br>TCATCTCCATTCTTTCCAGG | <b>GeneSymbol</b><br>COL1A1 | <b>Gene ID</b><br>1277 | <b>RefSeq ID</b><br>NM_000088    |
| <b>SPP1</b><br>Forward:<br>Reverse:   | <b>Primers</b><br>GACCAAGGAAAACCTCACTAC<br>CTGTTTAACTGGTATGGCAC | <b>GeneSymbol</b><br>SPP1   | <b>Gene ID</b><br>6696 | <b>RefSeq ID</b><br>NM_001251829 |
| <b>BMP2</b><br>Forward:<br>Reverse:   | <b>Primers</b><br>TCCACCATGAAGAAATCTTTG<br>TAATTCGGTGATGGAAACTG | <b>GeneSymbol</b><br>BMP2   | <b>Gene ID</b><br>650  | <b>RefSeq ID</b><br>NM_001200    |
| <b>BMP7</b><br>Forward:<br>Reverse:   | <b>Primers</b><br>TGGTCCACTTCATCAACC<br>TTCTGTATTCTTCAGGATGAC   | <b>GeneSymbol</b><br>BMP7   | <b>Gene ID</b><br>655  | <b>RefSeq ID</b><br>NM_001719    |
| HOUSEKEEPING GENES                    |   |                             |                        |                                  |
| <b>ACTB</b><br>Forward:<br>Reverse:   | <b>Primers</b><br>GACGACATGGAGAAAATCTG<br>ATGATCTGGGTCATCTTCTC  | <b>GeneSymbol</b><br>ACTB   | <b>Gene ID</b><br>60   | <b>RefSeq ID</b><br>NM_001101    |
| <b>GAPDH</b><br>Forward:<br>Reverse:  | <b>Primers</b><br>ACAGTTGCCATGTAGACC<br>TTTTTGGTTGACACAGG       | <b>GeneSymbol</b><br>GAPDH  | <b>Gene ID</b><br>2597 | <b>RefSeq ID</b><br>NM_002046    |



Figura 14: 9 viales con los primers de los genes a analizar y los 4 viales con las muestras.

De la misma manera que anteriormente se ajustaron las cantidades de la muestra necesarias para conseguir la cantidad de mRNA viable, se volvió a ajustar la fórmula para obtener la cantidad de cDNA necesario para PCR.

Siguiendo el protocolo del fabricante del kit de PCR, se preparó un volumen de reacción que incluía cDNA del grupo a estudiar; forward primer (cebador) y reverse primer específicos de cada gen según se muestran en la tabla 4; fluoróforo específico para DNA bicatenario (Sybr-Green I), polimerasa y agua purificada completando el volumen.

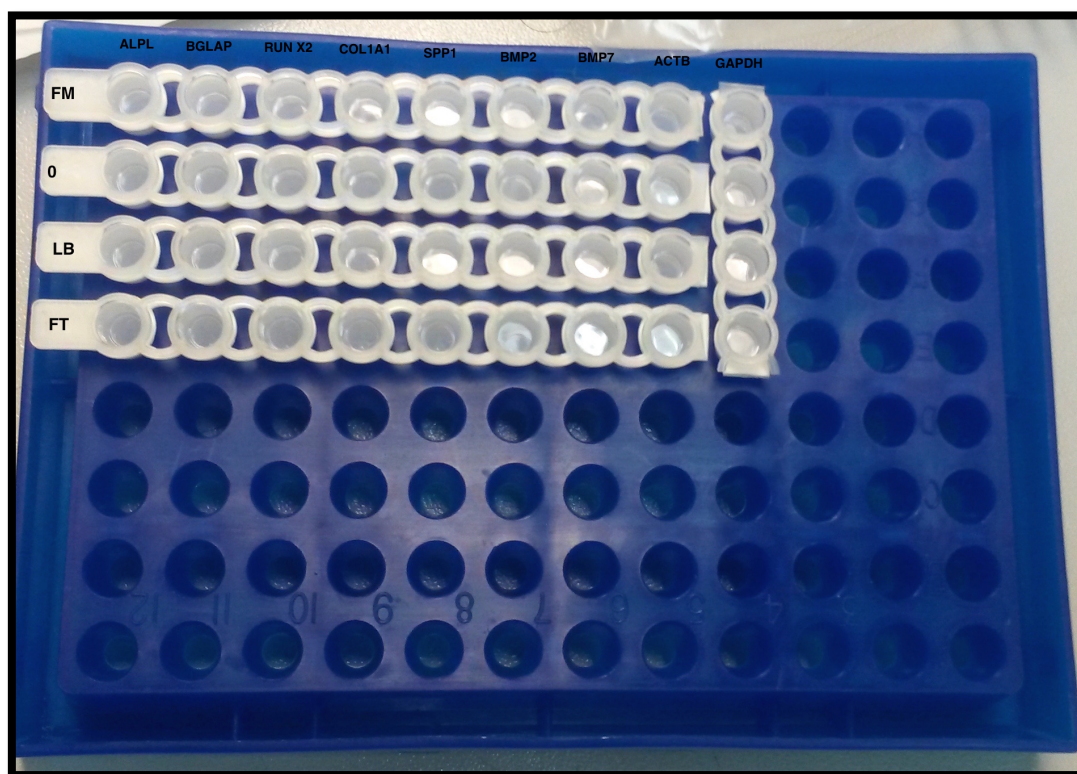


Figura 15: Los 36 viales una vez preparados para PCR.

Una vez puestos todos los aditivos en los viales, se agitaron, mezclaron y centrifugaron a 1500rpm 5 min 22°C

Estas mezclas se introdujeron en un termociclador para medir fluorescencia y que detecta el sybr-green I. Este fluoróforo es el más utilizado en PCR y aumenta su fluorescencia 1000 veces al unirse al surco menor del DNA bicatenario.

Los pasos de la PCR se muestran en la Tabla 5

**Tabla 5: Ciclos del termociclador para la polimerasa.**

|   |  |
|---|--|
| <b>Paso 1:</b>                            | 95 °C 10 min. Desnaturalización inicial para que la enzima comience  |
| <b>Paso 2:</b><br>40 ciclos<br>(40 veces) | 95°C 15 seg. Desnaturalización de las hebras   |
|   | 60°C 30 seg hibridación (unión de hebras)<br>Annealing   |
|   | 72°C 15 seg extensión amplificada por la polimerasa  |
| <b>Paso 3</b>                             | curva de melting para verificar la especificidad e identidad. Sube y baja temperatura bruscamente para controlar si los clones son estables. |

La fluorescencia cuando hay hibridación es detectable por el software que genera unas curvas de fluorescencia en función del ciclo umbral (Ct).

El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base (Figura 16-17). Dicho de otro modo, se construye un gráfico de la cantidad de señal frente al número de ciclo

(tiempo). Este gráfico se construye en escala semilogarítmica.

Cuanto mayor es la cantidad inicial de DNA genómico, antes se detecta el producto acumulado en el proceso de la PCR y más bajo es el valor de Ct.

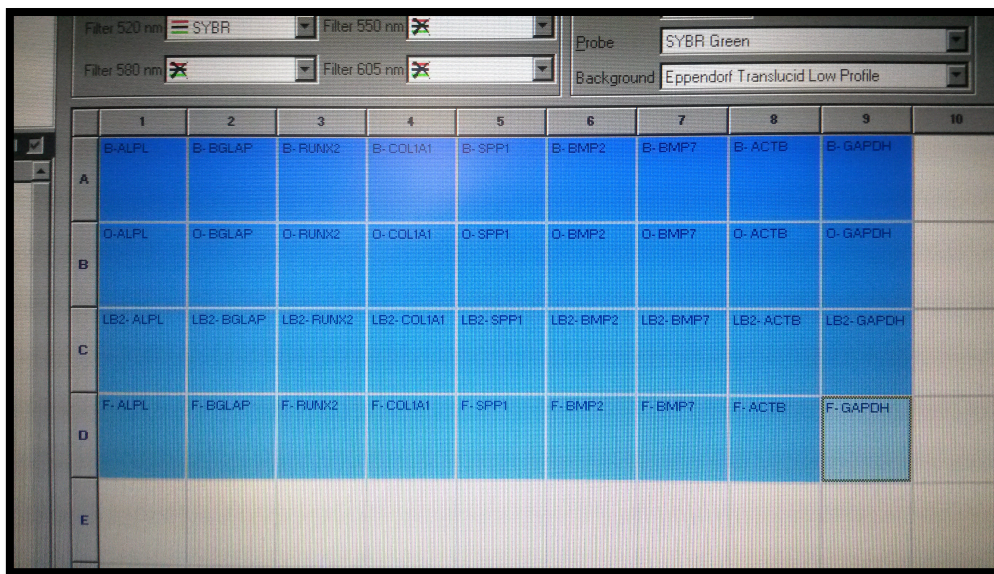


Figura 16: Introducción de los datos en el programa Mastercycler ep realplexde.

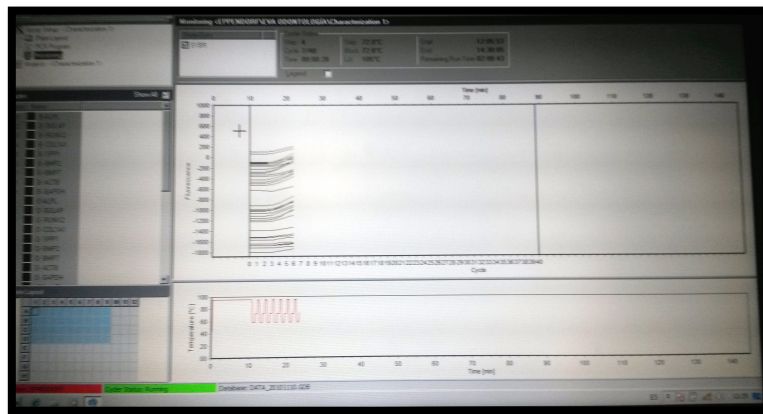


Figura 17: Curvas de fluorescencia que se van generando según la muestra va pasando por los diferentes ciclos.

## ***J. INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA Y OSTEOGÉNICA DE DPSCs***

Una vez caracterizadas las células según su inmunofenotipo, tinciones histoquímicas y determinada su expresión genética previa, se eligieron dos grupos para llevar a cabo los protocolos de inducción: el grupo FM (osteoblastos) que sirvieron para proveer del medio de cultivo condicionado; y el grupo LB (células mesenquimales) que se cultivaron con medios de cultivo de inducción comercializados (adipogénico y osteogénico) y el medio de cultivo condicionado.

En una placa petri y en un T75 se cultivaron los osteoblastos procedentes del grupo FM con medio DMEM. Pasado dos días este medio rico en factores solubles secretados por los osteoblastos, se separó en un falcon y se conservó a 4°C durante 2 días mínimo para garantizar la no presencia de ninguna célula.

En 6 placas petri y un multiwell del que se utilizaron 16 pocillos (4 filas de 4 pocillos), se sembraron las DPSCs del grupo LB (figura 18).

La primera fila del multiwell era la fila control junto con otras dos placas petri y cuyo medio de cultivo fue el Alpha MEM (Lonza, USA) reconstituido con 15% SFB, 1% penicilina y estreptomina, 0.5% glutamina y cambiándose 2 veces por semana.

La segunda fila del multiwell junto con otras dos placas petri siguió el protocolo de inducción adipogénico mediante la adición alterna de medio de cultivo adipogénico comercializado (Adipogenic Induction Medium de Lonza, USA. Figura 19) y medio de cultivo adiposo de mantenimiento comercializado (hMSC Adipogenic Maintenance SingleQuots<sup>®</sup> de Lonza, USA. Figura 19). Estos medios se cambiaban 2 veces por

semana de manera alterna. Gotas de lípidos intracelulares indicaron diferenciación adipogénica y se confirmaron mediante tinción con Oil Red O.

La tercera fila del multiwell junto con otras dos placas petri fue la utilizada para añadir el medio de cultivo condicionado obtenido del cultivo de osteoblastos (conservado previamente a 4°C mínimo 48h. para evitar la presencia de algún tipo celular) y cambiado 2 veces por semana.

La cuarta fila del multiwell junto con otras dos placas petri siguió el protocolo de inducción osteogénico mediante la adición de medio de cultivo osteogénico comercializado (hMSC Osteogenic SingleQuots<sup>®</sup> de Lonza, USA. Figura 19) que se cambió dos veces por semana. Después de cuatro semanas, la diferenciación osteogénica se evaluó mediante tinción con rojo de alizarina.

Cuando se llegó a la confluencia de las placas petri, se triptinizaron y se centrifugaron obteniendo un pellet para análisis genético por PCR.

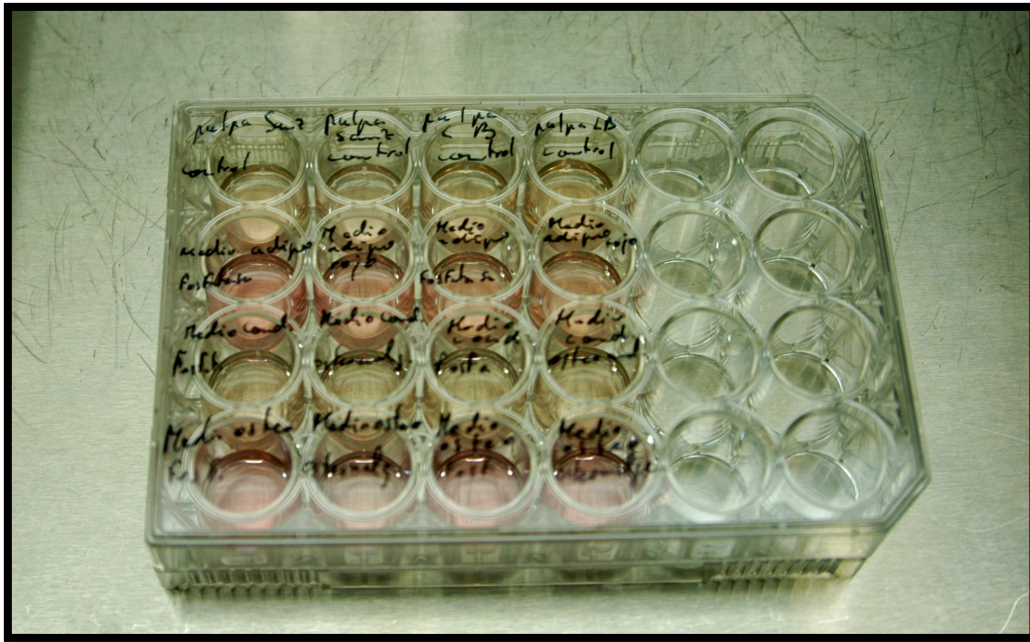


Figura 18: Multiwell. 16 pocillos distribuidos en filas de 4x4 para los protocolos de inducción y control

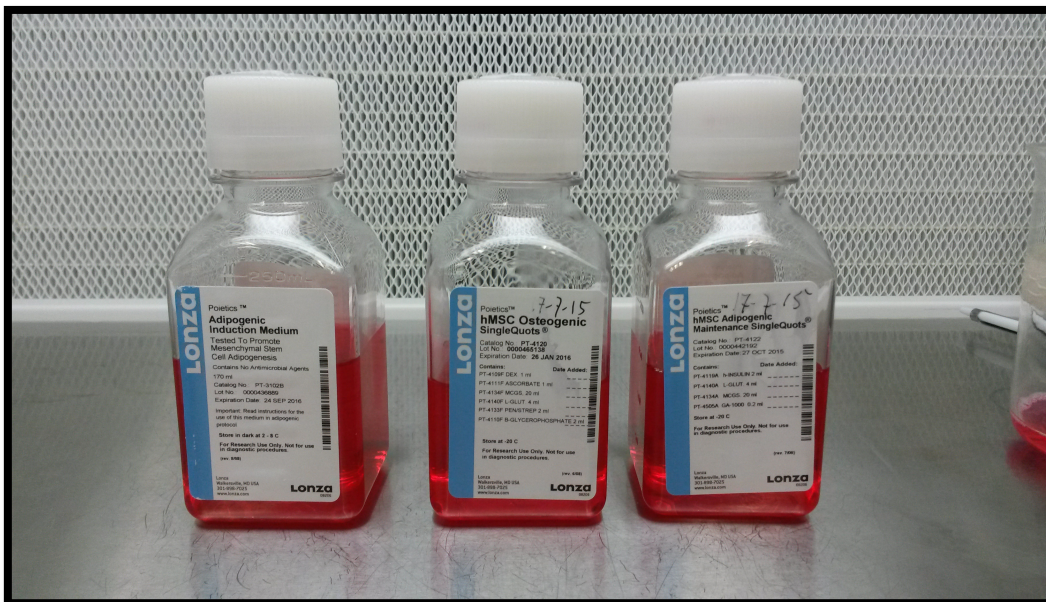


Figura 19: Medios de cultivo comercializados por LONZA usados en el protocolo de inducción.

