

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III



**“AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES OBTENIDAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL”**

MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TRABAJO FIN DE MASTER

Alumna:

Alba Forteza López

Tutor:

Prof. Dr. Luis Blanco Jerez

Madrid, 2017

MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

**COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN
Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)**

CENTRO: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Odontología

ESTUDIANTE DE MÁSTER: Ciencias Odontológicas

TUTOR/ES DEL TFM: Dr. D. Luis Blanco Serez

TÍTULO DEL TFM: Aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales osteoides del ligamento periodontal.

FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA:

FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA (en caso de producirse):

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en Ciencias Odontológicas en y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

2. Colaboración mutua

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

3. Normativa

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

4. Obligaciones del estudiante de Máster

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

5. Obligaciones del tutor/es del TFM

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

6. Buenas prácticas

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del

tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

8. Confidencialidad

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

9. Propiedad intelectual e industrial

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

10. Periodo de Vigencia

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:



- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre



su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

Firmado en Madrid, a 9 de Julio de 2017

<p>El estudiante de Máster</p>  <p>Fdo.: Alvaro Fortea López.</p>	<p>El Tutor/es</p>  <p>Fdo.: Luis Blanco Jerez</p>
--	---

SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. ALBA FORTeza LÓPEZ
con NIF 51127428-S, estudiante de Máster en la Facultad de
ODONTOLOGÍA de la Universidad Complutense de Madrid en el
curso 2016 -2017, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado
Aislamiento, cultivo y caracterización de células madre
mesenquimales óseas del ligamento periodontal
y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son:
Dr. D. Luis Blanco Jerez

DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente. De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 9 de Julio de 2017

Fdo.:



Alba Forteza López

Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
VISTO BUENO DEL TUTOR
MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:

Luis Blanco Perez

del alumno/a

Nombre y apellidos

ARBA FORTeza López

encuadrado en la línea de investigación

Ingeniería Tisular

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Aislamiento, cultivo y caracterización de células madre obtenidas del ligamento periodontal.

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid, a 9 de Junio de 2017.

Fdo: el profesor/a

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel

Agradecimientos:

A mis padres, porque en cada uno de mis logros ellos han sido, son y serán mi gran impulso. A mi hermano, por apostar siempre por mí y por ser el reflejo de lo que me gustaría llegar a ser. A los que ya no están aquí, porque dejasteis el listón muy alto en la vida y superaros no va a ser fácil. A mi tutor, el Prof. Dr. Luis Blanco Jerez por su entusiasmo y por compartir conmigo sus conocimientos. Al Prof. Dr. Jose Antonio Uranga Ocio por su paciencia, dedicación incondicional y por inculcarme su pasión por la investigación. A todos aquellos amigos y compañeros de vida y de profesión, porque habéis vivido mi alegría y mi frustración como si también fueran vuestros, contribuyendo a que todo el esfuerzo hoy tenga resultado.

De todo corazón, gracias.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
1. <i>Ingeniería tisular.....</i>	<i>2</i>
2. <i>Células madre, características generales.....</i>	<i>4</i>
2.1. <i>Células madre embrionarias, pluripotenciales inducidas y postnatales.....</i>	<i>5</i>
2.1.1. <i>Células madre postnatales mesenquimales.....</i>	<i>6</i>
2.1.1.1. <i>Células madre mesenquimales obtenidas del Ligamento Periodontal.....</i>	<i>7</i>
3. <i>Factores de crecimiento celular.....</i>	<i>10</i>
4. <i>Estrategias de cultivo y diferenciación celular.....</i>	<i>12</i>
4.1. <i>Cultivo en medio reconstituido.....</i>	<i>12</i>
4.2. <i>Cultivo en medio de diferenciación comercial.....</i>	<i>12</i>
4.3. <i>Cultivo en medio condicionado por células diferenciadas.....</i>	<i>13</i>
II. Justificación	14
III. Hipótesis de trabajo.....	14
IV. Objetivos.....	14
<i>Objetivos generales.....</i>	<i>14</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>14</i>
V. Material y método.....	15
VI. Resultados.....	20
VII. Discusión.....	24
VIII. Conclusiones.....	27
IX. Anexos.....	28
1. <i>Cuestionario de salud para el paciente.....</i>	<i>28</i>
2. <i>Consentimiento informado para participar en el estudio de investigación clínica.....</i>	<i>30</i>
3. <i>Aprobación del Protocolo por parte del Comité Ético de Investigación Clínica.....</i>	<i>36</i>
X. Bibliografía.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS:

FIGURA 1: CITOMETRÍA DE FLUJO EVALUADA EN LAS CUATRO LÍNEAS DE PDLSCs.....	20
FIGURA 2: MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA CD73.....	21
FIGURA 3: MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA CD90.....	21
FIGURA 4: MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA CD105.....	21
FIGURA 5: MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA HLA-DR.....	21
FIGURA 6: TINCIÓN POSITIVA PARA FOSFATASA ALCALINA.....	22
FIGURA 7: CONTROL NEGATIVO DE PDLSCS.....	22
FIGURA 8: TINCIÓN POSITIVA PARA OIL RED.....	23

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN:

La restitución de tejidos perdidos por causas patológicas en el organismo humano, ha sido siempre motivo de investigación en las distintas áreas del conocimiento en Medicina. Concretamente, en el campo de la Estomatología, la posibilidad de rehabilitar los tejidos orales ausentes se presenta como un auténtico reto.

En este sentido, tradicionalmente, el intento por restablecer el hueso perdido, ha intentado suplirse mediante el uso de injertos de diversa naturaleza aprovechando su capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora según el tipo. Sin embargo, las mayores tasas de reabsorción, la morbilidad derivada del aislamiento de los injertos autólogos, la hospitalización en caso de injertos autólogos extraorales o las menores tasas de éxito en xenoinjertos e injertos aloplásticos son algunos de los inconvenientes que se reportan con más frecuencia en la literatura científica (Del Fabbro M et al., 2004).

Por otra parte, no es inusual que el profesional se encuentre con una disponibilidad limitada de tejidos autólogos, de tal manera, que el volumen de injerto acaba por ser limitado en comparación con el defecto a cubrir (Zouhary, 2010).

Las restricciones existentes en la aplicación de células somáticas en este campo, están relacionadas con su potencial limitado así como con la ausencia, por el momento, de métodos fiables, reproducibles y repetibles que dirijan a estas células hacia un linaje específico evitando a su vez el crecimiento incontrolado de las mismas y la formación tumoral. No obstante, su investigación en profundidad con sucesivos estudios *in vitro* y en animales, podrían constituir en un futuro no muy lejano, una alternativa a los actuales métodos regenerativos en pacientes oncológicos, rehabilitaciones tras traumatismos o en pacientes afectos de malformaciones congénitas (García-Godoy y Murray et al., 2006).

1. Ingeniería tisular:

La Ingeniería Tisular, es aquel área de la Ciencia contemporánea que, tiene como fin el desarrollo de procedimientos para la formación de nuevos tejidos que sean capaces de reemplazar a los dañados, tanto en estructura como en función, basándose en los principios de la Biología Celular y la Ciencia de los Biomateriales. Ante la presencia de problemas biológicos, trata de propiciar la búsqueda de soluciones biológicas, enfocando la capacidad regenerativa de la célula en sí misma (Slavkin et al., 2006).

La terapéutica reconstructiva, podría considerarse que se inicia de la mano de Gaspare Tagliacozzi, profesor de Cirugía en Bolonia, quien en 1597 publica su libro "*De Curtorum Chirurgia per Insitionem*" en el que explica la técnica y procedimientos llevados a cabo en una rinoplastia a partir de un injerto autólogo. Este proceso requería de la obtención de un colgajo del brazo del paciente que se suturaba directamente a la nariz, quedando inmovilizado y unido hasta que el colgajo revascularizase y prendiese en el lecho receptor, tiempo que se estimaba de unas 3 semanas (Tagliacozzi G., 1597).

A pesar de estos tempranos inicios, es necesario recalcar que, la terapéutica resectiva, ha sido tradicionalmente considerada como norma hasta hace no mucho tiempo. Más recientemente, la atención ha tratado de re-direccionarse hacia terapias regenerativas y reconstructivas que aportasen una mayor calidad de vida, función y estética en el paciente. Con el objetivo de inducir a la regeneración ósea, injertos de diverso origen, factores de crecimiento y factores de diferenciación celular, han sido ampliamente estudiados y discutidos en la literatura científica (Danesh-Sani SA et al., 2016; Ding Z et al., 2016). Sin embargo, ninguna consideración actual en el campo de la regeneración podría ser entendida a día de hoy, sin tener en cuenta la aplicación conjunta con células madre (Castillo-Cardiel G et al., 2016).

Mientras que el uso de células madre embrionarias continúa siendo un tema controvertido desde el punto de vista bioético, el aislamiento, cultivo y aplicación de células madre mesenquimales (CMM) que reside en la mayoría, si no es en todos, los tejidos adultos, está cobrando especial importancia.

En cuanto a los requerimientos necesarios para generar un tejido a partir de Ingeniería Tisular con células madre, la literatura es unánime: 1.) Presencia y número suficiente de células madre responsables de la regeneración 2.) Un apropiado nivel y secuencia de señales regulatorias (factores de crecimiento, citoquinas y hormonas) 3.) Un buen aporte sanguíneo 4.) Matriz extracelular o un soporte apropiado (Bartold PM et al., 2000; Slavkin et al., 2006; Giannoudis et al., 2007).

En a lo que matrices se refiere, éstas se utilizan a modo de esqueleto creando un andamiaje específico para permitir el desarrollo y proliferación celular. Típicamente estas matrices pueden clasificarse según su naturaleza en: sintéticas o naturales. Las naturales, más novedosas, se forman a partir del tratamiento de estructuras biológicas tales como órganos u arterias con sustancias detergentes que eliminan el componente celular de las mismas, conservando únicamente el armazón biológico. La introducción de células madre en estas matrices extracelulares, junto con un apropiado nivel de factores de crecimiento y citoquinas, permiten inducir su diferenciación hacia linajes celulares específicos. Estudios recientes, han logrado conseguir diferenciación celular hacia células cardíacas y hepáticas en corazón e hígado respectivamente procedente de ratas y a células endoteliales en arterias de origen ovino (Ng SL et al., 2011; Wang Y et al., 2011; Zhang W et al., 2016).

2. Células madre, características generales:

Las células madre, se definen como células con capacidad de autorrenovación, multidiferenciación y mantenimiento a lo largo de toda la vida del individuo. En el organismo adulto, diferentes tejidos mantienen una pequeña población de células multipotenciales con capacidad de proliferar y diferenciarse hacia los diversos tipos celulares del tejido al que pertenecen. Estas células se encargan de regenerar el órgano o tejido conforme las células que lo componen mueren por apoptosis o tras un daño tisular (Kaji EH et al., 2001).