# RESULTADOS

---

## VII. RESULTADOS:

Se recolectaron 8 muestras de hueso y otras 8 muestras de pulpa dental de pacientes sometidos a cirugía oral tanto para la colocación de implantes como para la extracción de cordales incluidos. De las 16 muestras procesadas, se lograron obtener células en cultivo en 4 muestras de hueso y en 3 muestras de pulpa dental. El resto se contaminaron de microorganismos y se desecharon. De los cultivos viables, se seleccionó tres cultivos de osteoblastos y uno de pulpa dental (grupo LB) y el resto se criopreservó en nitrógeno líquido para futuros estudios.

Los tres cultivos de osteoblastos fueron: grupo 0 (osteoblastos obtenidos de maxilar con trefina), grupo FM (hueso adherido a un cordal durante su extracción), grupo FT (hueso extraído del trígono retromolar en la osteotomía previa a la extracción del cordal)

Se efectuaron evaluaciones microscópicas con microscopio invertido de la morfología celular de los cultivos al primero, séptimo, y 14° día de cultivo. Después de la primera semana, las células mostraban forma de husillo y en la segunda semana ya presentaban una forma clara de huso (morfología fibroblastoide compatible con células madre) y se observó que formaban colonias.

Exámenes macroscópicos mostraron adhesión al plástico de las células, es decir, una propiedad principal de las células madre en medio de cultivo.

---

## **A. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA**

### **DE FLUJO:**

Según la ISCT la expresión de antígenos CD44, CD34 y CD45 son propios de células hematopoyéticas (CD34 y CD45) y los antígenos CD13, CD44, CD73, CD90, CD105 y HLA-DR están relacionados con células mesenquimales.

El análisis de citometría de flujo de las 4 muestras de células se realizaron para los 15 marcadores de superficie y mostraron los resultados que se aprecian en las figuras 16-35.

El software proporcionó un histograma bidimensional de dispersión (bitmap) Figura 20 que relacionó el tamaño celular (forward scatter) con la complejidad celular (side scatter) haciendo posible que discrimináramos subpoblaciones dentro de la muestra que compartían un tamaño y complejidad concretos. Se eligió la región con un side-scatter y un forward scatter alto.

Según la unión de los anticuerpos marcados con los fluorocromos a los marcadores de superficie específicos y su emisión de luz, se generaron los consiguientes histogramas en escala logarítmica decimal que relacionan el número de células (eje Y) con la intensidad de fluorescencia (eje X).

Se obtuvo el histograma de los isotipos control para los fluorocromos PE, APC y FITC que sirvieron como control negativo.

Un problema especial, son las muestras con baja fluorescencia que se diferencian poco del negativo, aunque generalmente una subpoblación puede ser claramente identificada

si tiene un elevado número de células o alta señal fluorescente. Para la interpretación se emplean métodos de comparaciones de curvas. Se realizan overlays del histograma en concreto con el histograma control del fluorocromo.

Cuando la señal de fluorescencia es muy amplia o se halla muy dispersa, las escalas logarítmicas decimales nos resultan muy útiles puesto que agrupa las señales altas y permite diferenciar igualmente al control negativo.

En algunos casos, por la dificultad de interpretación de los datos y la elevada información que contienen, es necesario aplicar modelos matemáticos.

Se consideró que la muestra era positiva para ese marcador si presentaba más del 50% de las células marcadas. Las muestras fueron positivas para CD44, CD90, CD73, CD29, CD59 y el CD105 y negativas para CD11b, CD14, CD20, CD45, CD80, HLA-DR, CD34, CD 66 a/c/e y CD17. De esta manera se cumplían los criterios de la ITSC de células madre. El marcador de células hematopoyéticas, CD34, no se detectó.

i) Grupo 0: osteoblastos

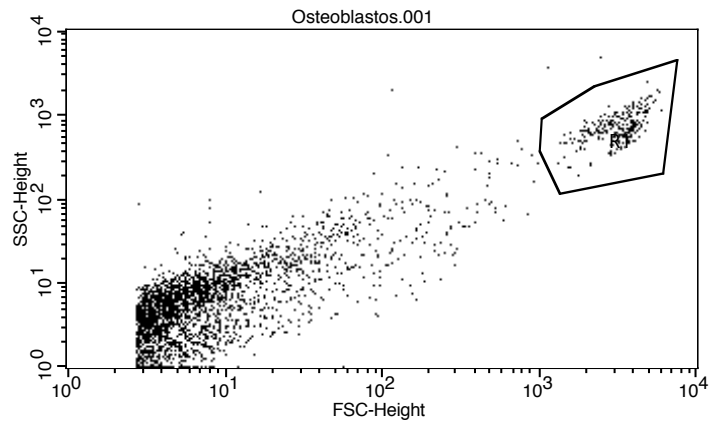


Figura 20: Histograma de dispersión para el Grupo 0 que relaciona la complejidad con el tamaño celular.

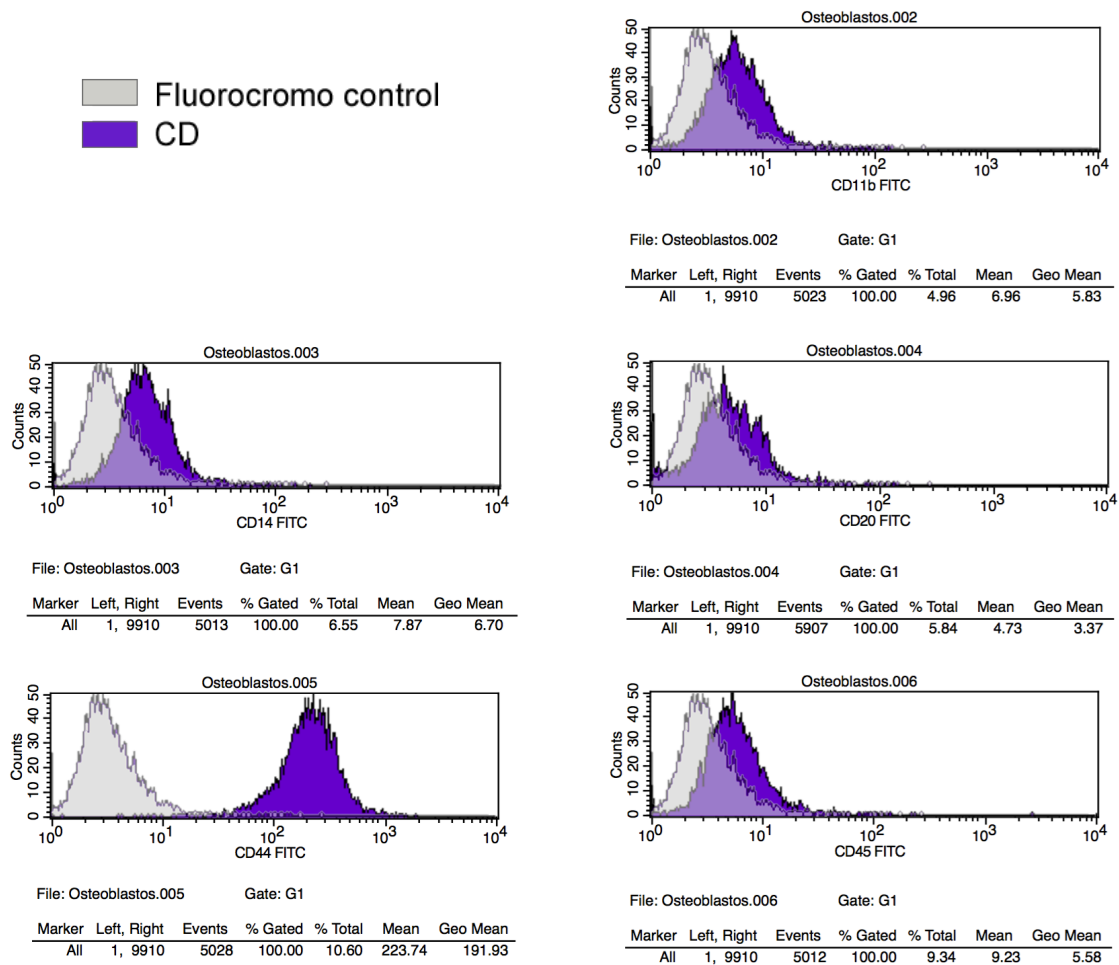


Figura 21: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD11b, CD14, CD20, CD44, CD45 con respecto a su fluorocromo para muestra O

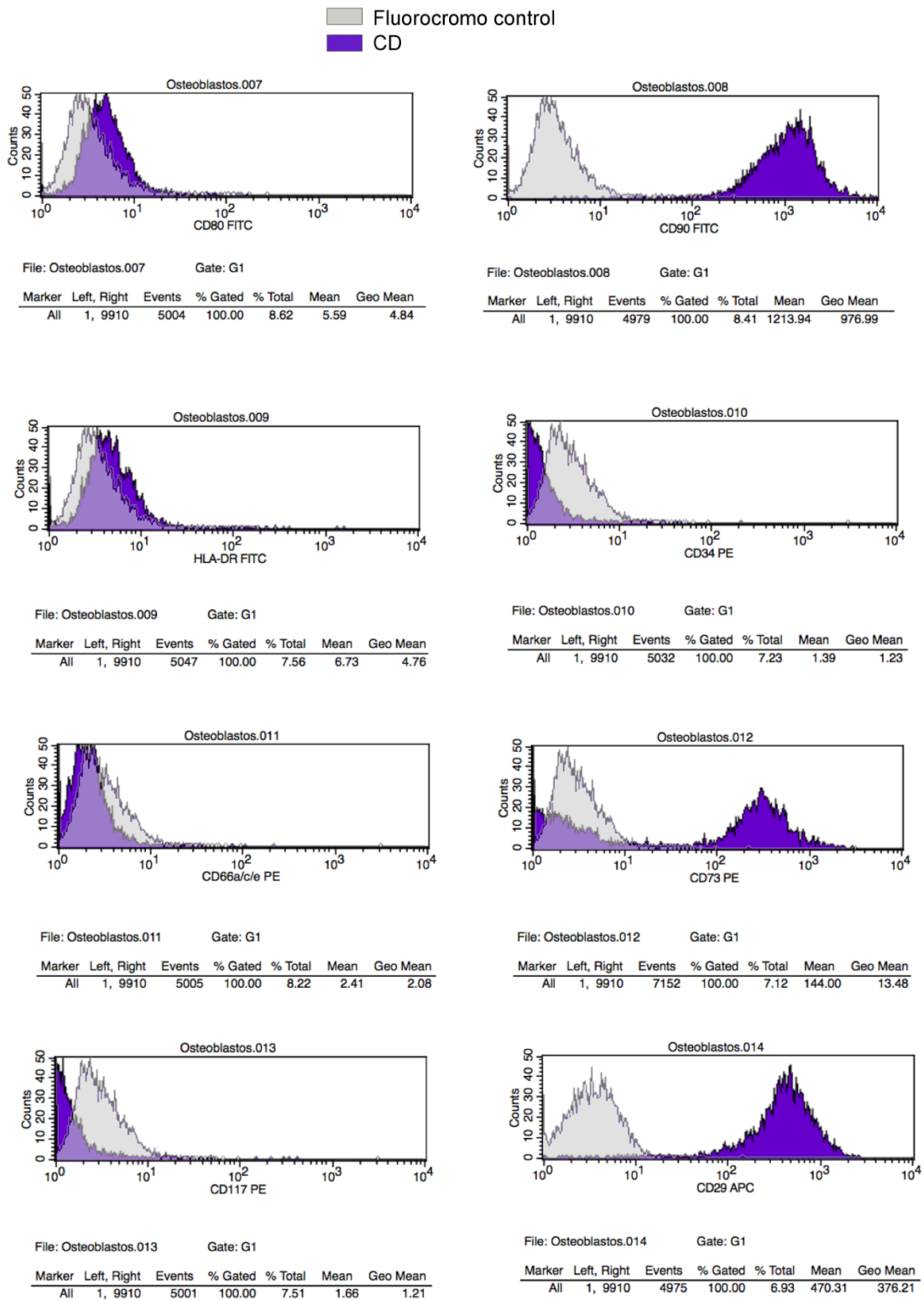


Figura 22: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD80, HLA-DR, CD34, CD66a/c/e, CD73, CD117, CD29 con respecto a su fluorocromo para muestra O.

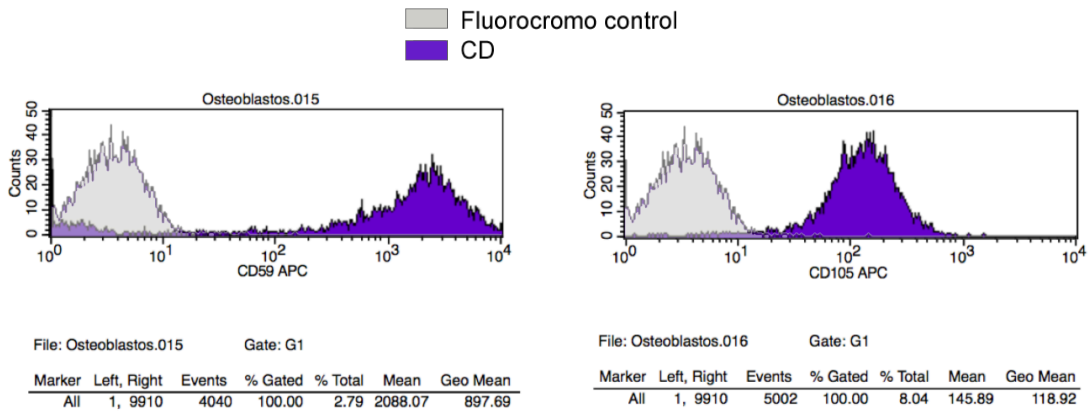


Figura 23: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD59, CD105 con respecto a su fluorocromo para muestra O.

Tabla 6. Intensidad de fluorescencia para Muestra 0 tras restar los valores de autofluorescencia

| Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO (Geo Mean) Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO DEL FLUOROCROMO CONTROL | RESULTADO (resta de geo-mean) |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| CD11b- FITC    | 5,83                                  | 3,27                                | 2,56                          |
| CD14- FITC     | 6,7                                   | 3,27                                | 3,43                          |
| CD20- FITC     | 3,37                                  | 3,27                                | 0,1                           |
| CD44- FITC     | 191,93                                | 3,27                                | 188,66                        |
| CD45- FITC     | 5,58                                  | 3,27                                | 2,31                          |
| CD80- FITC     | 4,84                                  | 3,27                                | 1,57                          |
| CD90- FITC     | 979,99                                | 3,27                                | 976,72                        |
| HLA-DR FITC    | 4,76                                  | 3,27                                | 1,49                          |
| CD34-PE        | 1,23                                  | 2,9                                 | -1,67                         |
| CD66a/c/e-PE   | 2,08                                  | 2,9                                 | -0,82                         |
| CD73-PE        | 1,48                                  | 2,9                                 | -1,42                         |
| CD117-PE       | 1,21                                  | 2,9                                 | -1,69                         |
| CD29-APC       | 376,21                                | 3,48                                | 372,73                        |
| CD59-APC       | 897,69                                | 3,48                                | 894,21                        |
| CD105-APC      | 118,92                                | 3,48                                | 115,44                        |

ii) Grupo LB: pulpa dental

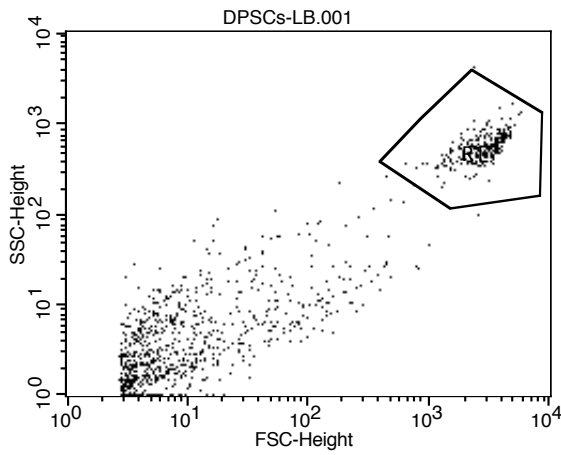


Figura 24: Histograma de dispersión para el Grupo LB que relaciona la complejidad con el tamaño celular.

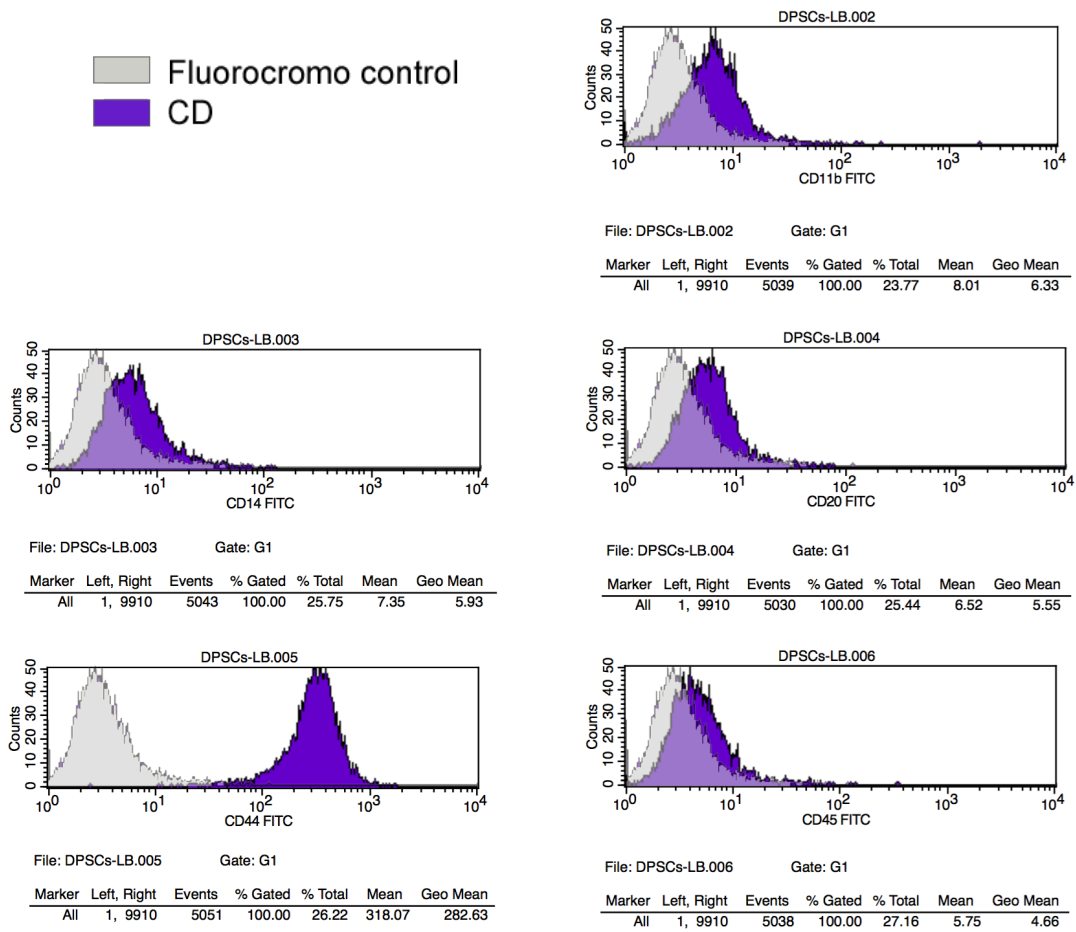


Figura 25: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD11b, CD14, CD20, CD44, CD45 con respecto a su fluorocromo para muestra LB.

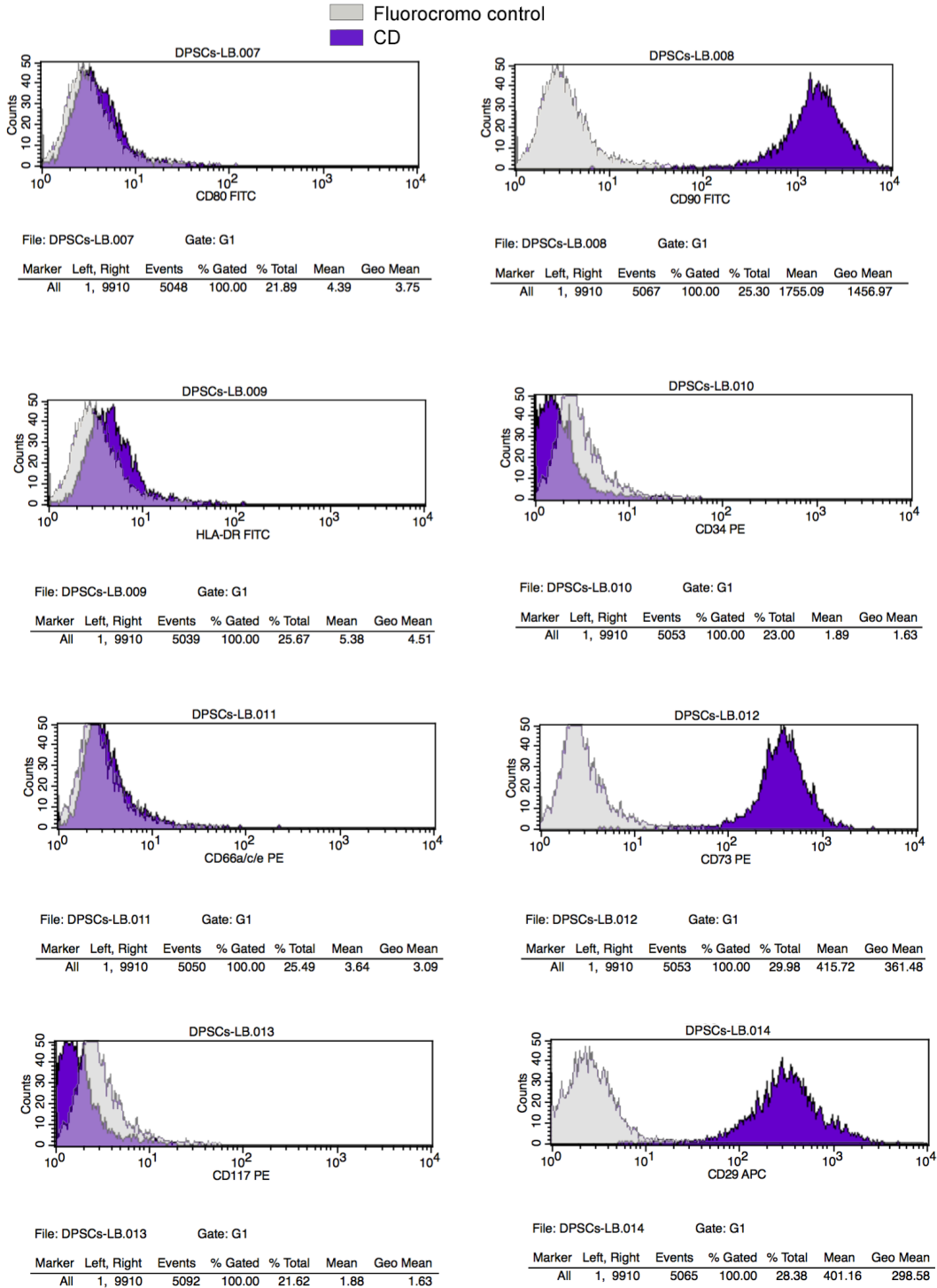


Figura 26: Overlay de histogramas en escala logarítmica de intensidad y número de células para los CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66a/c/e, CD73, CD117, CD29 para la muestra LB con su fluorocromo

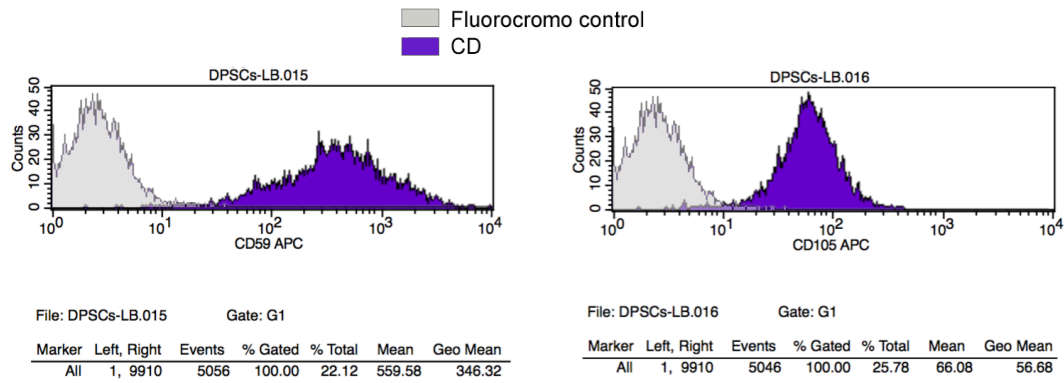


Figura 27: Overlay de histogramas para los CD59, CD105 para la muestra LB con su respectivo fluorocromo

Tabla 7. Intensidad de fluorescencia para Muestra LB tras restar los valores de autofluorescencia

| Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO (Geo Mean) Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO DEL FLUOROCROMO CONTROL | RESULTADO (resta de geo-mean) |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| CD11b- FITC    | 6,33                                  | 3,18                                | 3,15                          |
| CD14- FITC     | 5,93                                  | 3,18                                | 2,75                          |
| CD20- FITC     | 5,55                                  | 3,18                                | 2,37                          |
| CD44- FITC     | 282,63                                | 3,18                                | 279,45                        |
| CD45- FITC     | 4,66                                  | 3,18                                | 1,48                          |
| CD80- FITC     | 3,75                                  | 3,18                                | 0,57                          |
| CD90- FITC     | 1456,97                               | 3,18                                | 1453,79                       |
| HLA-DR FITC    | 4,51                                  | 3,18                                | 1,33                          |
| CD34-PE        | 1,63                                  | 2,8                                 | -1,17                         |
| CD66a/c/e-PE   | 3,09                                  | 2,8                                 | 0,29                          |
| CD73-PE        | 361,48                                | 2,8                                 | 358,68                        |
| CD117-PE       | 1,63                                  | 2,8                                 | -1,17                         |
| CD29-APC       | 298,58                                | 2,53                                | 296,05                        |
| CD59-APC       | 346,32                                | 2,53                                | 343,79                        |
| CD105-APC      | 56,68                                 | 2,53                                | 54,15                         |

iii) Grupo S: pulpa dental

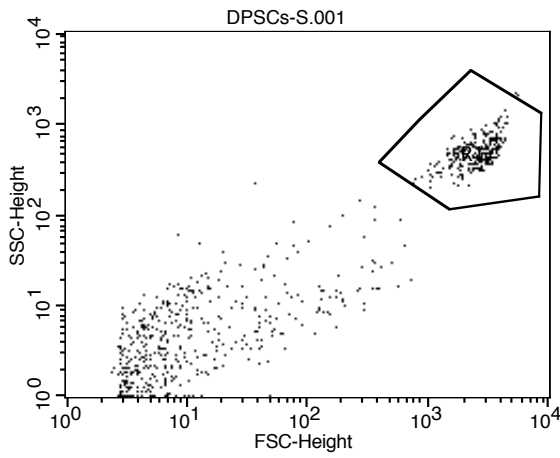


Figura 28: Histograma de dispersión para el Grupo S que relaciona la complejidad con el tamaño celular.

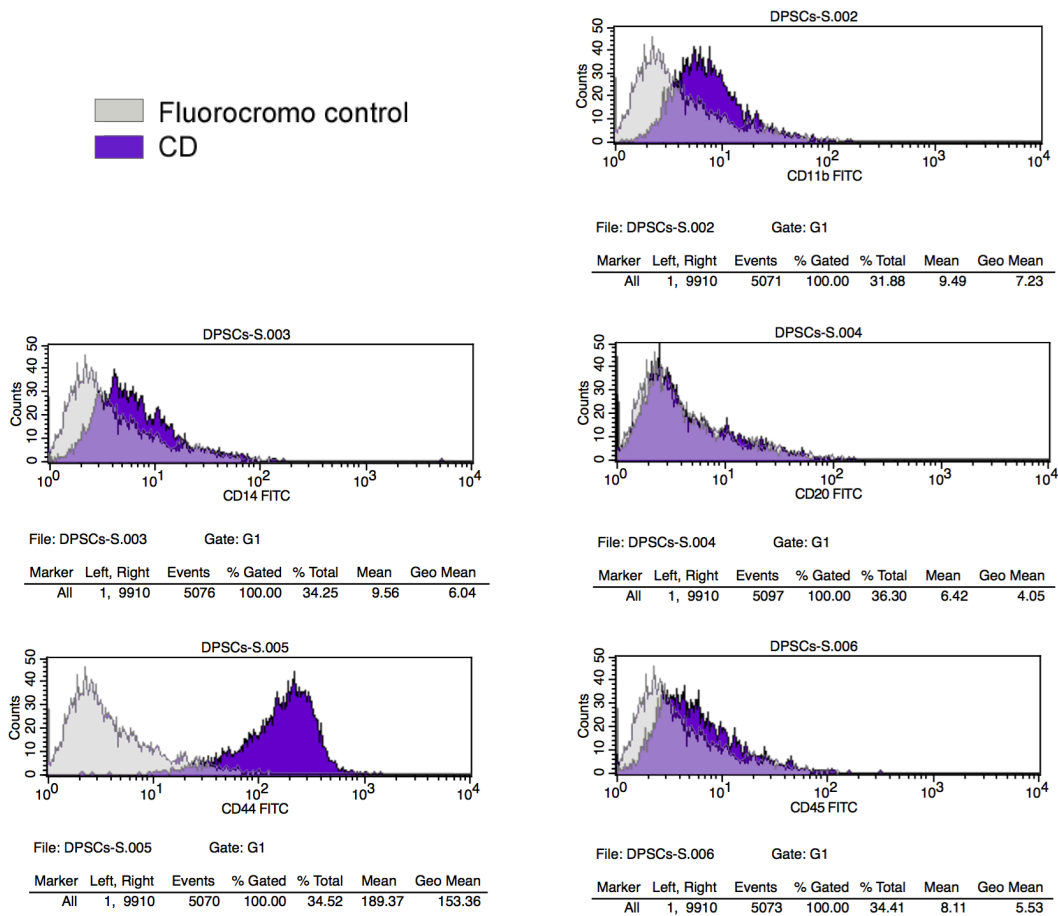


Figura 29: Overlay de histograma de fluorocromo control con el histograma para los CD11b, CD14, CD20, CD44, CD45 para la muestra S

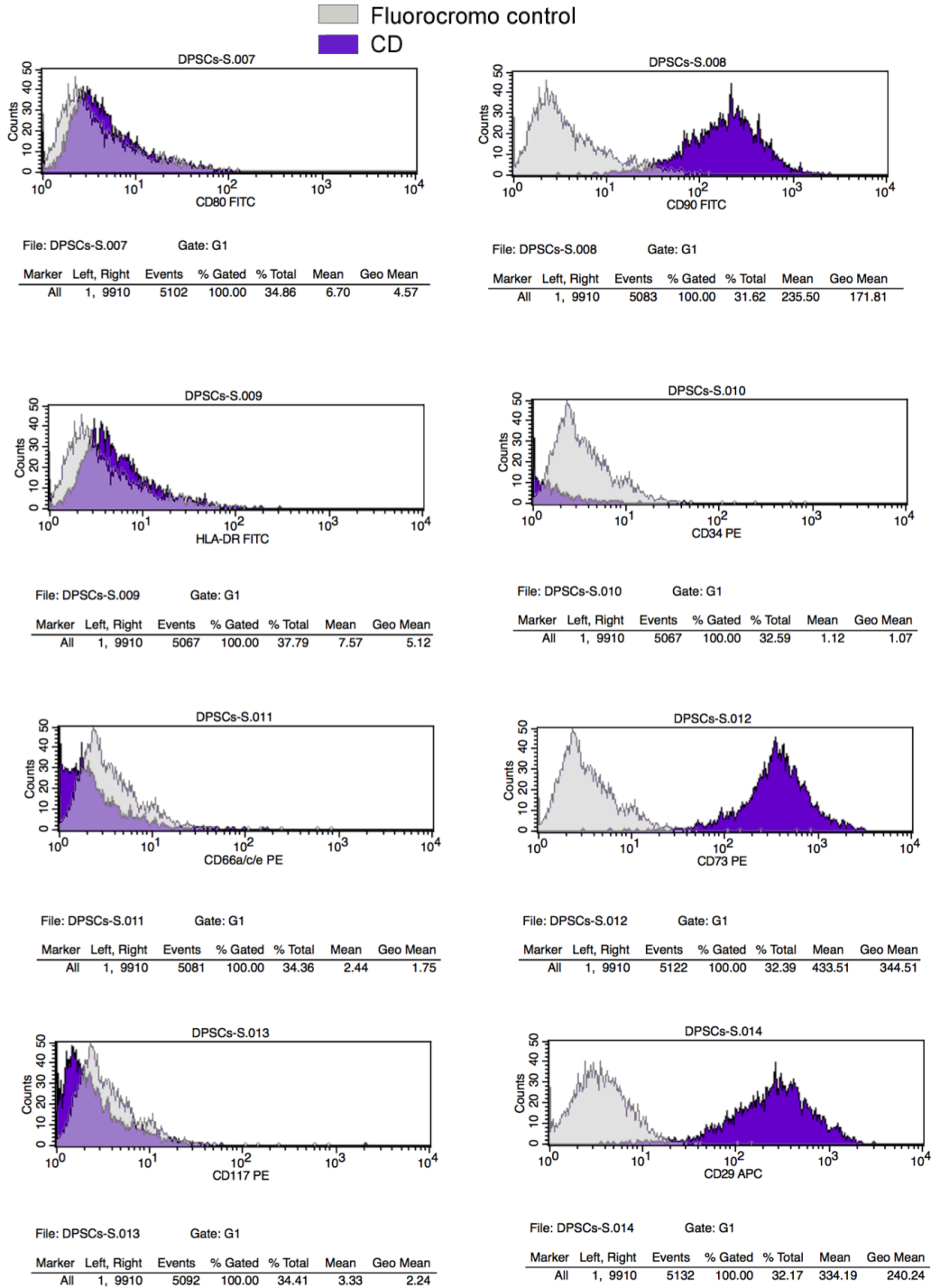


Figura 30: Overlay de histogramas de isotipos control con los histogramas para los CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66a/c/e, CD73, CD117, CD29 para la muestra S