En cuanto a su clasificación, las células madre, pueden categorizarse según sea, su origen: embrionarias y postnatales o adultas, su potencial de diferenciación: totipotencial (capaces de generar un embrión y, por ende, un individuo completo, pudiéndose diferenciar a cualquier estirpe celular), pluripotencial (capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular a excepción de células formadoras de tejido extraembrionario: cordón umbilical y placenta), multipotencial (capacidad de especializarse en un subconjunto de grupos celulares de la misma capa germinal embrionaria. Un ejemplo de ello, serían las células madre postnatales mesenquimales) y unipotencial (capacidad de diferenciarse en un único tipo celular). Igualmente, la clasificación puede atender al tejido sobre el que se asientan, también referido en términos más técnicos como “nicho” (Liras A et al., 2010).

El proceso de desarrollo de un organismo, implica múltiples pasos de diferenciación celular. Durante este complejo proceso, las células van perdiendo su potencial de diferenciación al tiempo que adquieren la identidad epigenética característica del nuevo tipo celular generado. Tradicionalmente, se había asumido que este proceso de diferenciación celular tanto en células madre embrionarias como en adultas era irreversible. Así, en 1957 Waddington representó gráficamente el concepto de “irreversibilidad celular” situando a la célula madre en la cima de una colina en donde a lo largo del descenso el camino que tomaba representaba la elección (o especificación) celular terminando en la base de la colina como una célula diferenciada que había adquirido una identidad epigenética irreversible (Waddington CH., 1957).

Sin embargo, desde hace ya algunos años, se ha observado un comportamiento específico en estas células que, aunque no en todas se ha podido demostrar que se produzca, parece romper con el dogma de la irreversibilidad celular. Dicho fenómeno se conoce bajo el término de “plasticidad celular” y que se ha definido como la conversión de una célula de un linaje tisular específico a una célula de otro tejido completamente distinto, con la adquisición de marcadores y funciones del linaje celular al que se ha transdiferenciado por influencia de factores ambientales adecuados de los que se rodea (Wagers AJ et al., 2004).

Las primeras evidencias sobre la existencia de fenómenos de plasticidad celular fueron llevadas a cabo en tejido hepático. En donde el análisis de hígados de ratones hembra irradiados y a los que posteriormente se transplantaron células de médula ósea procedente de ratones macho mostró la presencia de hepatocitos con el cromosoma Y en su genoma (Theise ND et al., 2000). Estos resultados, fueron corroborados posteriormente en humanos que habían sido sometidos a trasplante de médula ósea, en donde se demostró que hepatocitos y colangiocitos pueden proceder de la conversión de células madre de origen extra-hepático, probablemente de médula ósea (Theise ND et al., 2000).

2.1. Células madre embrionarias, pluripotenciales inducidas y postnatales:

Las células madre embrionarias son producidas a partir de la fecundación del óvulo. De 4 a 5 días después de la fecundación, se forma el blastocisto, de donde derivan las células madre embrionarias con capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro* y que constituyen la primera fuente de células pluripotenciales, esto es que pueden diferenciarse para generar cualquier tipo celular, a excepción del tejido extraembrionario (cordón umbilical y placenta) (Lutolf MP et al., 2009; Liras A. et al., 2010; Du M. et al., 2015).

Por otro lado, las células madre pluripotenciales inducidas podrían considerarse como una variante de las células madre embrionarias desarrolladas por reprogramación genética producidas a partir de la inducción de la expresión de varios genes exógenos que son capaces de des-diferenciar a una célula ya diferenciada. De este modo, las pluripotenciales inducidas disponen de características comparables a las células madre embrionarias, como sus perfiles de expresión genética o su naturaleza pluripotente, sin los inconvenientes bioéticos de las células embrionarias. Se ha podido observar, cómo estas células son capaces de diferenciarse en osteoblastos con la ayuda de Factor de Crecimiento Transformante tipo Beta (TGF-B), Factor de Crecimiento Fibroblástico Beta (FGF-B) o Proteína Morfogenética Ósea-2 (BMP-2) (Li F et al., 2012).

Sin embargo, al igual que ocurre con las células madre embrionarias, la ausencia de métodos que dirijan a estas células hacia un linaje específico de manera fiable, repetible, reproducible y que eviten el riesgo de formación tumoral, restringe su posibilidad de uso en humanos (Zhang G et al., 2012), por lo que parece ser que su única ventaja evidente a día de hoy es el aspecto bioético.

Otro tipo de célula madre, lo constituyen las células madre postnatales. Son células indiferenciadas, que se encuentran entre células diferenciadas en un tejido u órgano de un individuo adulto. Éstas pueden renovarse y diferenciarse en tipos celulares especializados en función del tejido del que se

rodean (nicho). Por tanto, actúan como reservorios naturales de reemplazamiento de células, jugando un papel fundamental en la homeostasis y en la reparación de los tejidos (Liras A et al., 2010).

En este sentido, el uso de células madre postnatales presenta ciertas ventajas desde un punto de vista ético, frente a las embrionarias y a las células inducidas pluripotenciales cuya aplicación, como ya ha sido comentado, es aún controvertida debido al riesgo de formación tumoral.

2.1.1. Células madre postnatales mesenquimales:

Las células madre postnatales mesenquimales (CMM) inicialmente se aislaron a partir de aspirados de médula ósea y fueron descritas por primera vez por Friedenstein como una subpoblación de células fibroblastoides que en cultivo, formaban agrupaciones clonogénicas adherentes al plástico con amplia capacidad de replicación *in vitro* y con capacidad de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein et al., 1970).

El término de células madre mesenquimales, fue originariamente creado considerándolas como el teórico progenitor común de un amplio rango de tejidos de origen mesenquimal. Estudios recientes, parecen demostrar que las CMM residen en una gran variedad de tejidos embrionarios, postnatales y órganos tanto extraorales como intraorales. Además de la médula ósea, fuente más común de obtención, se han logrado aislar en tejido adiposo (Salmerón C et al., 2016), músculo esquelético (Uezumi A et al., 2016), páncreas (Larijani B et al., 2015), placenta (Zhang Y et al., 2004), membrana sinovial (Mak J et al., 2016), líquido sinovial (Harvanová D. et al., 2011), cordón umbilical (Yan C et al., 2015), sangre menstrual (Chen JY et al., 2015), dermis, epidermis (Forni MF et al., 2015), gelatina de Wharton del cordón umbilical (Wang HS et al., 2004), tejido pulmonar (Gong X et al., 2014), vena safena (Covas DT et al., 2005), hígado (Heidari B et al., 2013), tejido cervical (Montesinos JJ et al., 2013) y en la membrana de Schneider de los senos paranasales (Berbéri A et al., 2016). En el órgano dentario se ha logrado aislar en pulpa (Gronthos S et al., 2000; Miura M et al., 2003; Perry BC et al., 2008; Paino et al., 2010; Sugiyama M et al., 2011), tejido gingival (Zhang Q et al., 2009; Egusa H et al., 2010; Tang L et al., 2011), ligamento periodontal (Seo BM et al., 2004; Singhatanadgit W et al., 2009; Zheng W et al., 2009; Park JC et al., 2011), hueso alveolar (Matsubara T et al., 2005; Akintoye SO et al., 2008), papila apical (Sonoyama W et al., 2006), folículo dental (Morszeck C et al., 2005; d'Aquino R et al., 2011) y tejido periapical inflamado (Liao J et al., 2011).

En los últimos años, ha empezado a existir un incremento en el interés por las CMM debido a su plasticidad y potencial uso en el campo terapéutico (Chen Y et al., 2008; d'Aquino R et al., 2011).

Así, Avilés y colaboradores en su estudio realizado en 2004 con células madre extraídas de la médula ósea y aplicadas sobre pacientes afectados de Infarto Agudo de Miocardio demuestran que su aplicación se trata de un proceso factible y seguro (Avilés F.F et al., 2004). Sin embargo, esta opinión trae controversias al respecto, que demandan la necesidad de un soporte experimental *in vivo* suficiente que permita su aplicación con completa garantía en el campo terapéutico (Bianco et al. 2013).

Desde los inicios de los estudios con CMM en los los 60, multitud de avances se han ido sucediendo en este campo. El interés biológico y clínico en CMM se ha incrementado considerablemente en las dos últimas décadas. Sin embargo, la heterogeneidad en los procedimientos de aislamiento y cultivo de CMM así como la ausencia de un protocolo de identificación universalmente aceptado que las defina, ha llevado a la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) a establecer los siguientes tres criterios que permitan definir a las CMM con una identidad más concreta (Dominicci M et al., 2006):

- 1.) **Adherencia al plástico:** las CMM deben presentar adherencia al plástico cuando son mantenidas bajo condiciones de cultivo estándar (Atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y a 37° C de temperatura) usando frascos de cultivo tisular.
- 2.) **Expresión de antígenos (Ag) de superficie específicos:** el 95% o más de la población de CMM debe expresar antígenos de superficie específicos, concretamente, deben ser positivos para CD105, CD73 y CD90 medidos mediante citometría de flujo. Adicionalmente, deben ser negativos ($\leq 2\%$ positivos) para los marcadores CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79 α ó CD19 y HLA-DR.
- 3.) **Diferenciación multipotencial demostrable:** refiriéndose con ello, a la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones estándar de diferenciación *in vitro* (Dominicci et al., 2006).

2.1.1.1. Células madre mesenquimales obtenidas del ligamento periodontal:

El ligamento periodontal (LP), es el tejido blando con un gran componente celular y altamente vascularizado que rodea las raíces de los dientes y conecta el cemento radicular con la pared del alveolo. Presenta un espesor aproximado de 0.25mm (entre 0.2 y 0.4mm), y su presencia, permite que las fuerzas generadas durante la función masticatoria y otros contactos dentarios se distribuyan sobre la apófisis alveolar y sean absorbidas por ésta mediante el hueso alveolar propiamente dicho (Lindhe J et al., 2008).

Se ha podido observar que, a pesar de la proximidad al hueso y la aplicación de una alta amplitud de fuerzas físicas, las células del LP son capaces de expresar factores reguladores que mantienen la anchura del ligamento periodontal durante la vida adulta (Lekic P. et al., 2001).

El LP se encuentra formado por una heterogénea población de células que se encuentran en diferentes fases de diferenciación y cuya función precisa es aún pobremente entendida. Igualmente de desconocida, es la cantidad de células presentes en este tejido con potencial para presentar propiedades multipotenciales. Estas poblaciones celulares, experimentan una renovación extensa y se encuentran principalmente localizadas alrededor de los vasos sanguíneos del ligamento periodontal (Gould TR et al., 1977) y en los espacios endosóeos del hueso alveolar (McCulloch C et al., 1987). Estas células, proliferan y migran para producir células diferenciadas que son capaces de sintetizar hueso, cemento y matriz extracelular de LP tanto de manera fisiológica como ante la presencia de daño tisular (Palmer RM et al., 1987).