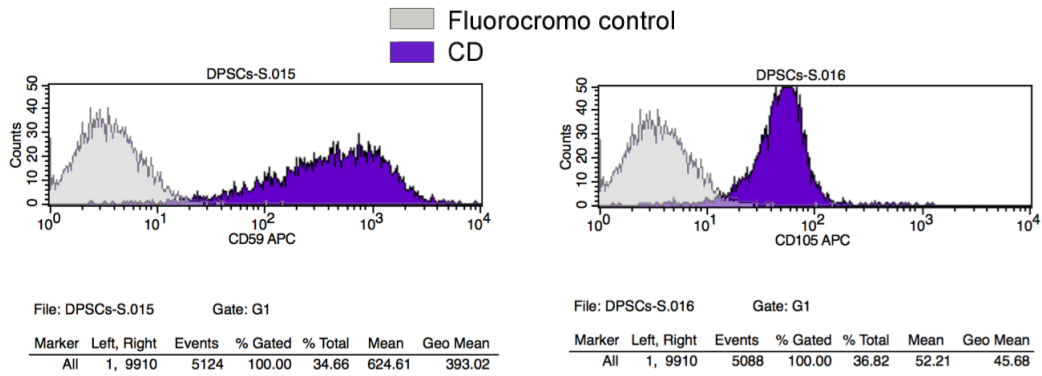


Figura 31: Overlay de histograma para los CD59, CD105 con su respectivo fluorocromo para la muestras

Tabla 8: Intensidad de fluorescencia para Muestra S tras restar los valores de autofluorescencia

| Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO (Geo Mean) Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO DEL FLUOROCROMO CONTROL | RESULTADO (resta de geo-mean) |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| CD11b- FITC    | 7,23                                  | 3,73                                | 3,5                           |
| CD14- FITC     | 6,04                                  | 3,73                                | 2,31                          |
| CD20- FITC     | 4,05                                  | 3,73                                | 0,32                          |
| CD44- FITC     | 153,36                                | 3,73                                | 149,63                        |
| CD45- FITC     | 5,53                                  | 3,73                                | 1,8                           |
| CD80- FITC     | 4,57                                  | 3,73                                | 0,84                          |
| CD90- FITC     | 171,81                                | 3,73                                | 168,08                        |
| HLA-DR FITC    | 5,12                                  | 3,73                                | 1,39                          |
| CD34-PE        | 1,07                                  | 3,37                                | -2,3                          |
| CD66a/c/e-PE   | 1,75                                  | 3,37                                | -1,62                         |
| CD73-PE        | 344,51                                | 3,37                                | 341,14                        |
| CD117-PE       | 2,24                                  | 3,37                                | -1,13                         |
| CD29-APC       | 240,24                                | 3,55                                | 236,69                        |
| CD59-APC       | 393,02                                | 3,55                                | 389,47                        |
| CD105-APC      | 45,68                                 | 3,55                                | 42,13                         |

iv) Grupo FB: hueso adherido a molar

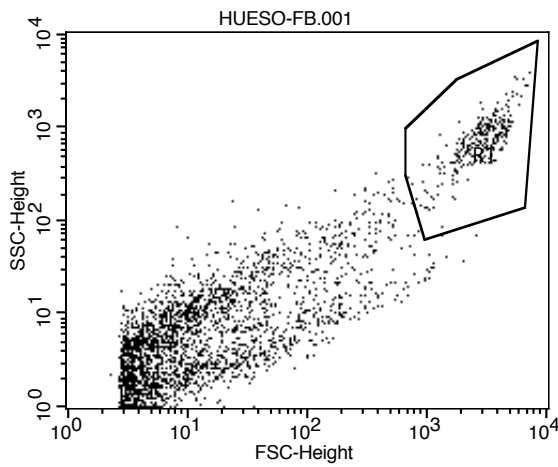


Figura 32: Histograma de dispersión para el Grupo FB que relaciona la complejidad con el tamaño celular

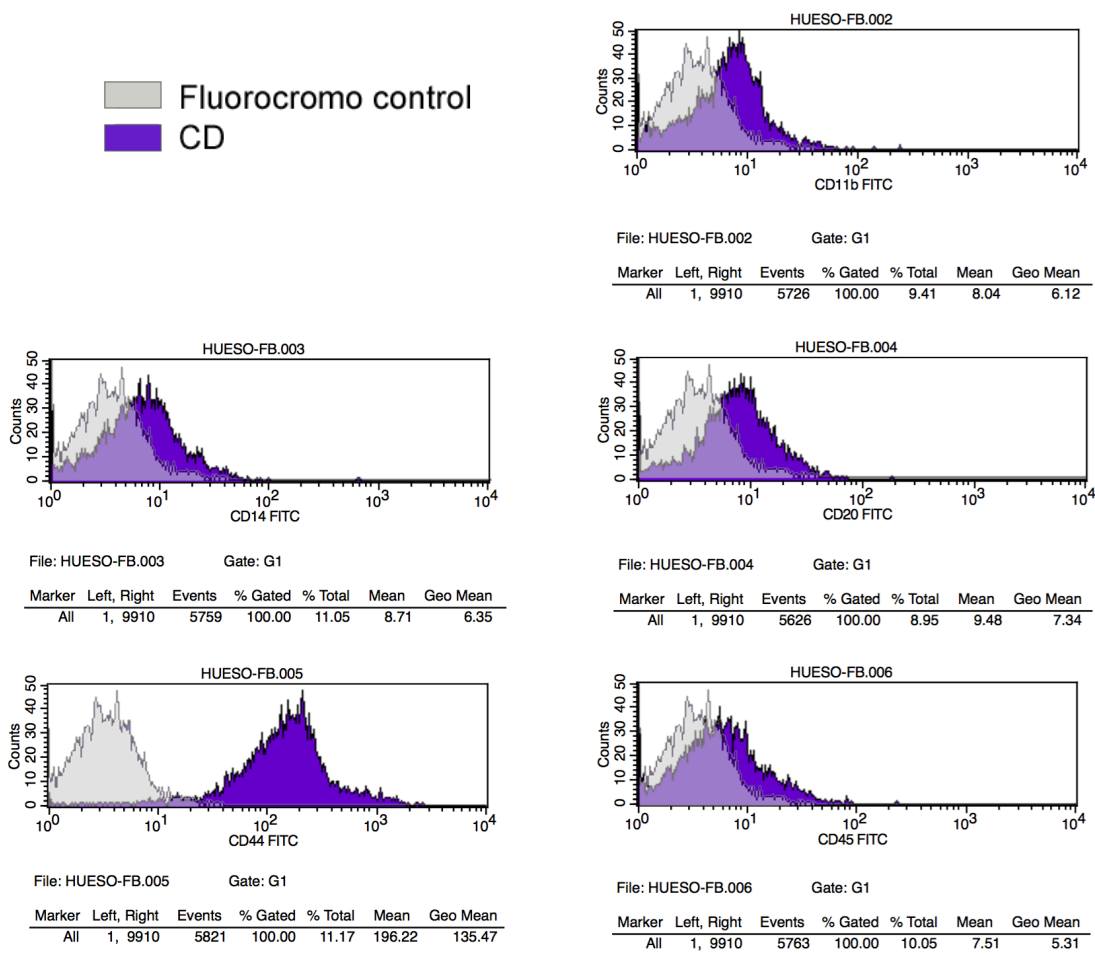


Figura 33: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD11b, CD14, CD20, CD44, CD45 con respecto a su fluorocromo para muestra FB

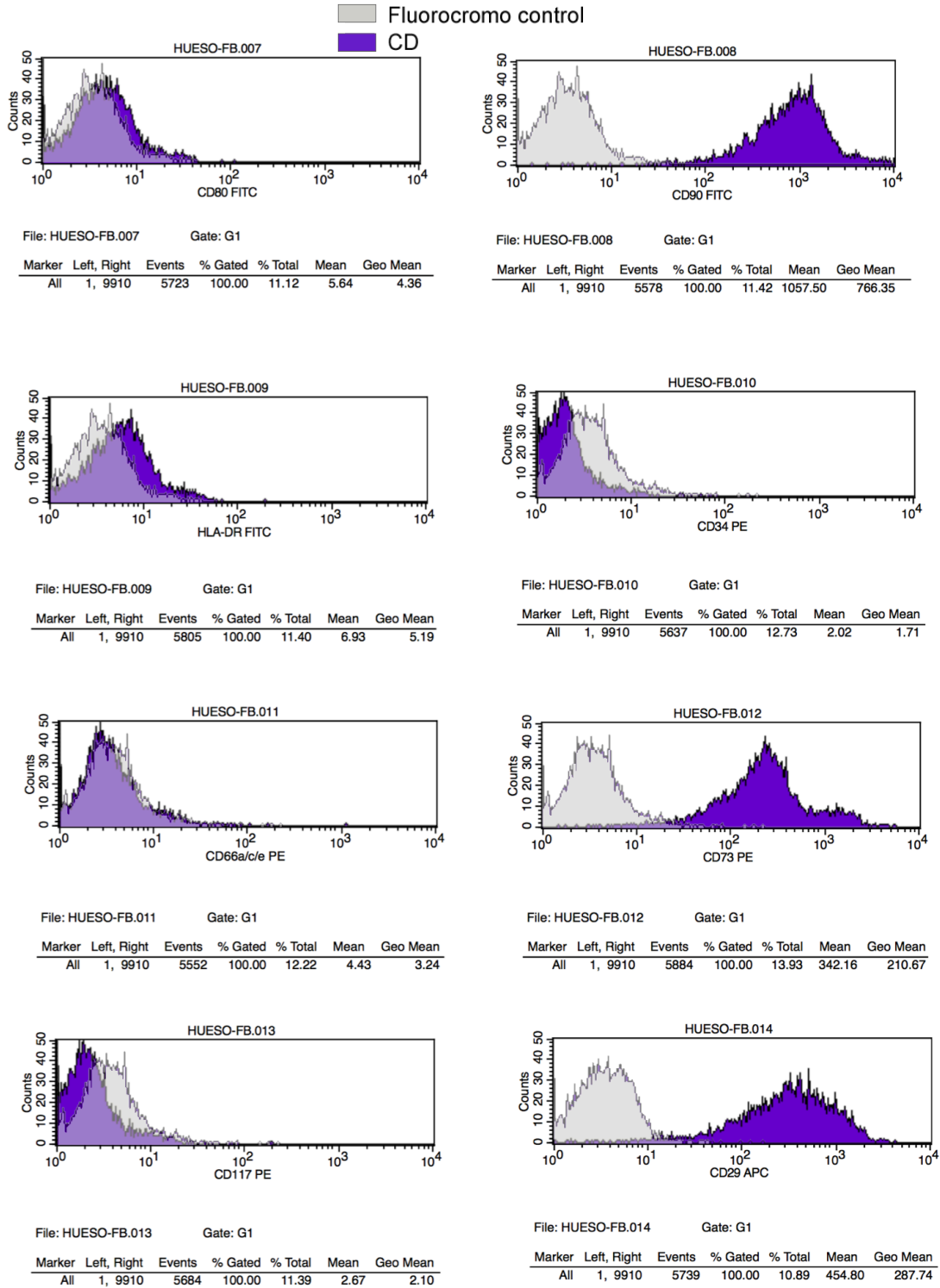


Figura 34: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66a/c/e, CD73, CD117, CD29 con respecto a su fluorocromo para muestra FB

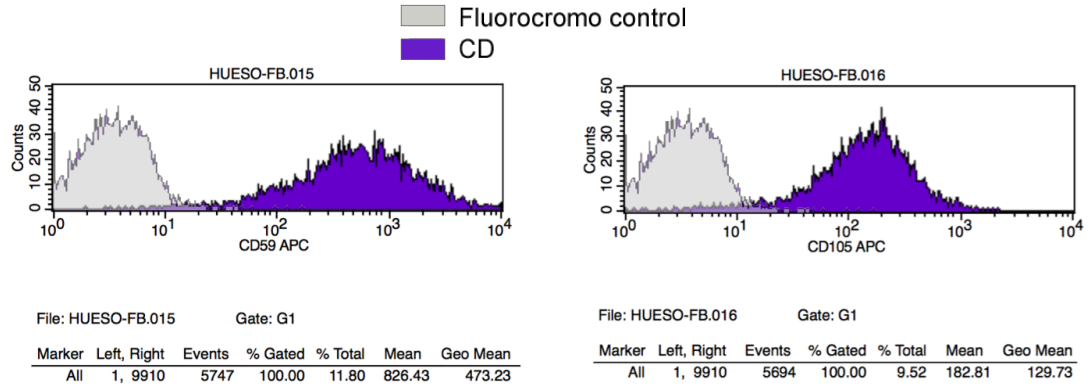


Figura 35: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD59, CD105 con su respectivo fluorocromo para la muestra FB

Tabla 9. Intensidad de fluorescencia para Muestra FB tras restar los valores de autofluorescencia

| Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO (Geo Mean) Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO DEL FLUOROCROMO CONTROL | RESULTADO (resta de geo-mean) |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| CD11b- FITC    | 6,12                                  | 3,21                                | 2,91                          |
| CD14- FITC     | 6,35                                  | 3,21                                | 3,14                          |
| CD20- FITC     | 7,34                                  | 3,21                                | 4,13                          |
| CD44- FITC     | 135,47                                | 3,21                                | 132,26                        |
| CD45- FITC     | 5,31                                  | 3,21                                | 2,1                           |
| CD80- FITC     | 4,36                                  | 3,21                                | 1,15                          |
| CD90- FITC     | 766,35                                | 3,21                                | 763,14                        |
| HLA-DR FITC    | 5,19                                  | 3,21                                | 1,98                          |
| CD34-PE        | 1,71                                  | 3,29                                | -1,58                         |
| CD66a/c/e-PE   | 3,24                                  | 3,29                                | -0,05                         |
| CD73-PE        | 210,67                                | 3,29                                | 207,38                        |
| CD117-PE       | 2,1                                   | 3,29                                | -1,19                         |
| CD29-APC       | 287,74                                | 3,48                                | 284,26                        |
| CD59-APC       | 473,23                                | 3,48                                | 469,75                        |
| CD105-APC      | 129,73                                | 3,48                                | 126,25                        |

v) Grupo FT: hueso de triángulo

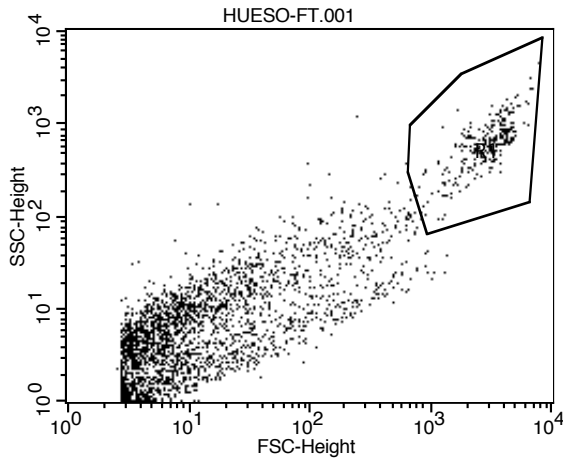


Figura 36: Histograma de dispersión para el Grupo FT que relaciona la complejidad con el tamaño celular