Por lo tanto, el LP no sólo cumple una importante función de soporte del diente, sino que también contribuye a la nutrición, mantenimiento de la homeostasis y reparación del tejido dañado. La capacidad de las células del LP para reparar y mantener la homeostasis tisular, implica que, entre esta extensa población celular, sea posible aislar colonias de células madre (Seo BM et al., 2004; Singhatanadgit W et al., 2009; Zheng W et al., 2009; Park JC et al., 2011).

Debido a la relevancia que ha adquirido las CMM en el campo de la regeneración y su posibilidad para aislarse a partir del ligamento periodontal, varios estudios son los que han evaluado la expresión de diversos marcadores de superficie coincidentes con los propuestos desde la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Las PDLSCs, han resultado positivas para los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD117, CD123, CD146, CD166 y STRO-1. De la misma manera, estas células presentan una expresión negativa para los marcadores hematopoyéticos CD34 (marcador de células madre hematopoyéticas), CD45 (marcador pan-leucocitario), CD14 (marcador de monocitos/macrófagos), CD19 (marcador de las células B) y HLA-DR (Complejo Mayor de Histocompatibilidad). La ausencia de expresión de estos marcadores, resulta crítico a la hora de identificar a las CMM (Dominicci et al., 2006; Gay IC et al., 2007; Nuñez J et al., 2012; Saito MT et al., 2014; Vasandan AB et al., 2014).

Ha sido ampliamente demostrado que estas células son capaces de proliferar y migrar para producir células diferenciadas como osteoblastos y que, bajo condiciones específicas, pueden formar nódulos mineralizados *in vitro*, aunque en menor cantidad que en el caso de células madre postnatales obtenidas de pulpa dental adulta (DPSCs), dientes exfoliados temporales (SHED) y médula ósea

(BMSSCs) (Seo BM et al., 2004). Además, se ha podido comprobar que son capaces de expresar una serie de marcadores osteoblásticos, entre los que se incluyen fosfatasa alcalina (ALPL), sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OSC), osteopontina (OPN), proteína morfogenética ósea tipo 2 (BMP 2) y factor de crecimiento transformante beta 1(TGFB1) (Lekic P. et al., 2001;Seo et al., 2004; Gronthos S. et al., 2006).

Además de la capacidad de las PDLSCs para ser inducidas a células formadoras de hueso, cemento y colágeno, se ha visto que someténdolas a determinadas condiciones de cultivo, presentan capacidad para diferenciarse también en células neurales, miofibroblastos, adipocitos y condrocitos, demostrando ser una población interesante por su capacidad para expresar un genotipo mesodérmico (Gay et al., 2007; Techawattanawisal et al., 2007).

Por otro lado, la capacidad multipotencial de las PDLSCs parece mantenerse intacta aunque estas se sometan a criopreservación como sucede con el resto de CMM de diferentes orígenes. Así quedó demostrado con el estudio de Seo y colaboradores en 2004, en el que explican que aunque la cantidad de PDLSCs obtenidas en las muestras criopreservadas se correspondieron al 40% de lo que se obtiene en muestras frescas, éstas presentaron una alta capacidad proliferativa, un patrón histológico normal en la mayoría de las áreas examinadas, así como características de las células madre del ligamento periodontal normales, incluyendo la expresión del marcador de superficie STRO-1, capacidad de diferenciación multipotencial y un cariotipo diploide normal (Seo et al., 2005).

3. Factores de crecimiento celular:

Son polipéptidos sintetizados por las propias células y que se unen a receptores celulares específicos desencadenando una serie de acciones biológicas que estimulan la proliferación celular, quimiotaxis, angiogénesis, diferenciación celular y síntesis de matriz extracelular.

Se ha comprobado que, el tejido óseo contiene numerosas células que segregan estos polipéptidos y que podrían mediar los procesos de reparación y remodelación ósea. De entre todos ellos, se pueden citar el Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Derivado de la Insulina tipo I y II (IGF-1; IGF-2), Factor de Crecimiento Transformante tipo Beta (TGF-B), Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de crecimiento vascular endotelial (VEFG) (Antoniades AH et al 1981; Kingsley DM et al., 1994; Canalis E et al., 1988).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF): Se encuentra implicado en la cicatrización en virtud fundamentalmente de las plaquetas y su doble función, tanto como depósito de factor de crecimiento, como de factor en la hemostasia. Se ha podido observar que PDGF parece tener un papel fundamental en la mitogénesis, angiogénesis, inicio de la quimiotaxis celular, biosíntesis de matriz de PDL y MSC favoreciendo la unión de las fibras de PDL a la superficie dentaria (Chong L et al., 2013), regulación de otros factores de crecimientos así como de células implicadas en la promoción de funciones fibroblásticas y osteogénicas.

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2 y (IGF-1 y 2) Se sabe que median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo (Hill PA et al., 1995). Aunque IGF-1 no influye en la diferenciación de MSC indiferenciadas a células de linaje osteoblástico, sí se ha podido observar su influencia sobre la función de los osteoblastos maduros (Walsh S et al; 2003). El IGF-2 es el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, se sabe que ejerce una importante función durante el periodo de embriogénesis, sin embargo los efectos sobre el esqueleto ya desarrollado son aun desconocidos.

TGF- β es un potente estimulador de la formación ósea, entre sus funciones destacan, la potenciación de la diferenciación osteoblástica y la síntesis de la matriz osteoide, inhibiendo la síntesis de proteasas. Asimismo, inhibe la reabsorción, por medio de la reducción de la formación y diferenciación de los osteoclastos, así como la actividad de los osteoclastos maduros al estimular su apoptosis (Baylink DJ et al., 1993).

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs) En general, presentan múltiples efectos óseos, tales como su influencia en la mitogénesis de CMM indiferenciadas y precursores osteoblásticos, es inductor en la expresión del fenotipo osteoblástico, actúa como factor quimioatrayente en CMM y monocitos, así como en la unión extracelular de matriz de colágeno tipo IV (Trombely L et al., 2008). Se ha visto también, su función como inductor de la formación de hueso *in vivo* (Iwata T et al., 2014; Jinguishi et al., 2002).

Tanto BMP2, BMP3, como BMP7 son actualmente usadas en combinación con materiales osteoconductivos de manera satisfactoria en un gran número de procedimientos experimentales en el campo de la regeneración ósea y periodontal (Li et al., 2015; Barradas et al., 2011; Wikesjö et al., 1999; Hoshino et al., 2006; Jinguishi et al., 2002).

4. Estrategias de cultivo y diferenciación celular:

Con el fin de almacenar, transportar o expandir las colonias celulares y obtener diferenciación celular *in vitro*, es necesario el uso de medios de cultivo de mantenimiento e inductores que promuevan la diferenciación de las MSC hacia un linaje concreto. Entre los distintos tipos, caben destacar:

4.1 Cultivo en medio reconstituido:

Es el medio base utilizado para el almacenamiento, transporte y expansión sin diferenciación de las CMM. No presenta productos inductores de diferenciación, sino sustratos para la nutrición y mantenimiento de las células, suero, así como factores de crecimiento y antibióticos que evitan la contaminación del cultivo.

El medio de mantenimiento reconstituido está compuesto fundamentalmente por medio α -MEM en cuya composición incluye una gran cantidad de aminoácidos, glucosa, vitaminas, sales inorgánicas, 0.5% de L-glutamina como aminoácido principal y 15% de suero fetal bovino (FCS). Adicionalmente, con el fin de evitar la contaminación de los cultivos, éstos suelen suplementarse con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción, en donde las mezclas más comunes suelen ser:

- Penicilina (100 U/mL) + Estreptomicina (100 μ g/mL). Como combinación anti-microbiana.
- Penicilina (100 U/mL) + Estreptomicina (100 μ g/mL) + Anfotericina B (0.25 μ g/ml). Como combinación anti-microbiana y anti-fúngica.

4.2 Cultivo en medio de diferenciación comercial:

Es un medio estéril comercializado que es elaborado a partir de protocolos estandarizados en los que se agregan aminoácidos no esenciales, vitaminas, compuestos orgánicos e inorgánicos, hormonas, factores de crecimiento y minerales específicos que inducen a la diferenciación hacia cada una de las tres estirpes potenciales de las MSC. En el caso de la diferenciación osteogénica, los medios comerciales se encuentran suplementados con glicerofosfato, ascorbato-2 fosfato,

dexametasona y ácido ascórbico para favorecer su diferenciación. Para inducir a la diferenciación adipogénica la suplementación suele ser a base de dexametasona, ascorbato-2 fosfato, insulina, 3-isobutil-1-metilxantina e indometacina mientras que para la diferenciación condrogénica contiene además de compuestos comunes con los anteriores tales como dexametasona o ácido ascórbico, insulina-transferrina-selenio y TGF-B. Éste último, es un factor de crecimiento considerado como un potente inductor de la diferenciación condrogénica, siendo esta diferenciación más efectiva cuanto mayor duración se mantenga el cultivo en contacto con el factor de crecimiento (Kim HJ et al., 2009; Solorio LD et al., 2010).

5.3 Cultivo en medio condicionado de células diferenciadas:

Es aquel medio obtenido a partir del cultivo de células previamente diferenciadas o tejidos que contienen componentes biológicamente activos tales como citoquinas/factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular y enzimas de remodelación tisular, que se liberan y que podrían afectar a ciertas funciones de la célula influyendo en funciones tales como la inflamación local, respuesta inmune, reducción del estrés oxidativo, fibrosis y muerte celular. También se ha visto que es capaz de estimular la angiogénesis e inducir al reclutamiento, proliferación y diferenciación de CMM hacia determinadas estirpes (Wang HS et al., 2004).

Del mismo modo que este medio de cultivo parece tener poder inductor en la diferenciación de CMM. Recientemente, un estudio realizado por el grupo de Santos TS y colaboradores en 2015 han demostrado que el cultivo de CMM ya sea en co-cultivo o en medio condicionado por éstas, parece producir una represión de la diferenciación osteoblástica sobre osteoblastos. Por lo que este tipo de medio de cultivo parece tener una importante influencia sobre las células que se encuentran embebidas en él, ya sean diferenciadas o no (Santos TS et al., 2015).

JUSTIFICACIÓN,
HIPÓTESIS
Y
OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN:

Dado el creciente interés que ha adquirido la terapia celular como método de regeneración tisular, la posibilidad de aislar CMM a partir del ligamento periodontal en dientes con indicación de extracción, constituiría una excelente alternativa de obtención por resultar un procedimiento poco invasivo para el paciente. La evidencia científica disponible sobre la obtención de CMM en esta localización oral, así como su capacidad de diferenciación por la actividad paracrina del medio en el que se rodea, es aun limitada. Es por ello, por lo que es necesario un mayor número de estudios experimentales *in vitro* que corroboren la posibilidad de obtener CMM en el ligamento periodontal.

III. HIPÓTESIS:

Hipótesis nula (H_0):

- En el ligamento periodontal no es posible el aislamiento de células madre mesenquimales.

Hipótesis alternativa (H_1):

- El ligamento periodontal constituye una fuente de obtención de células madre mesenquimales.

IV. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Corroborar la capacidad de aislar células madre obtenidas del ligamento periodontal.

Objetivos específicos:

1. Obtener líneas celulares de PDLSCs procedentes de terceros molares incluidos (n=4).
2. Caracterizar las líneas celulares de PDLSCs según su inmunofenotipo por citometría de flujo.
3. Diferenciar las líneas celulares hacia las tres estirpes celulares posibles: diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.
4. Comprobar dicha diferenciación por medio del análisis histoquímico de las líneas diferenciadas.

MATERIAL Y MÉTODO

V. MATERIAL Y MÉTODO:

El conjunto de procedimientos del presente estudio experimental se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Tisular de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en concordancia con los Principios establecidos por la Declaración de Helsinki y se realizó bajo la aprobación del Comité de Ensayos Clínicos del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Selección de pacientes y extracción dentaria:

Las células madre del ligamento periodontal se obtuvieron de terceros molares incluidos procedentes de pacientes del Master de Cirugía Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

La selección de los sujetos con indicación de extracción de terceros molares incluidos se basó en un examen oral previo junto con la cumplimentación de un cuestionario clínico en el que debían cumplir los siguientes criterios de inclusión y exclusión (**Anexo 1**):

Criterios de inclusión:

Fueron incluidos en el presente estudio pacientes adultos, ASA I, con edades comprendidas entre los 18 y 30 años, sin preferencia en cuanto al sexo, que fuesen subsidiarios de extracción de terceros molares incluidos y que expresasen por escrito su consentimiento para participar en el estudio (**Anexo 2**).

Criterios de exclusión:

Fueron excluidos del estudio aquellos pacientes que presentaron terceros molares enclavados o visibles en boca, pacientes embarazadas, con enfermedades sistémicas, pacientes que tomen algún tipo de medicación de manera crónica, fumadores y pacientes cuya extracción de terceros molares fuese realizada mediante odontosección.

Todos los pacientes fueron informados previo procedimiento sobre el estudio y su alcance. El consentimiento informado fue firmado en todos los casos.

Las extracciones fueron realizadas en la clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, bajo anestesia local, con luxadores y/o elevadores según la situación clínica de la pieza a extraer. Los terceros molares, una vez obtenidos, fueron transportados en

solución salina balanceada de Hank con Penicilina (100 U/mL) y Estreptomicina (100 µg/mL) al 1% como combinación anti-microbiana.

Todos los procedimientos de cultivo y siembra se realizaron bajo campana de flujo laminar para garantizar su esterilidad.

Aislamiento y cultivo de PDLSCs:

El aislamiento de las PDLSCs fue realizado siguiendo el protocolo planteado por Seo y colaboradores en el año 2004 (Seo et al., 2004). Se llevó a cabo el raspado del ligamento periodontal de los terceros molares (n=4) obtenidos con la ayuda de una cureta, separándolo cuidadosamente de la superficie de la raíz. Se digirió en un tubo Falcon de 45ml con 20ml de solución salina de Hank, en la que fue añadida 3mg/ml de colagenasa tipo I y 4mg/ml de dispasa durante 1 hora a 37°C. Se hizo pasar estas muestras a través de un filtro celular de 70µm y fueron sometidas a centrifugación a 400g (1800 rpm) durante 10 minutos a 4° C, el sedimento fue sembrado en frascos de cultivo de 75cc con α -MEM reconstituido incubándose en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C.

Este medio se fue cambiando cada 72 horas hasta la observación de semi-confluencia (70-90% de la superficie total observada poblada con PDLSCs), lo cual se fue controlando por medio de observaciones periódicas con microscopio óptico, momento en el cual se procedió a su sub-cultivo. Para ello, se retiró con la ayuda de una pipeta el medio de cultivo y se lavó con tampón fosfato salino (PBS) para asegurar que no quedasen restos de suero que pudieran interferir con la acción de la tripsina. Se añadieron 7 ml de tripsina y se mantuvo en la incubadora de CO₂ al 5% y a 37°C durante 10-15 minutos. Posteriormente, se añadió 2 ml de suero fetal bovino (SFB) a cada frasco de cultivo para inactivar la tripsina, las muestras se trasladaron a tubos Falcon de 15ml y se centrifugaron a 400g durante 10 minutos a 4°C, el sedimento obtenido se diluyó en α -MEM reconstituido y se procedió al resembrado de las células para continuar con su expansión. En el presente estudio, las PDLSCs utilizadas se encontraban entre el 2° y 5° pase.

Caracterización de las PDLSCs:

Caracterización de las PDLSCs mediante citometría de flujo:

Seguendo el protocolo propuesto por la ISCT, las células fueron incubadas con los anticuerpos (Immunostep®) para los antígenos humanos HLA-DR (FITC), CD-90 (FITC), CD-11b (FITC),

CD-73 (PE), CD-34(PE) y CD-105 (FITC) siguiendo el siguiente procedimiento:

Las células en el 3^{er} pase fueron levantadas mediante el proceso de tripsinización, de tal manera que se retiró el medio de cultivo alpha-MEM, se lavó con PBS y se añadieron 7ml de tripsina. Tras 10 minutos en la estufa, se inactivó la tripsina por medio de la adición de 2ml de SFB. Posteriormente, se procedió al conteo celular por medio de la cámara de Neubauer. En total se obtuvieron por cuadrícula un total de 35×10^4 células/ml. De cada línea, se etiquetaron 6 tubos falcon, cada uno correspondiente al AC a analizar. En cada tubo se añadió 1ml de células de la línea correspondiente. Los frascos fueron sometidos a centrifugación a 1800 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se retiró el medio y se añadieron 200µl de PBS y la cantidad de cada anticuerpo indicada según el fabricante, siendo éstas:

- 20µl de CD105
- 40µl de CD45
- 40µl de CD73
- 40µl de CD90
- 40µl de HLA-DR
- 40µl de CD34
- 40µl de CD11b

Posteriormente se dejó en la nevera a 4°C en oscuridad para permitir la fijación del anticuerpo durante 20 minutos. Tras este periodo, se añadieron 5ml de PBS en cada tubo para inactivar el efecto de los AC y se volvió a centrifugar a 1800 rpm durante 10 minutos a 4°C para sedimentar las células en la base. De nuevo, se volvió a retirar el medio y se añadieron otros 200µl de PBS. Finalmente se procedió a su lectura en el citómetro de flujo.

Adicionalmente, se corroboraron los resultados obtenidos en la citometría de flujo mediante microscopía de fluorescencia, resultados positivos quedaron evidenciados mediante un color verde fluorescente correspondiente a la fluoresceína (FITC) sobre fondo negro para los anticuerpos HLA-DR, CD11b, CD105, CD45 y en color rojo correspondiente al fluorocromo ficoeritrina (PE) sobre fondo negro en caso de ser positivos para los anticuerpos CD34 y CD73.

Diferenciación de las PDLSCs hacia los linajes osteogénico, adipogénico, condrogénico y caracterización mediante histoquímica:

Para la diferenciación hacia el linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico fueron empleados medios de diferenciación comercial específicos de la marca MACS™ de Miltenyi Biotec®. Las cuatro líneas celulares fueron levantadas mediante el proceso de tripsinación anteriormente mencionado y se procedió al conteo celular de cada línea bajo el microscopio óptico mediante la cámara de Neubauer.

En una placa de 24 multipocillos se procedió al cultivo de cada línea celular hacia linaje osteogénico y adipogénico y paralelamente se estableció un control negativo para comparar los cambios morfológicos a lo largo de la diferenciación. Para la diferenciación osteogénica, 5×10^3 células/cm² fueron cultivadas en dos pocillos por línea celular en donde se añadió medio de diferenciación osteogénico comercial suplementado con SFB, ácido ascórbico, β-glicerofosfato y dexametasona. Para la diferenciación adipogénica, 8.5×10^3 células/cm² fueron cultivadas en dos pocillos por línea celular con su respectivo medio de diferenciación comercial suplementado con dexametasona, ascorbato-2 fosfato, insulina, 3-isobutil-1-metilxantina e indometacina.

Para la diferenciación condrogénica, 125×10^3 células/cm² fueron cultivadas en cuatro alícuotas diferentes correspondientes a cada línea celular ya que para este tipo de diferenciación es necesario que las células estén comprendidas en un pellet o conglomerado celular y no re-suspendidas en el medio como en la diferenciación osteogénica y adipogénica.

Los medios de diferenciación y de mantenimiento (en el caso de los controles negativos) fueron renovados cada 48-72 horas hasta completar el periodo definitivo de diferenciación celular especificado según el fabricante: 10 días para diferenciación osteogénica, 14-21 días para diferenciación adipogénica y 24 días para diferenciación condrogénica.

Para la comprobación de la capacidad de diferenciación de las PDLSCs hacia las distintas estirpes celulares, se realizaron las respectivas tinciones histoquímicas:

El análisis de la diferenciación hacia el linaje osteogénico fue evaluado por medio de la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina a los 10 días. Tras este periodo de diferenciación, las células fueron lavadas con suero salino sin fosfato y a continuación se añadió 1ml a cada pocillo del reactivo BCIP®/NBT Liquid Substrate System (Sigma Aldrich®) durante 10 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas en formol al 10% durante 10 minutos y se lavó con PBS para eliminar sobrantes. Las tinciones positivas para ALP han de presentar un color violeta oscuro al microscopio óptico.

Para la verificación de la diferenciación adipogénica se utilizó el tinte Oil Red (Sigma Aldrich®). Tras la fijación con formaldehído al 10%, las células fueron lavadas con etanol al 70% y posteriormente se procedió a la tinción de las células con agente Oil Red al 2% en isopropilo durante 5 minutos. Tras este tiempo, las células fueron lavadas con etanol al 70% y agua destilada para eliminar el exceso de tinción. Tinciones positivas en la diferenciación adipogénica, quedan evidenciadas a partir de una coloración roja de los cultivos fijados debido a la tinción específica de las inclusiones lipídicas en el citoplasma celular de los adipocitos observados por medio del microscopio óptico, estas observaciones fueron realizadas a los 21 días de diferenciación.

Por último, para verificar la diferenciación hacia el linaje condrogénico, tras los 24 días de diferenciación, las células que se encuentran formando un pellet o conglomerado celular, son extraídas sin realizar movimientos bruscos para evitar su re-suspensión, la muestra es colocada en cassetes de biopsia y son fijadas con formaldehído al 10% durante 24 horas. Las muestras son deshidratadas pasándolas por concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 96 y 100%) una hora en cada una de las concentraciones y finalmente se pasa a un disolvente orgánico (tolueno) durante una hora. Posteriormente, se realizan dos baños de 30 minutos en parafina líquida y se deja secar. De este modo, ya tenemos la pieza embebida y formando el taco de parafina. Cortamos secciones de 5 a 10 micras con la ayuda de un micrótopo y se deja secar sobre un portaobjetos para posteriormente desparafinar las muestras pasando las secciones sobre los portas por toludeno y concentraciones decrecientes de alcohol (10 minutos cada uno) hasta llegar al agua. Las muestras son teñidas finalmente con azul alción y son deshidratadas de nuevo para preservar las preparaciones teñidas pasándolas de nuevo por concentraciones crecientes de alcohol hasta llegar al xileno. Finalmente, se añade una gota de medio de montaje (Eukitt) y se coloca el cubreobjetos dejando secar las muestras que quedan preparadas para su observación mediante microscopía electrónica.