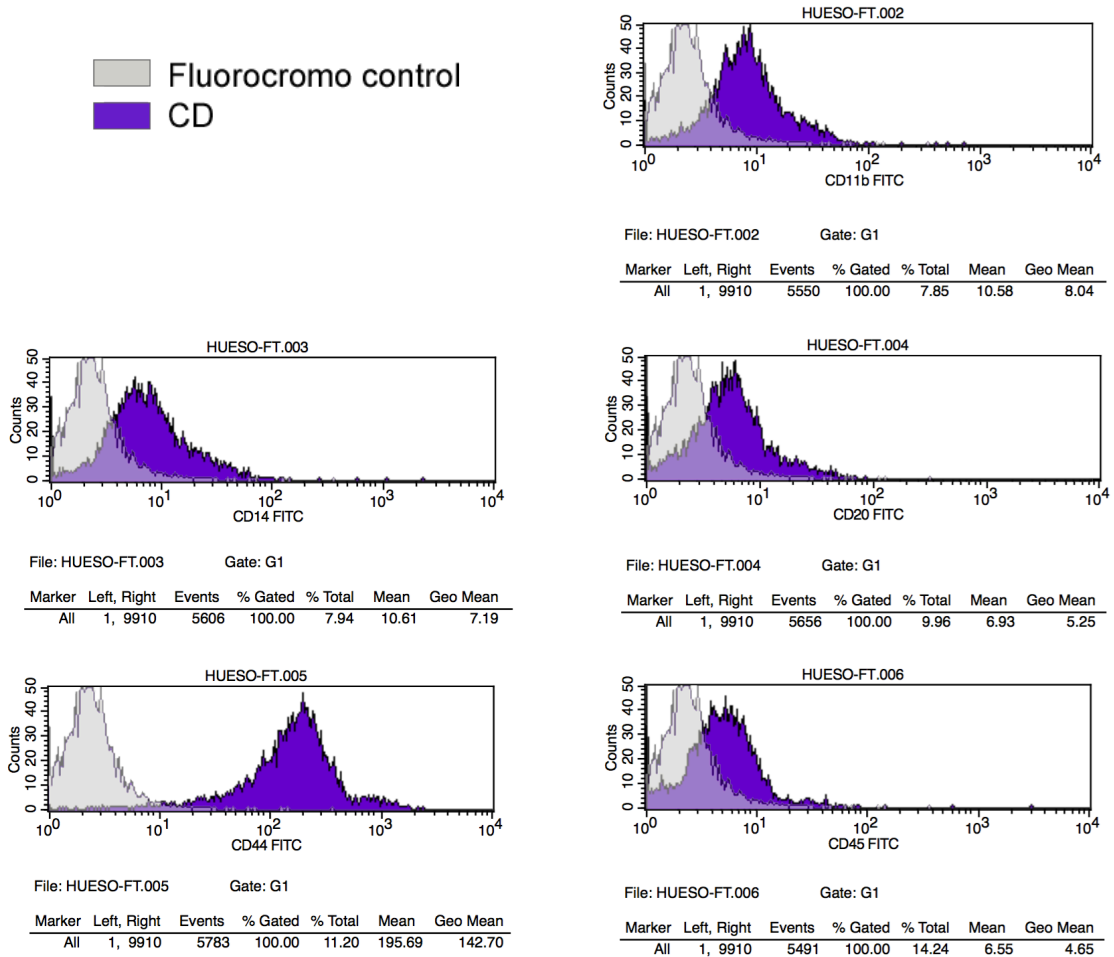


Figura 37: Overlay de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD11b, CD14, CD20, CD44, CD45 respecto a su fluorocromo para la muestra FT

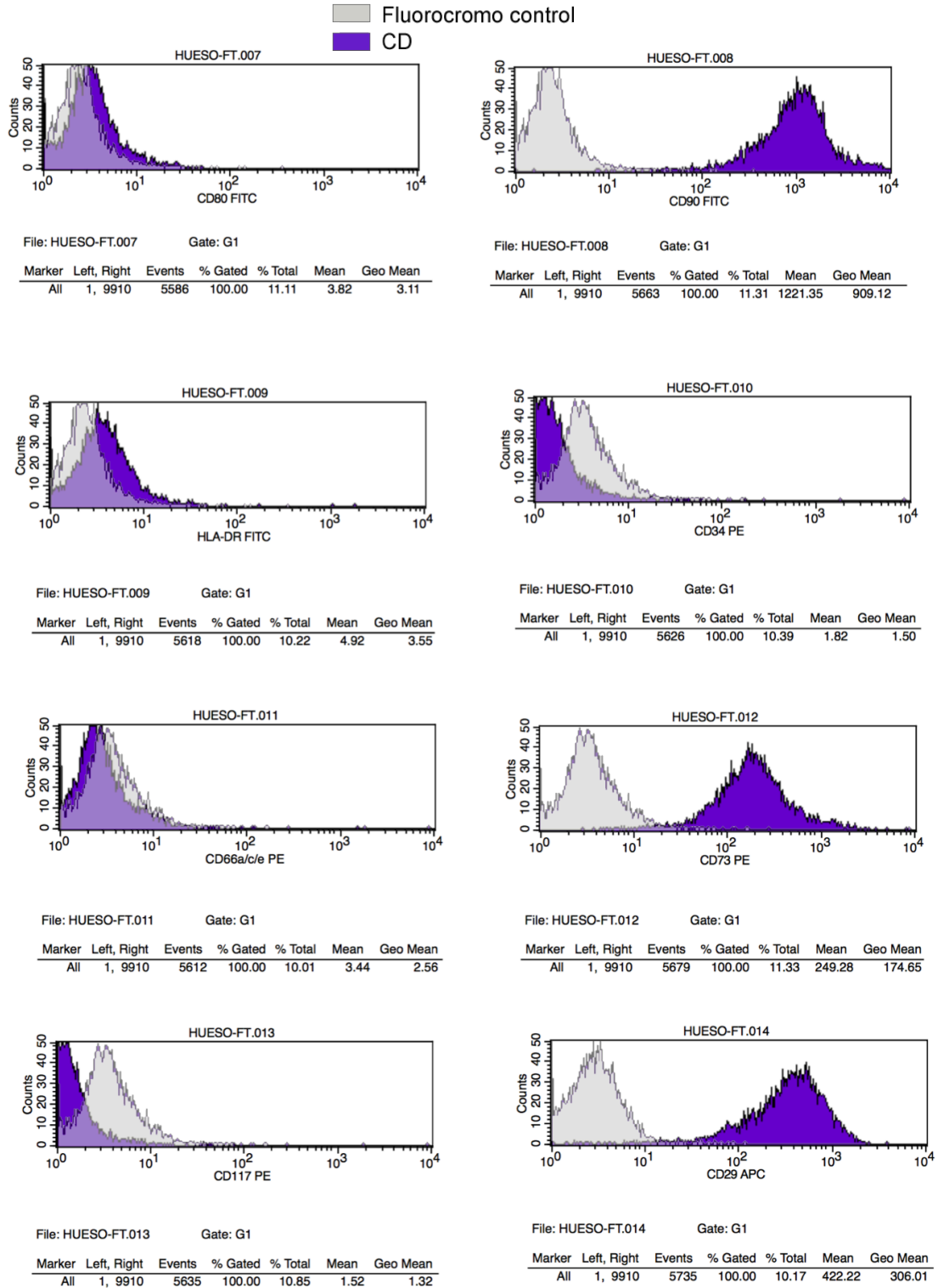


Figura 38: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD90, CD80, HLA-DR, CD34, CD66a/c/e, CD73, CD117, CD29 con respecto a su fluorocromo para la muestra FT

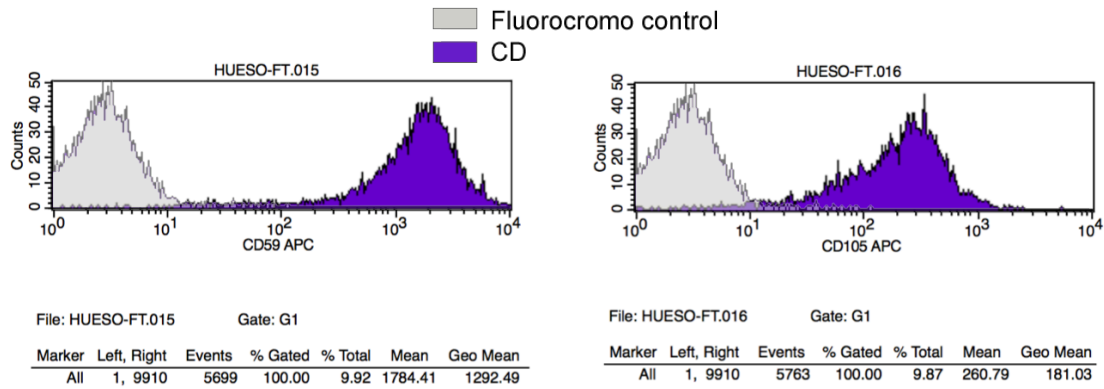


Figura 39: Overlays de histogramas en escala logarítmica de intensidad y números de células para los CD59, CD105 con respecto a su fluorocromo para la muestra FT

Tabla 10. : Intensidad de fluorescencia para Muestra FT tras restar los valores de autofluorescencia

| Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO (Geo Mean) Ac-FLUOROCROMO | VALOR MEDIO DEL FLUOROCROMO CONTROL | RESULTADO (resta de geo-mean) |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| CD11b- FITC    | 8,04                                  | 2,28                                | 5,76                          |
| CD14- FITC     | 7,19                                  | 2,28                                | 4,91                          |
| CD20- FITC     | 5,25                                  | 2,28                                | 2,97                          |
| CD44- FITC     | 142,7                                 | 2,28                                | 140,42                        |
| CD45- FITC     | 4,65                                  | 2,28                                | 2,37                          |
| CD80- FITC     | 3,11                                  | 2,28                                | 0,83                          |
| CD90- FITC     | 909,12                                | 2,28                                | 906,84                        |
| HLA-DR FITC    | 3,55                                  | 2,28                                | 1,27                          |
| CD34-PE        | 1,5                                   | 3,4                                 | -1,9                          |
| CD66a/c/e-PE   | 2,56                                  | 3,4                                 | -0,84                         |
| CD73-PE        | 174,65                                | 3,4                                 | 171,25                        |
| CD117-PE       | 1,32                                  | 3,4                                 | -2,08                         |
| CD29-APC       | 306,01                                | 2,87                                | 303,14                        |
| CD59-APC       | 1292,49                               | 2,87                                | 1289,62                       |
| CD105-APC      | 181,03                                | 2,87                                | 178,16                        |

## ***B. CARACTERIZACIÓN HISTOQUÍMICA***

La caracterización biológica de las DPSCs en células de linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico se comprobó tras la fijación en formol al 10% mediante las coloraciones de fosfatasa alcalina, para depósitos de hidroxiapatita, Oil Red y azul Alcian respectivamente.

## ***C. PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA PRIMARIO:***

En el análisis primario del perfil genético teníamos 4 poblaciones de células, tres de hueso y una de pulpa dental. Cada población celular se identificó con siglas.

- GRUPO FM: hueso adherido a un molar
- GRUPO 0: hueso de alrededor de un implante explantado
- GRUPO LB: pulpa dental
- GRUPO FT: hueso de trígono molar

Tras la cuantificación y la realización de la PCR, los datos fueron procesados por el programa Excel para Windows. La expresión de cada gen en cada muestra quedan reflejados en la Tabla 11 con los valores Ct de cada gen. Siendo Ct el ciclo umbral, es decir, número de ciclos necesarios para el cambio en la fluorescencia.

Cada PCR se repitió por tres veces siendo bastante estables los valores de Ct en las repeticiones y se halló la media de los 3 valores Ct obtenidos de cada gen y cada muestra.

Valores bajos de Ct indican que hay mucha expresión de ese gen y se necesita poco tiempo para que en pocos ciclos se detecte. Por el contrario, valores altos de Ct indican que se necesitan muchos ciclos para que se detecte el gen, o lo que es lo mismo, hay poca expresión del mismo.

**Tabla 11. Valores Ct de los 7 genes analizados en PCR primaria en las 4 muestras. La última línea muestra la media geométrica de los genes housekeeping.**

| Gen                            | Muestra B | Muestra O | Muestra LB | Muestra F |
|--------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| ALPL                           | 27,90     | 26,23     | 21,71      | 25,16     |
| BGLAP                          | 38,81     | 36,33     | 32,97      | 34,49     |
| RUNX2                          | 26,59     | 25,42     | 22,50      | 25,78     |
| COL1A1                         | 15,53     | 16,50     | 14,71      | 17,76     |
| SPP1                           | 29,34     | 32,09     | 25,75      | 29,17     |
| BMP2                           | 33,65     | 32,18     | 26,05      | 29,55     |
| BMP7                           | 28,09     | 28,39     | 25,95      | 28,06     |
| ACTB                           | 14,30     | 16,85     | 14,67      | 15,18     |
| GAPDH                          | 21,84     | 24,15     | 19,80      | 21,61     |
| <b>GEO MEAN<br/>ACTB-GAPDH</b> | 17,672    | 20,172    | 17,043     | 18,112    |

Se creó otra tabla para uniformizar los genes diana en referencia a la expresión del house-keeping ACTB (Tabla 12 de  $\Delta$ Ct). Esto es una manera de eliminar el número de ciclos (Ct) que se necesitan en cualquier célula para ver la expresión de un gen básico en la supervivencia celular. Dicho de otro modo, se restó a los valores de cada gen diana, el valor del gen house-keeping ACTB de cada muestra para saber cuánto más estaban sobreexpresados los genes.

Valores bajos de Ct indican una expresión temprana del gen porque esté presente en mayor cantidad.

**Tabla 12. Tabla de  $\Delta$ Ct de PCR primaria(cuánto más está expresado un gen diana en referencia al gen ACTB**

de su propia muestra).

| $\Delta Ct$   | Muestra FM                      | Muestra O | Muestra LB | Muestra FT |
|---------------|---------------------------------|-----------|------------|------------|
|               | Reactivo a ACTB de cada muestra |           |            |            |
| <b>ALPL</b>   | 13,600                          | 9,380     | 7,040      | 9,980      |
| <b>BGLAP</b>  | 24,510                          | 19,480    | 18,300     | 19,310     |
| <b>RUNX2</b>  | 12,290                          | 8,570     | 7,830      | 10,600     |
| <b>COL1A1</b> | 1,230                           | -0,350    | 0,040      | 2,580      |
| <b>SPP1</b>   | 15,040                          | 15,240    | 11,080     | 13,990     |
| <b>BMP2</b>   | 19,350                          | 15,330    | 11,380     | 14,370     |
| <b>BMP7</b>   | 13,790                          | 11,540    | 11,280     | 12,880     |

A posteriori se realizaron comparaciones de los genes diana respecto a la expresión de ese mismo gen en otra muestra que cogimos de referencia o control ( $\Delta\Delta Ct$  respecto a LB). Es decir, cuantas veces de más o de menos estaba expresado un gen comparado con la expresión de ese mismo gen en la muestra LB. Estos datos se encuentran en la Tabla 13

**Tabla 13. Tabla de  $\Delta\Delta Ct$  en PCR primaria. Comparativa de cada gen en relación con su expresión en la muestra LB.**

|               | Todas las muestras comparadas a LB $\Delta\Delta Ct$ |           |            |            |
|---------------|--|-----------|------------|------------|
|               | Muestra FM   | Muestra O | Muestra LB | Muestra FT |
| <b>ALPL</b>   | -6,560   | -2,340    | 0,000      | -2,940     |
| <b>BGLAP</b>  | -6,210   | -1,180    | 0,000      | -1,010     |
| <b>RUNX2</b>  | -4,460   | -0,740    | 0,000      | -2,770     |
| <b>COL1A1</b> | -1,190   | 0,390     | 0,000      | -2,540     |
| <b>SPP1</b>   | -3,960   | -4,160    | 0,000      | -2,910     |
| <b>BMP2</b>   | -7,970   | -3,950    | 0,000      | -2,990     |
| <b>BMP7</b>   | -2,510   | -0,260    | 0,000      | -1,600     |

Para eliminar los valores negativos y poder crear una gráfica se realizó un Fold Change o transformación logarítmica de base dos ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Así se obtuvo el fold regulation para la muestra patrón LB, es decir, cuantas veces más se expresa un gen referente a ese mismo gen en la muestra LB.

El resumen de las fórmulas matemáticas empleadas en RT-PCR están en la Tabla 14.

**Tabla 14: Resumen de los cálculos para Rt-PCR (PCR de tiempo real)**

|  |
|--|
| <b><math>Fold\ Change = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}</math></b>                          |
| <b><math>\Delta Ct = Ct, target - Ct, ACTB</math></b>                              |
| <b><math>\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct, stimulated - \Delta Ct, control</math></b> |

Los valores de **fold regulation**, se obtienen restando el valor de la muestra patrón (valor de cada gen en LB) el valor que queremos medir (valor de cada gen en cada muestra) y después se emplea como potencia negativa de 2 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Si el resultado es mayor que 1, estamos hablando de Upregulated y si el resultado es menor que 1, estamos hablando de Downregulated.