Como control negativo de cada uno de los tipos celulares, se sembraron CMM en un medio de mantenimiento, siendo negativas a la tinción celular así como a cambios en su morfología y tamaño celular.

RESULTADOS

VI. RESULTADOS:

Según la ISCT la expresión de antígenos CD34 y CD45 son propios de células hematopoyéticas y deben ser negativos en células mesenquimales del mismo modo que los anticuerpos CD11b y HLA-DR.

Se procedió a la lectura del perfil inmunofenotípico de las 4 líneas celulares mediante citometría de flujo, siendo todas las líneas positivas para el anticuerpo CD73 y CD90 y negativas para los anticuerpos CD105, HLA-DR, CD11b, CD34, CD45.

Los resultados de la citometría se muestran a continuación mediante histogramas en escala logarítmica decimal que relacionan el número de células (eje Y) con la intensidad de la fluorescencia (eje X) comparando los resultados de la fluorescencia del anticuerpo con un fluorocromo control. **(Fig:1):**

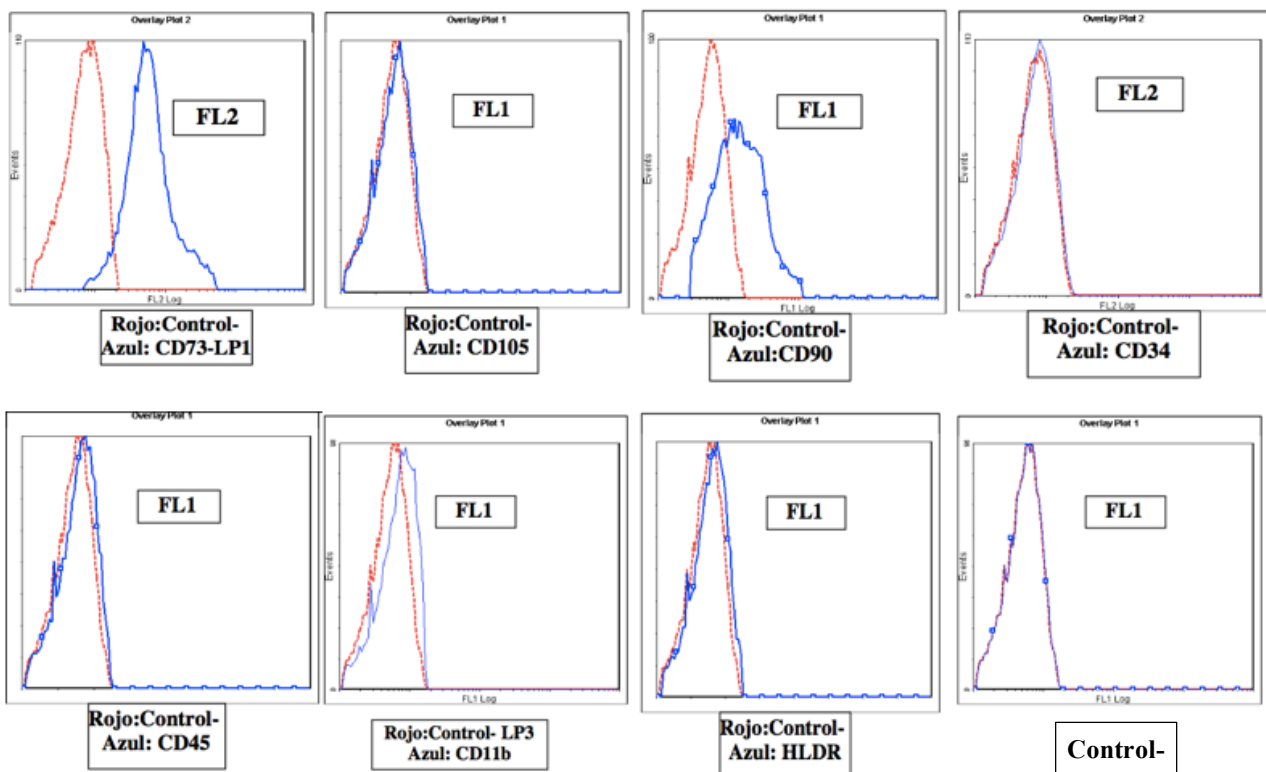


Fig.1: Citometría de flujo evaluada en las cuatro líneas de PDLSCs: la citometría resultó positiva para los anticuerpos CD73 y CD90 y negativa para los anticuerpos CD105, CD34, CD45, CD11b y HLA-DR.

Adicionalmente, se procedió a la comprobación de los resultados por medio de microscopía de fluorescencia. Resultados positivos quedan evidenciados mediante un color verde fluorescente correspondiente a la fluoresceína (FITC) sobre fondo negro para los anticuerpos HLA-DR, CD11b, CD105, CD45 y en color rojo correspondiente al fluorocromo ficoeritrina (PE) sobre fondo negro para los anticuerpos CD34 y CD73. Los resultados fueron concordantes con el protocolo propuesto por la ISCT tanto en la citometría de flujo como en la microscopía de fluorescencia para los anticuerpos CD73 y CD90. Sin embargo, el anticuerpo CD105 resultó negativo en la citometría, mientras que en la microscopía de fluorescencia pudo observarse para este anticuerpo un aparente resultado positivo (**Figs. 2-5**). Se desconoce el porqué de esta discordancia y cabe pensar que pudo ser debido a algún fallo en la calibración del citómetro de flujo.

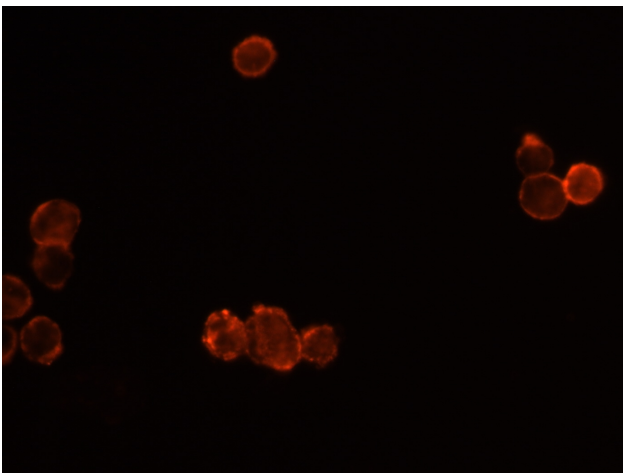


Fig.2: Microscopía de fluorescencia (+) para CD73(PE).

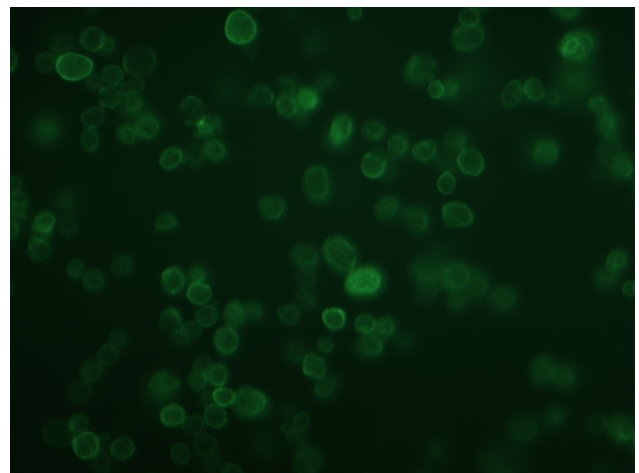


Fig. 3: Microscopía de fluorescencia (+) para CD90(FITC)

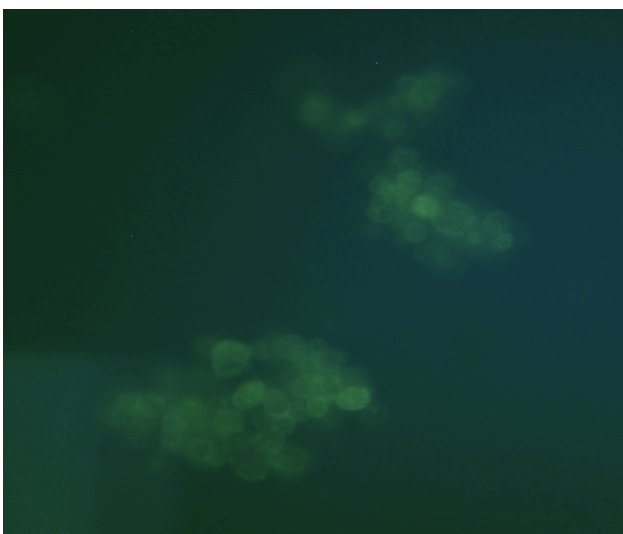


Fig. 4: Microscopía de fluorescencia (+) para CD105(FITC)

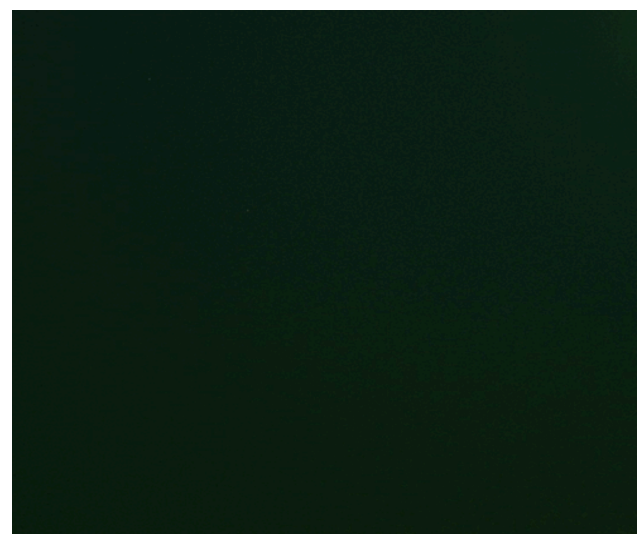


Fig. 5: Microscopía de fluorescencia (-) para HLA-DR

Posteriormente, la caracterización biológica de las PDLSCs hacia células de linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico, se comprobó mediante las coloraciones de fosfatasa alcalina (kit de tinción de FA de Sigma Adrich® BCIP/NBT liquid substrate system), Oil Red y azul Alcian respectivamente.