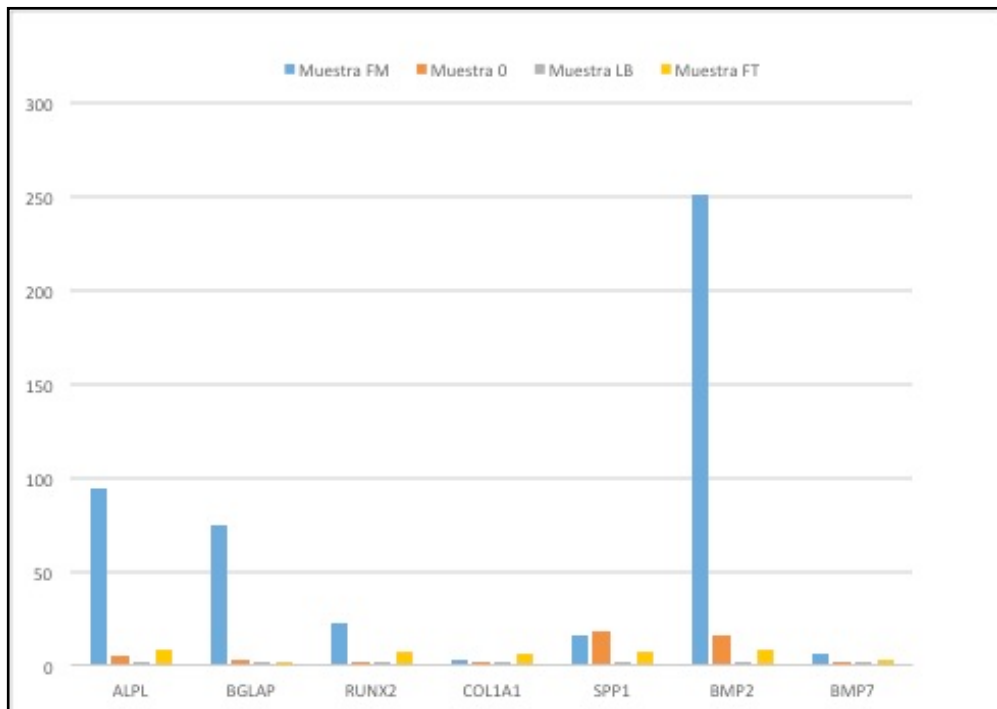
Estos cálculos de fold change están reflejados en la Tabla 15 y en la figura 40.

**Tabla 15. Cálculos de Fold Change en PCR primaria ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )**

**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**

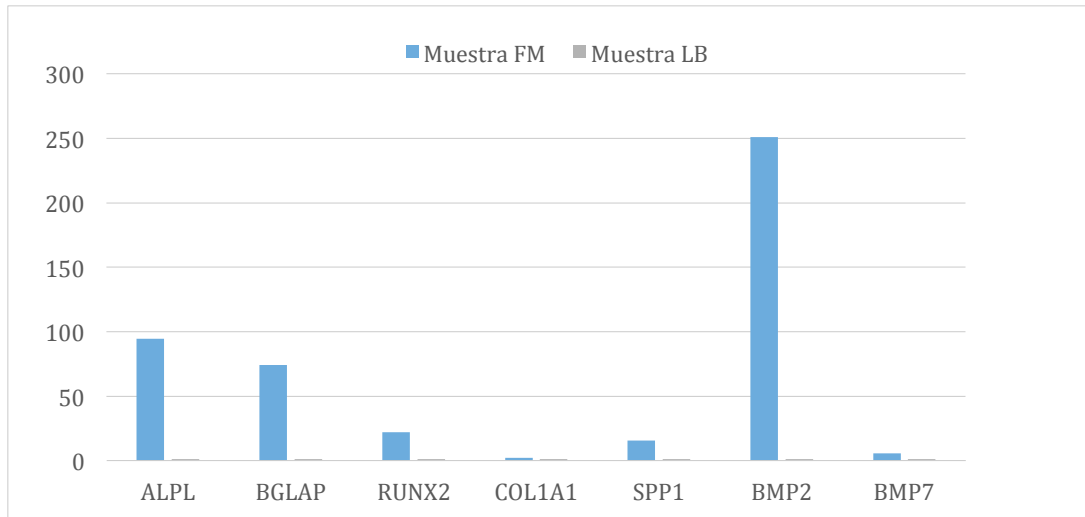
Fold Change relativo a LB

|               | Muestra FM  | Muestra O   | Muestra LB | Muestra FT  |
|---------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| <b>ALPL</b>   | 94,35322991 | 5,063026376 | 1          | 7,674112955 |
| <b>BGLAP</b>  | 74,02804377 | 2,265767771 | 1          | 2,0139111   |
| <b>RUNX2</b>  | 22,00866909 | 1,670175839 | 1          | 6,821079134 |
| <b>COL1A1</b> | 2,281527432 | 0,763129604 | 1          | 5,815890069 |
| <b>SPP1</b>   | 15,56247916 | 17,87659421 | 1          | 7,516181994 |
| <b>BMP2</b>   | 250,7315962 | 15,45498126 | 1          | 7,944739963 |
| <b>BMP7</b>   | 5,696200782 | 1,197478705 | 1          | 3,031433133 |



Esto determina que las muestras FM, 0 y FT expresan estos 7 genes estudiados en mayor cantidad que la muestra LB. Dado que estos genes reactivos son los que se expresan normalmente en los osteoblastos, la gráfica ratifica que se hallen más presentes en las muestras FM, 0 y FT que eran muestras óseas que en la muestra LB que eran DPSCs.

Se obtuvieron otras 3 gráficas o representaciones individuales de cada muestra respecto a la muestra LB.



**Figura 41: Comparativa de la muestra FM con la muestra LB**

Así la interpretación de la gráfica para la Figura 41 fue:

El gen ALPL se expresa 94,35 veces más en “muestra FM” que en “Muestra LB”

El gen BGLAP se expresa 74,02 veces más en “muestra FM” que en “Muestra LB”

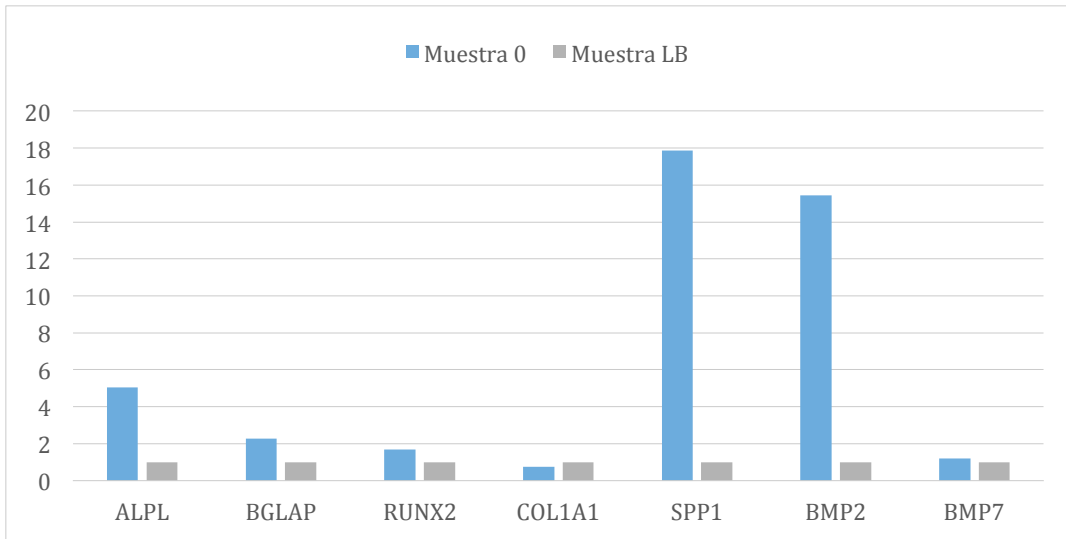
El gen RUNX2 se expresa 22,00 veces más en “muestra FM ” que en “Muestra LB”

El gen COL1A1 se expresa 2,28 veces más en “muestra FM” que en “Muestra LB”

El gen de SPP1 se expresa 15,56 veces más en “muestra FM” que en “Muestra LB”

El gen de BMP2 se expresa 250,73 veces más en “muestra FM” que en “Muestra LB”

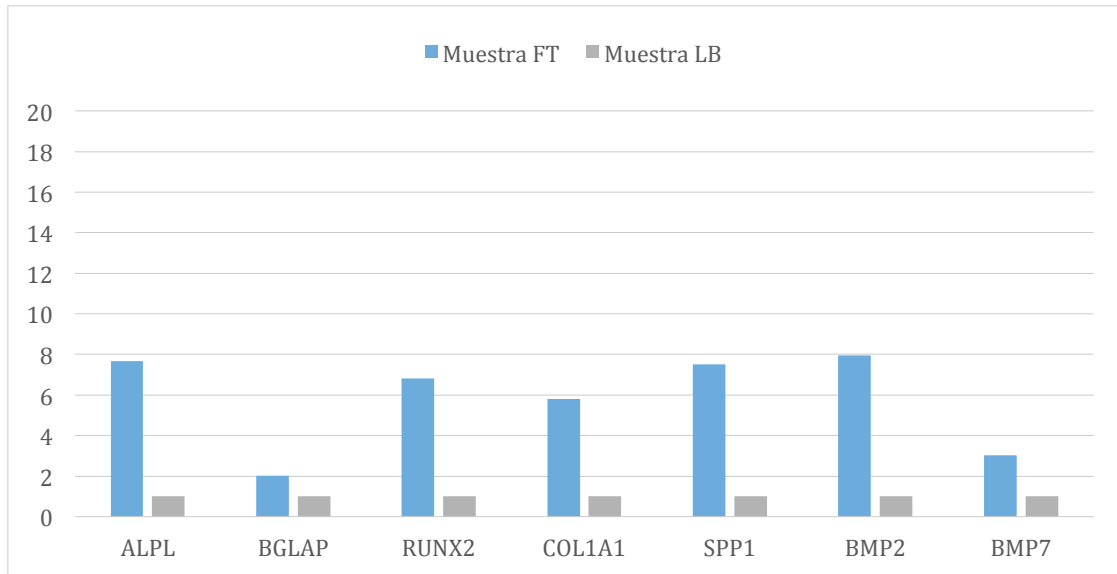
El gen de BMP7 se expresa 5,69 veces más en “muestra FM” que en “Muestra LB”



**Figura 42. Comparativa de la muestra 0 con la muestra LB**

Así la interpretación de la gráfica de la Figura 42 fue:

- El gen ALPL se expresa 5,06 veces más en “muestra 0” que en “Muestra LB”
- El gen BGLAP se expresa 2,26 veces más en “muestra 0” que en “Muestra LB”
- El gen RUNX2 se expresa 1,67 veces más en “muestra 0 ” que en “Muestra LB”
- El gen COL1A1 se expresa 0,763 veces más en “muestra 0” que en “Muestra LB”o lo que es lo mismo está downregulado o menos expresado (1/0,763) 1,3 veces
- El gen de SPP1 se expresa 17,87 veces más en “muestra 0” que en “Muestra LB”
- El gen de BMP2 se expresa 15,45 veces más en “muestra 0” que en “Muestra LB”
- El gen de BMP7 se expresa 1,19 veces más en “muestra 0 ” que en “Muestra LB”



**Figura 43: Comparativa de la muestra FT con la muestra LB**

Así la interpretación de la siguiente para la gráfica de la Figura 43 fue:

- El gen ALPL se expresa 7,67 veces más en “muestra FT” que en “Muestra LB”
- El gen BGLAP se expresa 2,01 veces más en “muestra FT” que en “Muestra LB”
- El gen RUNX2 se expresa 6,82 veces más en “muestra FT” que en “Muestra LB”
- El gen COL1A1 se expresa 5,81 veces más en “muestra FT” que en “Muestra LB”
- El gen de SPP1 se expresa 7,51 veces más en “muestra FT” que en “Muestra LB”
- El gen de BMP2 se expresa 7,94 veces más en “muestra FT” que en “Muestra LB”
- El gen de BMP7 se expresa 3,03 veces más en “muestra FT” que en “Muestra LB”

En resumen y a manera de conclusión. Si consideramos que las muestras son osteoblastos en función de los genes analizados, la muestra LB es la más diferente a

todas ellas y por tanto no correspondería a Osteoblastos.

#### ***D. PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA TRAS CULTIVO CON MEDIO COMERCIAL Y MEDIO CONDICIONADO.***

En el análisis secundario tras la inducción osteogénica de las DPSCs por medios de cultivo condicionado y medio de inducción osteogénica (LONZA) comercializado, teníamos 6 poblaciones celulares ya que tanto el grupo control como los grupos inducidos estaban duplicados:

- Grupo Pulpa control S
- Grupo Pulpa S medio condicionado
- Grupo Pulpa S con medio de diferenciación osteogénica (LONZA)
- Grupo Pulpa LB control
- Grupo Pulpa LB medio condicionado
- Grupo Pulpa LB con medio de diferenciación osteogénica (LONZA)

Se cultivó una población de DPSCsT durante 3 semanas en medio de cultivo osteogénico comercializado (Lonza) y otra población en medio condicionado obtenido de osteoblastos. Posteriormente se despegaron, se obtuvo el pellet y se extrajo el RNAm que se procesó para la realización de la Rt-PCR para valorar los cambios en la expresión génica. Se realizó la PCR por triplicado.

Los datos fueron procesados por el programa Excel para Windows. La expresión de cada gen en cada muestra quedan reflejados en la Tabla 16 y Tabla 17 con la media de

los valores Ct de cada gen

Tabla 16: Valores de los Ct de los 7 genes en el Grupo Pulpa S

| GEN         | Media de los Valores Ct |                            |  |
|-------------|-------------------------|----------------------------|--|
|             | Pulpa Control S         | Pulpa S medio condicionado | Pulpa S medio diferenciación osteogénica |
| ALPL        | 18,73                   | 17,70                      | 20,86                                    |
| BGLAP       | 26,79                   | 28,88                      | 29,21                                    |
| RUNX2       | 19,72                   | 19,80                      | 19,31                                    |
| COL1A1      | 13,39                   | 11,52                      | 16,84                                    |
| SPP1        | 27,77                   | 27,63                      | 23,84                                    |
| BMP2        | 21,64                   | 23,17                      | 20,64                                    |
| BMP7        | 31,98                   | 30,09                      | 35,01                                    |
| ACTB        | 13,16                   | 13,50                      | 14,19                                    |
| GAPDH       | 17,23                   | 17,32                      | 18,79                                    |
| promedio HK | 15,20                   | 15,41                      | 16,49                                    |

Tabla 17: Valores de los Ct de los 7 genes en el Grupo Pulpa LB

| GEN         | Media de los Valores Ct |                             |   |
|-------------|-------------------------|-----------------------------|---|
|             | Pulpa control LB        | Pulpa LB medio condicionado | Pulpa LB medio diferenciación osteogénica |
| ALPL        | 17,83                   | 18,37                       | 20,32                                     |
| BGLAP       | 28,44                   | 27,93                       | 27,82                                     |
| RUNX2       | 19,70                   | 20,16                       | 20,43                                     |
| COL1A1      | 11,62                   | 14,24                       | 16,86                                     |
| SPP1        | 27,11                   | 27,66                       | 25,67                                     |
| BMP2        | 22,54                   | 21,32                       | 19,89                                     |
| BMP7        | 29,19                   | 32,97                       | 32,85                                     |
| ACTB        | 13,73                   | 12,91                       | 14,24                                     |
| GAPDH       | 17,43                   | 17,54                       | 18,16                                     |
| promedio HK | 15,58                   | 15,23                       | 16,20                                     |

Se creó la Tabla 18 y la Tabla 19 para uniformizar los genes diana en referencia al promedio de los house-keeping puesto que eran muy estables y uniformes ( $\Delta Ct$ ).

**Tabla 18: Tabla de  $\Delta Ct$  de PCR secundaria de Pulpa S (en relación al promedio de HK)**

|               | $\Delta Ct$     |                            |  |
|---------------|-----------------|----------------------------|--|
|               | Pulpa control S | Pulpa S medio condicionado | Pulpa S medio diferenciación osteoblástica |
| <b>ALPL</b>   | 3,53            | 2,29                       | 4,37                                       |
| <b>BGLAP</b>  | 11,59           | 13,47                      | 12,72                                      |
| <b>RUNX2</b>  | 4,52            | 4,39                       | 2,82                                       |
| <b>COL1A1</b> | -1,81           | -3,89                      | 0,35                                       |
| <b>SPP1</b>   | 12,57           | 12,22                      | 7,35                                       |
| <b>BMP2</b>   | 6,44            | 7,76                       | 4,15                                       |
| <b>BMP7</b>   | 16,78           | 14,68                      | 18,52                                      |

**Tabla 19: Tabla de  $\Delta Ct$  de PCR secundaria de LB (en relación al promedio de HK)**

|               | $\Delta Ct$      |                             |   |
|---------------|------------------|-----------------------------|---|
|               | Pulpa control LB | Pulpa LB medio condicionado | Pulpa LB medio diferenciación osteoblástica |
| <b>ALPL</b>   | 2,25             | 3,14                        | 4,12  |
| <b>BGLAP</b>  | 12,86            | 12,70                       | 11,62                                       |
| <b>RUNX2</b>  | 4,12             | 4,93                        | 4,23  |
| <b>COL1A1</b> | -3,96            | -0,99                       | 0,66  |
| <b>SPP1</b>   | 11,53            | 12,43                       | 9,47  |
| <b>BMP2</b>   | 6,96             | 6,09                        | 3,69  |
| <b>BMP7</b>   | 13,61            | 17,74                       | 16,65                                       |

A posteriori se realizaron comparaciones de los genes diana respecto a la expresión de ese mismo gen en la muestra control ( $\Delta\Delta Ct$  respecto a Pulpa control). Estos datos se encuentran en la Tabla 20 y la Tabla 21.