La tinción para fosfatasa alcalina dio positiva para las PDLSCs cultivadas con medio de diferenciación osteogénico comercial en las cuatro líneas celulares tiñéndose de color violeta oscuro. Esta tinción pudo observarse a simple vista, pero para un mayor detalle, se realizaron fotografías con el microscopio óptico para apreciar la tinción en los cuerpos celulares (**Fig. 6**).

Los controles negativos de cada uno de los grupos de PDLSCs que se sembraron con medio de mantenimiento, dieron negativo en la tinción de la fosfatasa alcalina (**Fig. 7**).

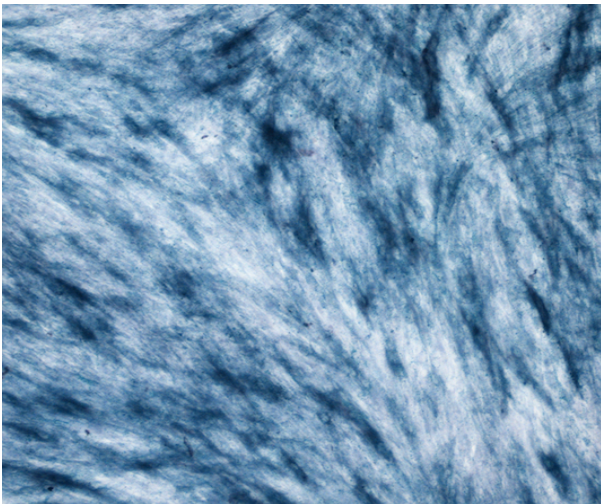


Fig. 6: Día 10. Tinción positiva para Fosfatasa Alcalina tras diferenciación osteogénica de PDLSCs



Fig. 7: Control (-) de PDLSCs en medio de mantenimiento reconstituido

Para los grupos de PDLSCs que fueron sembrados con medio de diferenciación adipogénico, se mostraron colonias de vacuolas lipídicas al teñir las muestras con Oil Red y visualizarse al microscopio óptico, se pudo observar también el cambio morfológico sufrido durante su diferenciación, pasando de ser células de aspecto fibroblastoide a células con múltiples y pequeñas vacuolas en su interior y de aspecto más ovoide (**Fig.8**).

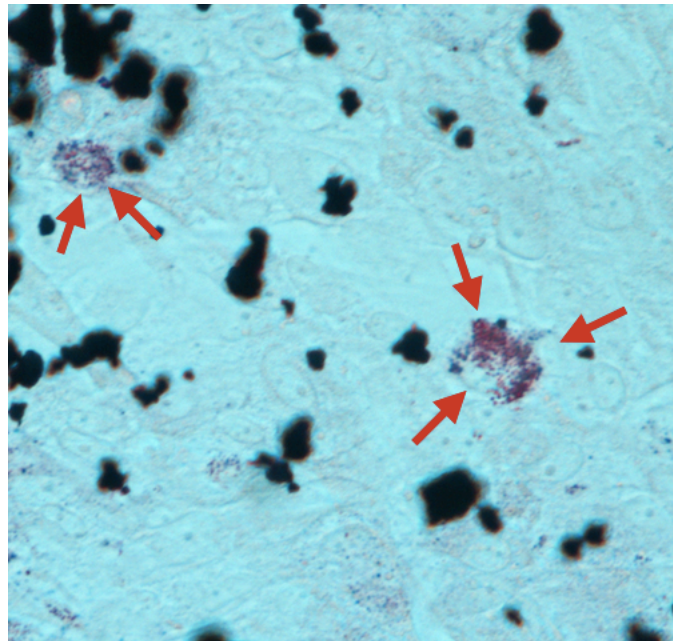


Fig. 8: Día 21. Tinción positiva para Oil Red tras diferenciación adipogénica de las PDLSCs

Por último, los grupos de PDLSCs que fueron cultivados con medio de diferenciación condrogénico comercial, serán teñidos con azul alcian, generando un característico color azul al producirse la tinción de los mucopolisacáridos presentes en la matriz cartilaginosa. Debido a la limitación temporal del presente estudio, la prueba histoquímica no ha podido presentarse, quedando a la espera de corroborar definitivamente la diferenciación hacia el linaje condrogénico.

DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN:

El aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales a partir de tejidos de localización intraoral, se está convirtiendo en un pilar de gran importancia en la Ingeniería Tisular en los últimos años. En distintas localizaciones, se ha podido comprobar la presencia de células madre, entre los que se encuentra la pulpa dental de dientes permanentes y dientes temporales (Gronthos S et al., 2000), tejido gingival (Zhang Q et al., 2009), ligamento periodontal (Seo BM et al., 2004), hueso alveolar (Matsubara T et al., 2005), papila apical (Sonoyama W et al., 2006), folículo dental (Morszeck C et al., 2005) y tejido periapical inflamado (Liao J et al., 2011).

Los hallazgos del presente estudio, parecen ratificar que el LP contiene células madre multipotentes que pueden aislarse y expandirse *in vitro*, proporcionando un reservorio único de células madre caracterizado por su gran accesibilidad. Es importante destacar el hecho de que, las PDLSCs recogidas de un solo diente, pueden dar lugar a multitud de células madre, debido a su capacidad de proliferación *ex vivo*. Por lo tanto, la generación de tejidos mediante PDLSCs podría tener una aplicación terapéutica regenerativa en un futuro.

La identificación de PDLSCs se ha llevado a cabo tomando como referencia el protocolo de Dominicci publicado en 2006 (Dominicci M. et al., 2006). Sin embargo, la principal limitación del presente estudio, es que pese a que la publicación de este protocolo pretendía homogeneizar los métodos de identificación y caracterización de las células madre mesenquimales, aún en la actualidad, no en todos los estudios se evalúan e identifican las PDLSCs de la misma manera, lo que dificulta el hecho de poder establecer comparaciones de manera homogénea.

El primer estudio en el que se logró demostrar la existencia de células madre multipotentes en el ligamento periodontal fue el descrito por Seo B.M. y colaboradores en 2004 (Seo BM et al., 2004). El protocolo de aislamiento de PDLSCs de este artículo, fue tomado como referencia para nuestro estudio. Sin embargo, puesto que se trata de un artículo anterior a la publicación de la ISCT, los anticuerpos que se usan como referencia para identificar a las células madre (STRO-1 y CD146), no coinciden con los propuestos por Dominicci M. Paralelamente a la identificación mediante anticuerpos, Seo B.M y cols., también llevaron a cabo la inducción de PDLSCs hacia células formadoras de hueso y adipocitos, verificando su diferenciación mediante histoquímica tal y como también se hizo en nuestro estudio. Sin embargo, pese a esta capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico y adipogénico, parece ser que en el caso de la diferenciación osteogénica, los nódulos de mineralización ósea son más pobres en células madre de localización periodontal que en

los procedentes de la pulpa dental según el propio autor indica en su artículo. Adicionalmente, en su estudio, pudieron observar la regeneración a partir de PDLSCs de defectos periodontales creados en ratas inmunocomprometidas, observándose la presencia de células formadoras de cemento y de fibras de colágeno *in vivo*. Por lo tanto, las PDLSCs parece que no sólo son capaces de diferenciarse hacia hueso, tejido adiposo y cartílago, sino que son también capaces de diferenciarse hacia células que parecen ser cementoblastos. No obstante, la dificultad actual para poder afirmar con exactitud la capacidad de diferenciación de las PDLSCs hacia verdaderos cementoblastos radica en el escaso número de marcadores específicos, conociéndose por el momento sólo dos: la Proteína de Cemento 1 (CEMP-1) y la proteína de adhesión al cemento (CAP) considerándose condiciones necesarias aunque no suficientes aún para afirmar su presencia. En este sentido, otro de los estudios que han estudiado la regeneración de defectos periodontales y diferenciación hacia células formadoras de cemento mediante células madre es el de Nuñez J. y colaboradores (Nuñez J et al., 2012) cuyo protocolo de caracterización se basó en la diferenciación osteogénica y determinación de los marcadores de superficie CD73, CD90, CD44, CD105, CD34, CD45, CD11b, CD80, CD19 and HLA-DR coincidiendo con los propuestos por la ISCT.

Otro de los estudios en el que se lograron aislar células madre del ligamento periodontal, fue en el estudio de Zheng W. y colaboradores (Zheng W et al., 2009). En éste, se evaluó la capacidad de proliferación y diferenciación de las PDLSCs en función de la edad de los sujetos donantes, observándose diferencias estadísticamente significativas en el número, apariencia morfológica, capacidad proliferativa y multipotencialidad *in vitro* a favor de las PDLSCs procedentes de sujetos jóvenes (15±4 años). En nuestro estudio, no se hicieron comparativas con respecto a la edad, aunque sí se tuvieron en cuenta estos resultados a la hora de diseñarlo. De tal modo, que en uno de los criterios de inclusión se hizo referencia a la edad, incluyéndose en el estudio sólo pacientes cuyas edades estuviesen comprendidas entre los 18 y 30 años a fin de poder aumentar la validez externa de nuestro estudio. En cuanto al método de identificación de las PDLSCs, pese a ser un estudio publicado posteriormente al de la ISCT, al igual que en el estudio de Seo y colaboradores utilizan sólo los anticuerpos STRO-1 y CD146. También se llevó a cabo la verificación de diferenciación hacia los linajes osteogénico y adipogénico comprobados mediante histoquímica, aunque no se verificó la diferenciación hacia la estirpe condrogénica.

Para Singhatanadgit y cols., en su estudio, la caracterización celular mediante citometría de flujo de las PDLSCs han de presentar resultados positivos para los anticuerpos CD29 y CD44 y negativos para CD34 y CD45 y adicionalmente, las PDLSCs han de tener capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica mediante medios de inducción comercial. Aunque para este

estudio, tampoco existe una coincidencia completa con los anticuerpos determinados por la ISCT, si que se evalúan dos de los anticuerpos propuestos que son CD34 y CD45, propios de células hematopoyéticas, cuyos resultados positivos descartarían su caracterización como células madre mesenquimales. Por primera vez, se observa diferenciación condrogénica que hasta ahora en el resto de artículos publicados no se había evaluado.

Cabe señalar que, la positividad o negatividad de los marcadores de superficie en la citometría de flujo no se puede utilizar como la confirmación absoluta en la caracterización de células madre, aunque el aumento del número de marcadores de superficie estudiados si que incrementa la probabilidad de que sean células madre. Es por ello, por lo que en nuestro estudio se evaluaron todos los anticuerpos propuestos por la ISCT a fin de poder establecer comparativas lo más homogéneas posibles con el resto de la literatura disponible.

A modo de conclusión, cabe señalar que una de las principales limitaciones en la investigación con CMM radica en la falta de cohesión entre los parámetros de caracterización de éstas células como tales. En este sentido, el protocolo de identificación y caracterización de CMM varía entre artículos, siendo necesario un protocolo fijo que otorgue fiabilidad y certeza para poder en lo sucesivo seguir evaluando la capacidad regenerativa de estas células.

CONCLUSIONES


VIII. CONCLUSIONES:

A la luz de los resultados obtenidos en el presente estudio, cabe señalar las siguientes conclusiones:

- El ligamento periodontal constituye una fuente alternativa para la obtención de CMM.
- Las CMM obtenidas en el ligamento periodontal presentan capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica inducidas por el medio en el que se encuentran rodeadas.
- La determinación fenotípica mediante marcadores de superficie específicos constituye una importante herramienta en la caracterización de las CMM.
- La positividad o negatividad de los marcadores de superficie en la citometría de flujo no se puede utilizar como confirmación absoluta en la caracterización de las células madre, aunque el aumento del número de marcadores de superficie estudiados si que incrementa la probabilidad de que sean células madre.
- Se hace necesaria la estandarización de un protocolo que asiente unas bases comunes en la caracterización de las CMM, a fin de otorgar a los estudios una mayor validez externa y poder establecer conclusiones homogéneas comparables con el resto de literatura científica disponible.

ANEXOS

IX. ANEXOS:

	<p>CUESTIONARIO DE SALUD DEL PACIENTE Facultad de Odontología UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID</p>
---	--

1. *Cuestionario de salud para el paciente:***DATOS DE FILIACIÓN:**

Iniciales del paciente:

Nº de paciente:

Teléfono:

Fecha:

DATOS DEMOGRAFICOS:

Fecha de Nacimiento:

Sexo: 1. Hombre () 2. Mujer ()

Consentimiento () Fecha:

¿Se le dio la hoja informativa al paciente? 1. Sí () 2. No ()

HISTORIA MEDICA:

	NO	SÍ, DESCRIBIR:
ALERGIAS		
CARDIOVASCULAR		
RESPIRATORIO		

METABÓLICO		
HEPÁTICO-RENAL		
HEMATOLÓGICO		
NEUROLÓGICO		
PSIQUIÁTRICO		
ONCOLÓGICO		

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Para ser el paciente incluido en el estudio, la respuesta a las siguientes preguntas debe ser **SÍ** en todos los casos:

1. ¿Está la edad del paciente comprendida entre 18-30 años?

SÍ		NO	
----	--	----	--
2. ¿Son incluidos los terceros molares subsidiarios de cirugía?

SÍ		NO	
----	--	----	--
3. ¿Presenta el paciente un buen estado de salud?

SÍ		NO	
----	--	----	--
4. ¿Fue entregada y explicada la hoja informativa al paciente?

SÍ		NO	
----	--	----	--
5. ¿Se ha otorgado el consentimiento informado al paciente?

SÍ		NO	
----	--	----	--

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

La respuesta a las siguientes preguntas debe ser **NO** en todos los casos. Si en alguna es **SÍ**, el paciente debe ser excluido del estudio.

1. ¿Presenta terceros molares enclavados o visibles en boca?

SÍ		NO	
----	--	----	--
2. ¿Está la paciente embarazada?

SÍ		NO	
----	--	----	--
3. ¿Presenta el paciente algún tipo de enfermedad sistémica?

SÍ		NO	
----	--	----	--
4. ¿Toma algún tipo de medicación de manera crónica?

SÍ		NO	
----	--	----	--
5. ¿Fueron los cordales extraídos mediante odontosección?

SÍ		NO	
----	--	----	--
6. ¿Es el paciente fumador?

SÍ		NO	
----	--	----	--

2. *Consentimiento Informado para participar en el Estudio de Investigación Clínica:*

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

Título del protocolo: Análisis de la expresión genética de células madre obtenidas del ligamento periodontal según la influencia del medio.

Investigador principal: Luis Blanco Jerez

Universidad en donde se realizará el estudio: Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid

Nombre del paciente:

Usted está siendo invitado a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme ésta en forma de consentimiento.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

El intento por restablecer el hueso perdido, ha intentado suplirse mediante el uso de injertos de diversa naturaleza. Sin embargo, las altas tasas de reabsorción de injertos, la morbilidad, hospitalización en casos de injertos extraorales (injertos fuera de la boca) o menores tasas de éxito, son algunos de los inconvenientes que se reportan con más frecuencia. Por otra parte, no es inusual que el profesional se encuentre con una disponibilidad limitada de tejidos autólogos (tejidos del propio paciente).

No son pocas las complicaciones que existen en cuanto a la aplicación de células madre. Sin embargo, podrían proporcionar esperanzadoras soluciones en el campo de la regeneración ósea y periodontal (formación de hueso y tejidos que rodean al diente), así como en pacientes oncológicos, rehabilitaciones tras traumatismos, o en pacientes afectos de malformaciones congénitas (en el nacimiento).

OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos entender mejor la capacidad de regenerar tejidos orales mediante el uso de células madre. Esto, ayudará a mejorar el conocimiento en este campo contribuyendo a entender su capacidad regenerativa.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO:

Este estudio ayudará a proporcionar un mayor entendimiento en el campo de la regeneración de los tejidos orales mediante el uso de células madre. Por ejemplo, la capacidad de generar hueso y otros tejidos mediante el uso de células madre en el propio paciente del que son obtenidas.

Los exámenes de laboratorio son sin costo para usted. Sus datos personales no se pondrán en ningún momento en conocimiento para nuestro estudio y los resultados obtenidos serán manipulados y proporcionados exclusivamente por odontólogos con fines de investigación en el laboratorio de Ingeniería Tisular de la Universidad Complutense de Madrid.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO:

Si reúne las condiciones y de aceptar participar se le realizarán las siguientes pruebas y procedimientos:

1. Se realizará un breve cuestionario de salud con el objetivo de valorar sus antecedentes médicos previos a la cirugía de cordales incluidos.
2. Una vez realizada la extracción, los cordales serán transportados al laboratorio de Ingeniería Tisular de la Universidad Complutense de Madrid, en una solución específica para mantener las cualidades biológicas necesarias para nuestro estudio.
3. Las muestras de material biológico obtenidas en este proyecto, formarán parte de un reservorio de muestras biológicas que podrán ser utilizadas en proyectos futuros. De igual manera, la información generada de este proyecto podrá ser utilizada para el desarrollo de investigaciones futuras.
4. Las muestras biológicas utilizadas en investigación biomédica, se conservarán únicamente en tanto sean necesarias para los fines que justificaron su recogida, salvo que usted haya otorgado su consentimiento explícito para otros usos posteriores, tal y como especifica el **art. 61 de la Ley de Investigación Biomédica 14/2007**.
5. Para su tratamiento y eliminación, deberá atender a criterios de inocuidad, asepsia y salubridad con el fin de garantizar la eliminación de los gérmenes patógenos y la protección del medio

ambiente. Los residuos se recogerán en bolsas y recipientes cuyas características técnicas se adaptarán a los criterios siguientes:

- Estanqueidad total.
- Opacidad a la vista.
- Resistentes a la rotura
- Asepsia total en su exterior.
- Ausencia total en su exterior de elementos sólidos, punzantes y cortantes.
- Volumen no superior a 70 litros.
- Cierre especial hermético de fácil apertura y que no pueda abrirse de forma accidental

La eliminación completa del material será llevada a cabo por empresas autorizadas que ofrezcan toda la garantía de no contaminar el medio ambiente.

6. Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, en conformidad a la **Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99**. La identificación de las muestras biológicas será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asignará un código de identificación, que coincidirá con el de la historia clínica del paciente, de forma que los investigadores no conozcan en ningún momento los datos personales del donante.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO:

Ningún riesgo adicional deberá ser tenido en cuenta para nuestro estudio más que las consideraciones postoperatorias propias de una cirugía de cordales incluidos sobre las que ya ha sido debidamente informado. Lo único que le pedimos es que nos done sus terceros molares, de los que extraeremos las células madre que **en ningún caso** serán re-introducidas en ninguna persona.

ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio, puede retirarse en el momento que lo desee aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no sobre las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno relacionado con el presente estudio.
- No recibirá pago por su participación.

- En el transcurso del estudio, usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.
- Sus datos personales no serán en ningún momento utilizados. Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la **Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99**.
- Todas las muestras biológicas serán seran procesadas, almacenadas y destruidas conforme a lo establecido en el **Art. 61 de la Ley de Investigación Biomédica 14/2007**.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede firmar el Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio. Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la **Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99**. Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio. Comprendo que puedo retirarme del estudio, cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Firma del participante

Fecha _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o por su representante):

He explicado al Sr.(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado riesgos y beneficios de su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normativa correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador (o representante).

Fecha: _____

CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:

Título del protocolo: Análisis de la expresión genética de células madre obtenidas del ligamento periodontal según la influencia del medio.

Investigador principal: Luis Blanco Jerez

Universidad en donde se realizará el estudio: Universidad Complutense de Madrid

Nombre del paciente:

Por este conducto deseo informar por escrito de mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones (opcional):

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

Firma del participante

Fecha _____

(Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente)

3. *Aprobación del protocolo por parte del Comité Ético de Investigación Clínica:***Informe Dictamen Protocolo Favorable**

C.P. - C.I. 16/065-E

26 de febrero de 2016

CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dra. Mar García Arenillas
 Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión del día 17/02/2016, acta 2.2/16 ha evaluado la propuesta del promotor/investigador referida al estudio:

Título: "ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS MADRE OBTENIDAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL SEGÚN LA INFLUENCIA DEL MEDIO"

Que en este estudio:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.
- Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa legal aplicable en función de las características del estudio.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto por el **Dr. Luis Blanco Jerez** como investigador principal en el Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial. Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Lo que firmo en Madrid, a 26 de febrero de 2016

Dra. Mar García Arenillas
 Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

BIBLIOGRAFÍA

X. BIBLIOGRAFÍA:

Akintoye SO, Giavis P, Stefanik D, Levin L, Mante FK (2008). Comparative osteogenesis of maxilla and iliac crest human bone marrow stromal cells attached to oxidized titanium: a pilot study. *Clinical Oral Implants Research.*;19(11):1197-201.

Antoniades HN (1981). Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 78(12): 7314–17.

Avilés FF, San Román JA, García Frade J, Valdés M, Sánchez A, De la Fuente L, Peñarrubia MJ, Fernández ME, Tejedor P, Durán JM, Hernández C, Sanz R, García Sancho J (2004). Regeneración miocárdica mediante la implantación intracoronaria de células madre en el infarto agudo de miocardio. *Revista Española de Cardiología.* 2004;57:201-8.

Barradas, Yuan, Blitterwifk (2011). Osteoinductive biomaterials: Current knowledge of properties, experimental model and biological mechanisms. *European cells and materials.* 15;21:407-29

Bartold PM, Xiao Y, Lyngstaadas SP, Paine ML, Snead ML (2006). Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology 2000.* 41:123-35.

Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S (1993). Growth factors to stimulate bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research.* 8:565-72.