**Tabla 20: Tabla de  $\Delta\Delta Ct$  en PCR secundaria. Comparativa de cada gen en relación con su expresión en la Pulpa control S.**

| <b><math>\Delta\Delta Ct</math> respecto a Pulpa control S</b> |                 |                            |  |
|--|-----------------|----------------------------|--|
|  | Pulpa control S | Pulpa S medio condicionado | Pulpa S medio diferenciación osteoblástica |
| <b>ALPL</b>  | 0,00            | 1,24                       | -0,84                                      |
| <b>BGLAP</b>   | 0,00            | -1,89                      | -1,13                                      |
| <b>RUNX2</b>   | 0,00            | 0,12                       | 1,70                                       |
| <b>COL1A1</b>  | 0,00            | 2,08                       | -2,16                                      |
| <b>SPP1</b>  | 0,00            | 0,35                       | 5,22                                       |
| <b>BMP2</b>  | 0,00            | -1,32                      | 2,29                                       |
| <b>BMP7</b>  | 0,00            | 2,10                       | -1,74                                      |

**Tabla 21: Tabla de  $\Delta\Delta Ct$  en PCR secundaria. Comparativa de cada gen en relación con su expresión en la pulpa control LB.**

| <b><math>\Delta\Delta Ct</math> respecto a pulpa control LB</b> |                  |                             |   |
|---|------------------|-----------------------------|---|
|   | Pulpa control LB | Pulpa LB medio condicionado | Pulpa LB medio diferenciación osteoblástica |
| <b>ALPL</b>   | 0,00             | -0,89                       | -1,87                                       |
| <b>BGLAP</b>  | 0,00             | 0,16                        | 1,24  |
| <b>RUNX2</b>  | 0,00             | -0,81                       | -0,11                                       |
| <b>COL1A1</b>   | 0,00             | -2,97                       | -4,62                                       |
| <b>SPP1</b>   | 0,00             | -0,90                       | 2,06  |
| <b>BMP2</b>   | 0,00             | 0,87                        | 3,27  |
| <b>BMP7</b>   | 0,00             | -4,14                       | -3,05                                       |

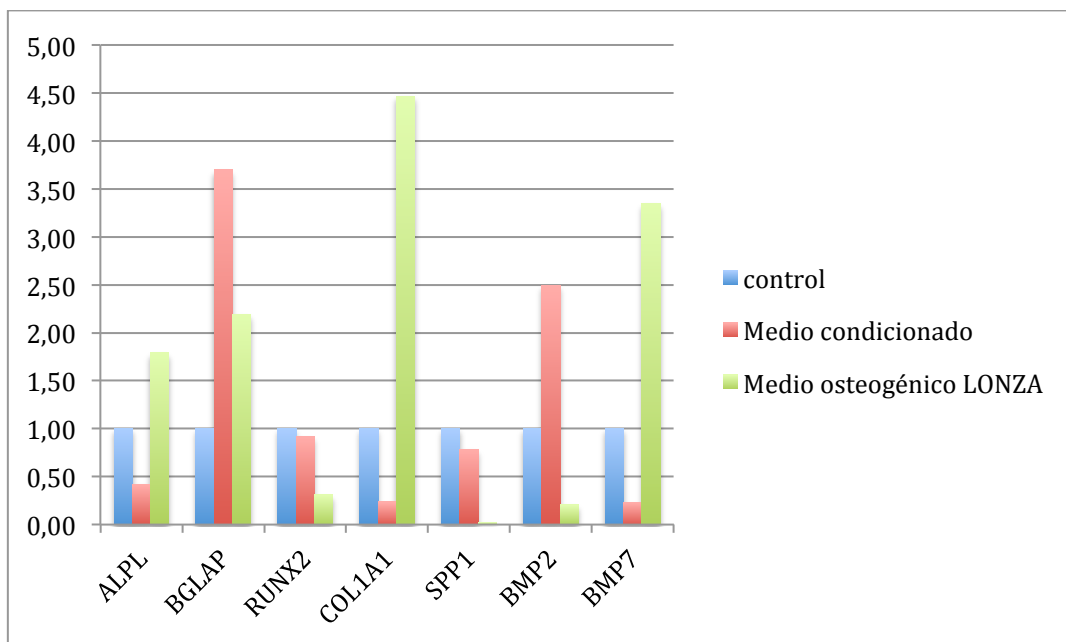
Para eliminar los valores negativos y poder crear una gráfica se realizó un Fold Change o transformación logarítmica de base dos ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Estos resultados se expresan en la Tabla 22 y Tabla 23 y en las Figuras 44 y 45.

**Tabla 22: Cálculos de Fold Change en PCR secundaria ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) para Pulpa S**  
**Fold Change de grupo Pulpa S**

| $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Pulpa control S | Pulpa S Medio condicionado | Pulpa S Medio osteogénico LONZA |
|------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------|
| ALPL                   | 1,00            | 0,42                       | 1,79                            |
| BGLAP                  | 1,00            | 3,70                       | 2,19                            |
| RUNX2                  | 1,00            | 0,92                       | 0,31                            |
| COL1A1                 | 1,00            | 0,24                       | 4,47                            |
| SPP1                   | 1,00            | 0,79                       | 0,03                            |
| BMP2                   | 1,00            | 2,50                       | 0,20                            |
| BMP7                   | 1,00            | 0,23                       | 3,35                            |

**Tabla 23: Cálculos de Fold Change en PCR secundaria ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) para Pulpa LB**  
**Fold changes de Grupo LB**

| $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Pulpa control LB | Pulpa LB medio condicionado | Pulpa LB medio osteogénico LONZA |
|------------------------|------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| ALPL                   | 1,00             | 1,85                        | 3,66                             |
| BGLAP                  | 1,00             | 0,90                        | 0,42                             |
| RUNX2                  | 1,00             | 1,75                        | 1,08                             |
| COL1A1                 | 1,00             | 7,85                        | 24,65                            |
| SPP1                   | 1,00             | 1,86                        | 0,24                             |
| BMP2                   | 1,00             | 0,55                        | 0,10                             |
| BMP7                   | 1,00             | 17,59                       | 8,26                             |



**Figura 44: Gráfica de la expresión génica en la PCR secundaria del Grupo S**

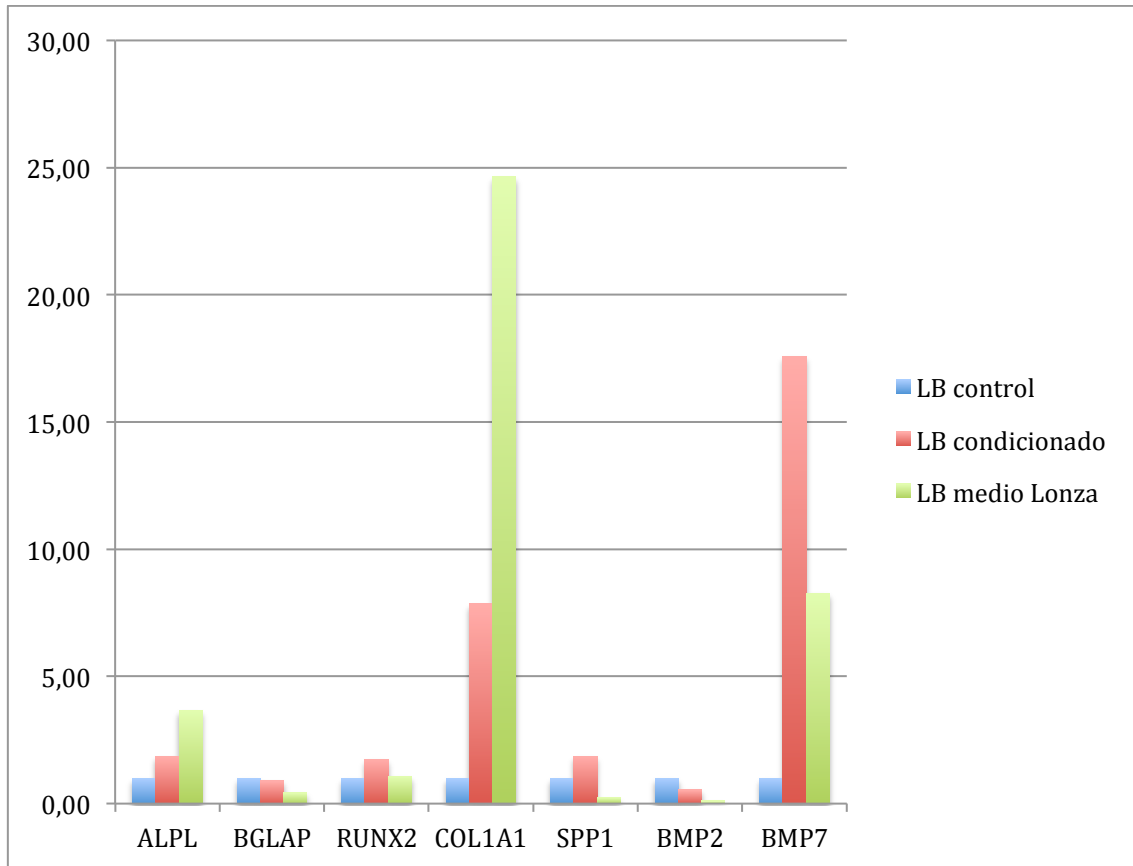


Figura 45: Gráfica de la expresión génica en la PCR secundaria para Grupo LB

Valorando las gráficas de las figuras anteriores, se observa que hay una diferencia más marcada en cuanto a la expresión del gen COL1A1 y BMP7 en cuanto al las células madre sometidas a medio condicionado y a medio de diferenciación.



# **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

---

## VIII. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

El presente estudio demostró la existencia de células madre mesenquimales en la pulpa humana, tomadas de dientes adultos de 18-30 años que muestra una mayor capacidad proliferativa. Esta capacidad hace que estas células se segregen fácilmente, y así se puedan utilizar para la reconstrucción de tejidos con la construcción de bancos celulares.

Se podría poner en entredicho que el uso de más donantes podría producir mucho más datos para el análisis. Sin embargo, aumentar el número de donantes hace que el análisis sea más complicado ya que cada donante tiene un estado diferente (la edad, el tabaquismo, la obesidad, enfermedades metabólicas, la etnia y el género). De hecho, nuestros ensayos iniciales estaban previstos para utilizar más muestras donantes pero los perfiles podrían haber sido inestables debido a estas variables.

Estamos seguros de la obtención de resultados ya que se tomó precaución extrema durante el cultivo celular así como la citometría de flujo, tinción histoquímica y el análisis por PCR para evitar variaciones experimentales. Las precauciones incluyen lo siguiente: (I) El protocolo de aislamiento de células madre de la pulpa dental y de tejido óseo fue siempre el mismo. (II) Las células se cultivaron en medio de crecimiento definido en las mismas condiciones de crecimiento. (III) Antes de cada paso, las células se dejaron crecer hasta 90% de confluencia y se utilizaron para iniciar nuevos cultivos. (IV) Para evitar la variación por parte de operarios, el mismo investigador participó en la realización del aislamiento, el crecimiento y la supervisión del cultivo celular, la citometría de flujo, tinción histoquímica y la determinación del perfil genético.

Debemos ser conscientes de que en un cultivo primario de células siempre hay alguna fracción de algunos de otros tipos celulares. En el caso del cultivo de osteoblastos, la gran mayoría de las células que forman este cultivo primario provienen de células mesenquimales precursoras de osteoblastos del endostio. Estas células pueden encontrarse en fases precoces de diferenciación celular. De ahí que no se caractericen hasta el tercer pase, para asegurarnos que en el subcultivo tenemos el 100% de las mismas células. Sin embargo puede interpretarse que puesto que estos osteoblastos derivan de células madre mantengan en su inmunofenotipo algunos receptores de membrana como vestigio de su origen.

Del mismo modo, dada la magnitud de la heterogeneidad que hay dentro de las líneas de células madre, el aislamiento de poblaciones de células madre homogéneas parece ser una tarea difícil.

De momento no hay un perfil fenotípico celular universalmente aceptado para la caracterización de células madre. Se prefieren los perfiles de expresión genética debido a su relativa facilidad pero varían mucho con el estadio celular y el medio ambiente de manera que no se pueden interpretar fácilmente.

La similitud del inmunofenotipo de osteoblastos y de DPSCs puede deberse a que dichas células se encuentra en el mismo ambiente o nicho y rodeadas de tejido duro por lo que puede que estén predispuestas para convertirse en osteoblastos.

Cabe señalar que la positividad o negatividad de los marcadores en el análisis de citometría de flujo no se pueden utilizar como la confirmación absoluta de células madre aunque el aumento del número de marcadores de superficie estudiados si incrementa la probabilidad de que sean células madre y estima la naturaleza de éstas con

mayor precisión. Por eso en el presente estudio, hemos utilizado las 15 marcadores para citometría de flujo.

Las muestras fueron positivas para CD44, CD90, CD73, CD29, CD59 y el CD105 y negativas para CD11b, CD14, CD20, CD45, CD80, HLA-DR, CD34, CD 66 a/c/e y CD17. De esta manera se cumplían los criterios de la ITSC de células madre. El marcador de células hematopoyéticas, CD34, no se detectó

En cuanto a la expresión genética, dado que la PCR se realiza a la inversa que ocurre en el proceso natural de transcripción en la célula, puede ser que en el citoplasma se hayan RNAm que no tengan por qué ser traducidos a proteínas y que nosotros con el lisado celular y la obtención de este RNA, demos por hecho que ha cumplido su función y que dicha célula expresa de una manera ineludible dicha proteína.

Esto determina que las muestras FM, 0 y FT expresan estos 7 genes estudiados en mayor cantidad que la muestra LB. Dado que estos genes reactivos son los que se expresan normalmente en los osteoblastos, la gráfica ratifica que se hallen más presentes en las muestras FM, 0 y FT que eran muestras óseas que en la muestra LB que eran DPSCs.

Es estudio de perfil genético realizado a posteriori de ser sometidas las DPSCs a medio condicionado y medio de diferenciación osteogénica muestra una clara diferencia en cuanto a la expresión del COL1A1 y la BMP7. Siendo mayor la expresión de COL1A1 en los cultivos con medio diferenciación osteogénica, lo que sería indicativo de osteogénesis. Una menor expresión de este gen en los cultivos con medio condicionado puede deberse a la supresión de la síntesis de esa proteína puesto que la célula la encuentre en el medio. Lo mismo ocurre con el resto de genes para ambos medios en

relación con la pulpa control, la infraexpresión puede deberse a la supresión de la síntesis proteica por encontrarse en el medio y la célula no detectar un déficit ambiental.

Como anotación para trabajos futuros, cabe resaltar, que los factores solubles liberados por las células implantadas pueden desempeñar un importante papel en la regeneración de los tejidos estimulando a las células normales residentes en el sitio lesionado mediante un mecanismo paracrino. Estas proteínas secretadas pueden también actuar de forma autocrina sobre las propias células trasplantadas que las secretan, favoreciendo su proliferación, autorrenovación y la continuidad de sus funciones.

## **ANEXOS**

---

## IX. ANEXOS

### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA EXTRACCIÓN DE CORDALES

Don/Doña

De    años de edad, y D.N.I. N°

Con domicilio en

DECLARO:

Que el Dr./Dra. ....me ha explicado que es conveniente proceder a la EXTRACCIÓN DEL CORDAL en consecuencia, comprendo que no mantendré ese molar y que únicamente, podrá ser sustituido por una prótesis, aunque habitualmente las muelas del juicio no se reponen, por innecesarias.

1. El propósito principal de la intervención es conseguir espacio para que la alineación de los dientes sea correcta, estética, funcionalmente y para evitar infecciones en los tejidos que las circundan (pericoronaritis). Sé que, aunque podría recurrir a técnicas conservadoras como la periodoncia o la endodoncia, las descarto por el estado que presenta, y que hace imposible su conservación.
2. La intervención precisa de anestesia local, de cuyos riesgos también se me ha informado.

3. La intervención consiste en una incisión en la encía y separación de la misma, para tener acceso molar. Si fuera necesario se realizaría eliminación de hueso. De esta manera se podría con un forceps u otro instrumental presionar sobre la corona para poder traccionarla, aunque a veces puede ser necesario cortarla.
  
4. Aunque se me han realizado los medios diagnósticos que se han estimado precisos, comprendo que es posible que el estado inflamatorio del molar que se me va a extraer pueda producir un proceso infeccioso, que puede requerir tratamiento con antibióticos y/o antiinflamatorios, del mismo modo que en el curso del procedimiento puede producirse una hemorragia profusa, que exija, para cohibirla, la colocación en el alveolo de una torunda de algodón seca. También sé que en el curso del procedimiento pueden producirse, aunque no es frecuente, la rotura de la corona, laceraciones en la mucosa de la mejilla o de la tuberosidad, que no dependen de la forma o modo de practicarse la intervención, ni de su correcta realización, sino que son imprevisibles, en cuyo caso el facultativo tomará las medidas precisas y continuará con la extracción.

Se me informa también que, aunque no es frecuente, puede producirse luxación de la articulación temporomandibular e incluso fractura del maxilar, en cuyo caso deberé recibir el tratamiento preciso con un especialista en esa materia y ser revisado para control de este proceso.

También se me ha explicado que, aunque infrecuentemente, y con independencia de la técnica empleada en el procedimiento y de su correcta realización, puede lesionarse el nervio dentario o el nervio lingual, con pérdida de sensibilidad que normalmente es temporal y desaparece en algunas semanas, pero que puede perdurar durante tres a seis

---

meses, raramente, o ser definitiva.

Menos graves resultan las complicaciones infecciosas locales, celulitis, trismo, estomatitis, que suelen poder controlarse farmacológicamente, pero que pueden precisar tratamiento quirúrgico posterior.

5. El Dr./Dra..... me ha explicado que todo acto quirúrgico lleva implícitas una serie de complicaciones comunes y potencialmente serias que podrían requerir tratamientos complementarios tanto médicos como quirúrgicos, y que por mi situación actual (diabetes, cardiopatía, hipertensión, anemia, edad avanzada, obesidad) pueden aumentar riesgos y complicaciones.
6. He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto. Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del tratamiento.

Y en tales condiciones:

CONSIENTO:

que se me EXTRAIGA EL CORDAL

En.....a fecha de.....

Fdo. El odontólogo/a

Fdo. El paciente

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO (sólo firmar si no se va a hacer tratamiento)

Don/Doña

De    años de edad, y D.N.I. N°

Con domicilio en

Revoco el consentimiento prestado en fecha y no deseo proseguir e tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En..... A fecha de:

Fdo. El odontólogo/a

Fdo. El paciente





# BIBLIOGRAFÍA

---

## X. BIBLIOGRAFIA

- (1) Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell* 2007 06/07;1(1):35-38.
- (2) Rodríguez-Lozano F, Insausti C, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez M, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Nov;1(17 (6)e):1062-7.
- (3) Kirchstein RL, Skirboll L. Chapter 1: Stem Cell. In: Department of Health and Human Services, editor. *Stem cells: scientific Progress and Future Research direction*; Junio 2001. p. 1-4.
- (4) Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 2005 09/20;34(5):415-423.
- (5) Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015 02/07;385(9967):509-516.
- (6) Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Moriggl R, Kenner L. Promising new sources for pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2010 03;6(1):15-26.
- (7) Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* 2009 02;15(2):59-68.
- (8) Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991 09;9(5):641-650.
- (9) Arévalo Romero J, Páez Guerrero D, Rogriguez Pardo V. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS JULIO- DICIEMBRE DE 2007;VOL.5 No. 8:101-212.*
- (10) Ramachandran R, Yelledahalli L. Exploring the Recent Advances in Stem Cell Research. *J Stem Cell Res Ther* 2011;1:113.
- (11) Lv F, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2014 06;32(6):1408-1419.
- (12) Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells* 2015 06/26;7(5):839-851.
- (13) Agha-Hosseini F, Jahani M, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant* 2010

03/20;24(2):E23-E28.

(14) Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, et al. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol* 2010 05/08;11:32-32.

(15) Otsuru S, Hofmann TJ, Olson TS, Dominici M, Horwitz EM. Improved isolation and expansion of bone marrow mesenchymal stromal cells using a novel marrow filter device. *Cytotherapy* 2013 2;15(2):146-153.

(16) Cortes Y, Ojeda M, Araya D, Dueñas F, Fernández M,S., Peralta OA. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res* 2013 07/05;9:133-133.

(17) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317.

(18) Karamzadeh R, Eslaminejad M. Dental-Related Stem Cells and Their Potential in Regenerative Medicine. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering* 2013:95.

(19) Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 12/05;97(25):13625-13630.

(20) 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* 2005 08;8(3):191-199.

(21) Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 1999 08;52(4):189-196.

(22) Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, Iyama M, Kobashi M, Maeda K, et al. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 2012 06;227(6):2622-2631.

(23) Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85-116.

(24) Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008 11/15;121:3683-3692.

(25) Zamani F, Zare Shahneh F, Aghebati-Maleki L, Baradaran B. Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Adv Pharm Bull* 2013;3(2):329-332.

- (26) HUGHES F, TURNER W, BELIBASAKIS G, MARTUSCELLI G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology* 2000 2006;41:48–72.
- (27) Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig* 2008 06;12(2):113-118.
- (28) Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH, Le AD. Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2012 11;91(11):1011-1018.
- (29) Ferro F, Spelat R, D'Aurizio F, Puppato E, Pandolfi M, Beltrami AP, et al. Dental pulp stem cells differentiation reveals new insights in Oct4A dynamics. *PLoS One* 2012;7(7):e41774-e41774.
- (30) Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009 09;88(9):792-806.
- (31) Kirchstein R, Skirboll L. Appedix E: Stem Cell Markers. In: Department of Health and Human Services, editor. *Stem cells: scientific Progress and Future Research direction*; Junio 2001. p. 194.
- (32) Baron R. Baron R. 2003. *Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular elements. Chapter 1. General Principles of Bone Biology. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism.* ; 2003. p. 1-8.
- (33) Wheather P, burkitt H, Daniels V. *Funcional Histology.* New York: Churchill Livingsstone; 1987.
- (34) Friedenstein A. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976;47:325-55.
- (35) Harada S, Rodan G. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423:349-55.
- (36) Aubin J. Osteogenic cell differentiation. In: Davies J, editor. *Bone engineering* Toronto; 2000. p. 19-30.
- (37) Masi L, Brandi M. Physiopathological basis of bone turnover. *Q J Nucl Med.* 2001;45:2-6.
- (38) Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla M, Olivares EG, Ruiz C. Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem* 2002;12(5-6):359-364.
- (39) García-Martínez O, Reyes-Botella C, Aguilera-Castillo O, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C. Antigenic Profile of Osteoblasts Present in Human Bone Tissue Sections. *Biosci Rep* 2006;26:39-43.

- (40) Manzano-Moreno F, Bautista Rodríguez-Martínez J, Ramos Torrecillas J, Vallecillo Capilla M, Ruiz C, García Martínez O, et al. Proliferation and osteogenic differentiation of osteoblast-like cells obtained from two techniques for harvesting intraoral bone grafts. *Clin Oral Invest* 2013;17:1349–1356.
- (41) Manzano-Moreno F, Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, Reyes-Botella C, Ruiz C, García-Martínez O. Nitrogen-containing bisphosphonates modulate the antigenic profile and inhibit the maturation and biomineralization potential of osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig* 2014 08/28.
- (42) Gundberg C. The osteocalcin propeptide is not secret in vivo or in vitro. *J Bone Miner res* 1992;7:73-80.
- (43) Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 2003;44 Suppl 1:109-116.
- (44) van Dijk F,S., Huizer M, Kariminejad A, Marcelis CL, Plomp AS, Terhal PA, et al. Complete COL1A1 allele deletions in osteogenesis imperfecta. *Genet Med* 2010 11;12(11):736-741.
- (45) MUNDY, GR.,BOYCE, B., HUGHES, D.,WRIGHT, K., BONEWALD L, DALLAS S, HARRIS S. **The Effects of Cytokines and Growth Factors on Osteoblastic Cells.** *Bone Vol. , No. , Supplement* 1995;17(2):71-75.
- (46) Abdallah B, et al. Skeletal (stromal) stem cells: An update on intracellular signaling pathways controlling osteoblast differentiation, *Bone* 2014.
- (47) PECK WA, BIRGE SJ, J., FEDAK SA. Bone Cells: Biochemical and Biological Studies After Enzymatic Isolation. *Science* 1964 12/11;146(3650):1476-1477.
- (48) Beresford J, Gallagher J, Poser J, Russell R. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, parathyroid hormone and glucocorticoids. *Metab bone dis relat res* 1984;5:229-334.
- (49) Robey P, Termine J. Human bone cells in vitro. *Calcif tissue int* 1985;37:453-60.
- (50) Robey P. Collagenase, treated trabecular bone fragments: a reproducible source of cells in the osteoblastic lineage. *Calcif tissue Int* 1995;56(Suppl 1):S11-2.
- (51) Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 1987 09/15;47(18):4961-4966.
- (52) L. F. Acevedo Olvera. Estandarización de las condiciones de cultivo para la obtención, caracterización y diferenciación de células troncales mesenquimales a osteoblastos de pacientes con osteosarcoma.; 2010. México.

- (53) ME Navarro Toro. Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea Ingeniería Química por la Universitat Politècnica de Catalunya; Abril 2005.
- (54) Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Caffesse RG, Sanz M, et al. 17beta-Estradiol Promotes Cementoblast Proliferation and Cementum Formation in Experimental Periodontitis. *J Periodontol* 2010 07;81(7):1064-1074.
- (55) Zhang L, Qi J, Zuo G, Jia P, Shen X, Shao J, et al. Osteoblast-secreted factors promote proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells via VEGF/heme-oxygenase-1 pathway. *PLoS One* 2014 06/18;9(6):e99946-e99946.
- (56) Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-554.
- (57) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968 10;61(2):748-755.
- (58) Kweider N, Fragoulis A, Rosen C, Pecks U, Rath W, Pufe T, et al. Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2): implications for preeclampsia. *J Biol Chem* 2011 12/16;286(50):42863-42872.
- (59) Bussolati B, Ahmed A, Pemberton H, Landis RC, Di Carlo F, Haskard DO, et al. Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood* 2004 02/01;103(3):761-766.
- (60) Vanella L, Kim DH, Asprinio D, Peterson SJ, Barbagallo I, Vanella A, et al. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. *Bone* 2010 01;46(1):236-243.
- (61) Barbagallo I, Vanella A, Peterson SJ, Kim DH, Tibullo D, Giallongo C, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J Bone Miner Metab* 2010 05;28(3):276-288.
- (62) Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Biol* 2007 05/07;177(3):489-500.
- (63) Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, Gödecke A, Helfrich MH, Reid DM, et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* 2001 02;142(2):760-766.
- (64) Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999 12/03;286(5446):1946-

1949.

(65) Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Bjelic-Radisic V, Lanzer G, et al. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med* 2007 07;2(4):371-382.

(66) S. Ruiz Gaspà. Cultivo primario para el estudio de la función osteoblástica <br /> /> Universitat Autònoma de Barcelona; (2006).

(67) MESEGUER OLMO L, BERNABEU ESCLAPEZ A, CLAVEL-SAINZ NOLLA M, MUÑOZ RUIZ-SEIQUER J. <br /> AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS.. *Rev Esp Cir Osteoart* 1994;29:235-240.

(68) Karaöz E, Dogan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol* 2010 01;133(1):95-112.

(69) Kirchstein R, Skirboll L. Appedix A: Early Development. In: Department of Health and Human Services, editor. *Stem cells: scientific Progress and Future Research direction*<br /><br /> ; Junio 2001. p. 136.

(70) Akpınar G, Kasap M, Aksoy A, Duruksu G, Gacar G, Karaoz E. Phenotypic and proteomic characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells from a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem Cells Int* 2014;2014:457059-457059.

(71) Ardila Medina C. *Efecto potencial de la simvastatina en la regeneración tisular* Av Periodon Implantol 2013;25(1):11-16.

(72) Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003 12;82(12):976-981.

(73) Carini F, Menchini Fabris GB, Biagi E, Salvade A, Sbordone L, Baldoni M. Estudio experimental sobre la utilización de células madre humanas en la terapia de los defectos periodontales: resultados preliminares. *Avances en periodoncia e implantología oral* 2011;23(2):97-107.

(74) Chen M, Qu Q, Shen T, Zhang S, Chen C. [Expression of cell surface antigens during the differentiation of osteoblast by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2007 02;29(1):62-66.

(75) Dahl M, Jørgensen NR, Hørberg M, Pinholt EM. Carriers in mesenchymal stem cell osteoblast mineralization - State-of-the-art. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2014;42(1):41-47.

(76) d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009

07/15;312B(5):408-415.

(77) Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia M, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E47-51.

(78) Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia M, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E151-7.

(79) Gutierrez G. Regulación paracrina. Manual práctico de: osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral; 2004. p. 13-18.

(80) Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 1990 01/15;186(2):133-150.

(81) He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:707-713.

(82) Ilmer M, Karow M, Geissler C, Jochum M, Neth P. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2009 09;15(9):2397-2409.

(83) Juopperi TA, Schuler W, Yuan X, Collector MI, Dang CV, Sharkis SJ. Isolation of Bone Marrow-Derived Stem Cells using Density-Gradient Separation. *Exp Hematol* 2007 2;35(2):335-341.

(84) Kerachian MA, Cournoyer D, Harvey EJ, Chow T, Séguin C. Isolation and characterization of human bone-derived endothelial cells. *Endothelium* 2007 03/20;14(2):115-121.

(85) Khan WS, Hardingham TE. The characterisation of mesenchymal stem cells: a stem cell is not a stem cell is not a stem cell. *J Stem Cells* 2012;7(2):87-95.

(86) Komori T. Regulation of Osteoblast and Odontoblast Differentiation by RUNX2 J. *Oral Biosci.* 2010;52(1):22-25.

(87) Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* 2006 05;17(3):511-515.

(88) López González D, GD, R., O, R., Muntión S, Pescador Hernández D, Sánchez-Guijo F, et al. Characterization of stem cells from nucleus pulposus of cervical intervertebral disc and compared with bone marrow cells from the same patients *Trauma Fund MAPFRE* 2014;15(3):127-135.

- (89) Martacic JD, Francuski J, Luzajic T, Vukovic N, Mojsilovic S, Drndarevic N, et al. Characterization of deciduous teeth stem cells isolated from crown dental pulp. *Vojnosanit Pregl* 2014 08;71(8):735-741.
- (90) Matsumoto et al. Calcium Ions Released from Mineral Trioxide Aggregate Convert the Differentiation Pathway of C2C12 Cells into Osteoblast Lineage. *JOE* 2013;39,(Number 1, January):68–75.
- (91) Miron RJ, Saulacic N, Buser D, Lizuka T, Sculean T. Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP2 and TGF  $\beta$ 1. *Clin Oral Invest* 2013;17:981–988.
- (92) Mori G, Brunetti G, Oranger A, Carbone C, Ballini A, Lo Muzio L, et al. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2011 11;1237:47-52.
- (93) Mori G, Centonze M, Brunetti G, Ballini A, Oranger A, Mori C, et al. Osteogenic properties of human dental pulp stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 2010 04/20;24(2):167-175.
- (94) Mundy G. Local control of osteoclast function. *Osteoporos Int* 1993;1:126-7.
- (95) Muñoz C, Teodosio C, Mayado A, Amaral AT, Matarraz S, Bárcena P, et al. Ex vivo identification and characterization of a population of CD13(high) CD105(+) CD45(-) mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem Cell Res Ther* 2015 09/07;6(1):169-169.
- (96) Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod* 2009 11;35(11):1536-1542.
- (97) Peters EB, Christoforou N, Moore E, West JL, Truskey GA. CD45+ Cells Present Within Mesenchymal Stem Cell Populations Affect Network Formation of Blood-Derived Endothelial Outgrowth Cells. *Biores Open Access* 2015 01/01;4(1):75-88.
- (98) Phedy P. Mesenchymal stem cells: Source of isolation, survival in hydroxyapatite-calcium sulphate, and effect in healing of bone defect. *Clin Biochem* 2011 9;44(13, Supplement):S295.
- (99) Pierini M, Dozza B, Lucarelli E, Tazzari PL, Ricci F, Remondini D, et al. Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Cytotherapy* 2012 07;14(6):686-693.
- (100) Ponnaiyan D, Jegadeesan V. Comparison of phenotype and differentiation marker gene expression profiles in human dental pulp and bone marrow mesenchymal stem cells. *Eur J Dent* 2014 07;8(3):307-313.

- (101) Recker R, Barger-Lux M. Chapter 30. General Principles of bone biology. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. In: American society for bone and mineral research, Washington DC, editor. Bone Biopsy and Histomorphometry in Clinical Practice.; fifth edition, 2003. p. 213-219.
- (102) Saito M, Karakida T, Yamamoto R, Nagano T, Yamakoshi Y, Hayakawa T, et al. Differentiation potential of osteoblast from cultured C2C12 cells on zirconia disk. Dent Mater J 2014;33(2):275-283.
- (103) Sampalo Lainz A, López Gómez M. [Monoclonal antibodies and differentiation antigen groups: study methods and their applications to diagnostic use]. Med Clin (Barc) 1992 05/30;99(1):30-36.
- (104) Serrano S, Mariñoso M. Bases histológicas de histomorfometría ósea. In: Serrano S, Aubia J, Mariñoso M, editors. Patología Ósea Metabólica; 1990 Doyma Barcelona. p. 55-70.
- (105) C. Vicario Espinosa. EL EFECTO OSTOINDUCTOR DE LA MATRIZ DE LOS ALOINJERTOS: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CULTIVOS DE OSTEOBLASTOS HUMANOS ; 2003. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina.
- (106) Yeh LC, Lee JC. Osteogenic protein-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells. Mol Cell Endocrinol 1999 07/20;153(1-2):113-124.
- (107) Ziegler-Heitbrock H, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. Immunol Today 1993 03;14(3):121-125