Berbéri A, Al-Nemer F, Hamade E, Noujeim Z, Badran B, Zibara K (2016). Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: an in vitro study. *Clinical Oral Investigations.* [Epub ahead of print]

Bianco P, Barker R, Brüstle O, Cattaneo E, Clevers H, Daley GQ, De Luca M, Goldstein L, Lindvall O, Mummery C, Robey PG, Sattler de Sousa E Brito C, Smith A (2013). Regulation of stem cell therapies under attack in Europe: for whom the bell tolls. *The EMBO Journal.* 29;32(11):1489-95.

Canalis E, McCarthy T, Centrella M (1988). Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology.* 122(1):22-7

- Castillo-Cardiel G, López-Echaury AC, Saucedo-Ortiz JA, Fuentes-Orozco C, Michel-Espinoza LR, Irusteta-Jiménez L, Salazar-Parra M, González-Ojeda A (2016). Bone regeneration in mandibular fractures after the application of autologous mesenchymal stem cells, a randomized clinical trial. *Dental Traumatology*. doi: 10.1111/edt.12303.
- Chen JY, Mou XZ, Du XC, Xiang C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins (2015). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8 (9): 739-46.
- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR (2008). Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40(5):815-20.
- Chong, L, Chien, L, Chung, M, Liang, K, Lim, J, Fu, J, Wang, C, & Chang, P (2013). Controlling the Proliferation and Differentiation Stages to Initiate Periodontal Regeneration. *Connective Tissue Research*, 54, 2, pp. 101-107
- Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siqueira R, Rizzatti EG, Neder L, Silva AR, Rocha V, Zago MA (2005). Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Experimental Cell Research*. 1;309(2):340-4.
- Danesh-Sani SA, Engebretson SP, Janal MN (2016). Histomorphometric results of different grafting materials and effect of healing time on bone maturation after sinus floor augmentation: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontal Research*. doi: 10.1111/jre.12402. [Epub ahead of print]
- D'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Studer M, De Angelis GC, Laino L, De Rosa A, Di Nucci D, Martino S, Paino F, Sampaolesi M, Papaccio G (2011). Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either in vitro or in vivo. *European cells & materials*. 21:304-16.
- Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, Weinstein R (2004). Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. 24(6):565-77.

- Ding Z, Fan Z, Huang X, Lu Q, Xu W, Kaplan DL (2016). Silk-Hydroxyapatite Nanoscale Scaffolds with Programmable Growth Factor Delivery for Bone Repair. *ACS Applied Materials & Interfaces*. [Epub ahead of print]
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4):315-7.
- Du M, Duan X, Yang P (2015). Induced Pluripotent Stem Cells and Periodontal Regeneration. *Current Oral Health Reports*. 2(4): 257–65.
- Hiroshi Egusa, Keisuke Okita, Hiroki Kayashima, Guannan Yu, Sho Fukuyasu, Makio Saeki, Takuya Matsumoto, Shinya Yamanaka, Hirofumi Yatani (2010). Gingival Fibroblasts as a Promising Source of Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One*. 5(9): e12743.
- Forni MF, Ramos Maia Lobba A, Pereira Ferreira AH, Sogayar MC. Simultaneous Isolation of Three Different Stem Cell Populations from Murine Skin (2015). *PLOS ONE*. 13;10(10).
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*. 3(4): 393-403.
- Garcia-Godoy F, Murray PE (2006). Status and potential commercial impact of stem cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration. *Stem Cells and Development*. 12;15(6):881-87.
- Gay IC, Chen S, MacDougall M (2007). Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & Craniofacial Research*. 10(3):149-60.
- Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D (2007). Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 38 Suppl 4:S3-6.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 97(25):13625-30.

- Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold PM (2006). Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcified Tissue International*. 79(5):310-7.
- Gong X, Sun Z, Cui D, Xu X, Zhu H, Wang L, Qian W, Han X (2014). Isolation and characterization of lung resident mesenchymal stem cells capable of differentiating into alveolar epithelial type II cells. *Cell Biology International*. 38(4):405-11
- Gould TR, Melcher AH, Brunette DM (1977). Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *The Anatomical Record*. 188(2):133-41.
- Harvanová D, Tóthová T, Sarišský M, Amrichová J, Rosocha J. (2011). Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biologica*. 2011;57(3):119-24.
- Heidari B, Shirazi A, Akhondi MM, Hassanpour H, Behzadi B, Naderi MM, Sarvari A, Borjian S (2013). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 5(2):104-17.
- Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC (1995). Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. *Endocrinology*. 136:124-31.
- Hoshino M, Egi T, Terai H, Namikawa T, Takaoka K (2006). Repair of long intercalated rib defects using porous beta-tricalcium phosphate cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *Biomaterials*. 27(28):4934–4940.
- Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, Ando T, Okano T (2014). Tissue engineering in periodontal tissue. *The Anatomical Record*. 297(1):16-25.
- Jingushi S, Urabe K, Okazaki K, Hirata G, Sakai A, Ikenoue T (2002). Intramuscular bone induction by human recombinant bone morphogenetic protein-2 with beta-tricalcium phosphate as a carrier: in vivo bone banking for muscle-pedicle autograft. *Journal of Orthopaedics*. (4):490-4
- Kim HJ, Kim YJ, Im GI (2009). Is continuous treatment with transforming growth factor-beta necessary to induce chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 190:1–10.

Kingsley DM (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development*. 8(2):133-46.

Larijani B, Arjmand B, Ahmadbeigi N, Falahzadeh K, Soleimani M, Sayahpour FA, Aghayan HR (2015). A simple and cost-effective method for isolation and expansion of human fetal pancreas derived mesenchymal stem cells. *Archives of Iranian medicine*. 18(11):770-5.

Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CAG (2001) Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *Journal of Periodontal Research*. 36: 71-79 .

Li F, Niyibizi C (2012). Cells derived from murine induced pluripotent stem cells (iPSC) by treatment with members of TGF-beta family give rise to osteoblasts differentiation and form bone in vivo. *BMC Cell Biology*. 13:35.

Li X, Yi W, Jin A, Duan Y, Min S (2015). Effects of sequentially released BMP-2 and BMP-7 from PELA microcapsule-based scaffolds on the bone regeneration. *American Journal of Translational Research*. 15;7(8):1417-28.

Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT (2011). Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *Journal of Endodontics*. 37(9):1217-24.

Lindhe J, Lang N, Karring T (2008). Anatomía de los tejidos periodontales. Lindhe J, Lang N, Karring T. *Periodoncia clínica e Implantología Odontológica*. Madrid. Editorial Panamericana. 5ª Edición, p. 3-49.

Liras A (2010). Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *Journal of Translational Medicine*. 8:131.

Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM (2009). Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*. 26;462(7272):433-41.

Mak J, Jablonski CL, Leonard CA, Dunn JF, Raharjo E, Matyas JR, Biernaskie J, Krawetz RJ (2016). Intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells improves cartilage repair in a mouse injury model. *Scientific Reports*. 6:23076.

Marie PJ (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 473(2):98-105.

Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K, Miyazaki K, Shimizu M, Bhawal UK, Tsuji K, Nakamura K, Kato Y (2005). Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*. 20(3):399-409. Epub 2004 Nov 29.

McCulloch CA (1985). Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *The Anatomical Record*. 211(3):258-62.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(10):5807-12.

Montesinos JJ, Mora-García Mde L, Mayani H, Flores-Figueroa E, García-Rocha R, Fajardo-Orduña GR, Castro-Manreza ME, Weiss-Steider B, Monroy-García A (2013). In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem Cells and Development*. 15;22(18):2508-19.

Morszeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*. 24(2):155-65.

Ng SL, Narayanan K, Gao S, Wan AC (2011). Lineage restricted progenitors for the repopulation of decellularized heart. *Biomaterials*. 32(30):7571-80.

Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Arzate H, Villalobos C, Nuñez L, Caffesse RG, Sanz M (2012). Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *Journal of Periodontal Research*. 47: 33–44

Paino F, Ricci G, De Rosa A, D'Aquino R, Laino L, Pirozzi G, Tirino V, Papaccio G (2010). Ecto-mesenchymal stem cells from dental pulp are committed to differentiate into active melanocytes. *European cells & materials*.20:295-305.

Palmer RM, Lumsden AG (1987). Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombinations of enamel organs and papillary, pulpal and follicular mesenchyme in the mouse. *Archives of Oral Biology*. 32(4):281-9.

Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, Kim CS (2011). Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology*. 38(8):721-31.

Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, Hockema JJ, Woods EJ, Goebel WS (2008). Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 14(2):149-56

Proksch S, Steinberg T, Vach K, Hellwig E, Tomakidi P (2014). Shaping oral cell plasticity to osteogenic differentiation by human mesenchymal stem cell coculture. *Cell and Tissue Research*. 2014;356(1):159-70.

Saito MT, Salmon CR, Amorim BR, Ambrosano GM, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Silvério KG (2014). Characterization of highly osteoblast/cementoblast cell clones from a CD105-enriched periodontal ligament progenitor cell population. *Journal of Periodontology*. 85(6):e205-11.

Salmerón C, Riera-Heredia N, Gutiérrez J, Navarro I, Capilla E (2016). Adipogenic Gene Expression in Gilthead Sea Bream Mesenchymal Stem Cells from Different Origin. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 7:113

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 10-16;364(9429):149-55.

Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S (2005). Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *Journal of Dental Research*. 84(10):907-12.

Singhatanadgit W, Donos N, Olsen I (2009). Isolation and characterization of stem cell clones from adult human ligament. *Tissue Engineering Part A*. 15(9):2625-36.

- Slavkin HC, Bartold PM (2006). Challenges and potential in tissue engineering. *Periodontology* 2000. 41:9-15.
- Solorio LD, Fu AS, Hernández-Irizarry R, Alsberg E (2010). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cell aggregates via controlled release of TGF-beta1 from incorporated polymer microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 92:1139–1144.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 20;1:e79.
- Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, Hattori H, Ueda M, Matsushita K, Nakashima M (2011). Dental pulp-derived CD31⁻/CD146⁻ side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Engineering Part A*. 17(9-10):1303-11.
- Tagliacozzi G and Maximilian T (1831). *De Curtorum Chirurgia Per Insitionem Libri Duo*. 1st ed. Venice: Berolini, Reimer.
- Tang L, Li N, Xie H, Jin Y (2011). Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *Journal of Cellular Physiology*. 226(3):832-42.
- Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M, Abe M, Takagi Y, Morita I (2007). Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 15;357(4):917-23.
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS (2000). Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*.;32(1):11-6.
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*.31(1):235-40.
- Uezumi A, Kasai T, Tsuchida K (2016). Identification, Isolation, and Characterization of Mesenchymal Progenitors in Mouse and Human Skeletal Muscle. *Methods in Molecular Biology*. 1460:241-53.

- Vasandan AB, Shankar SR, Prasad P, Sowmya Jahnvi V, Bhonde RR, Jyothi Prasanna S. (2014). Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 18(2):344-54
- Waddington CH (1957). *The strategy of the genes; a discussion of some aspects of theoretical biology*. Londres: Allen & Unwin.
- Wagers AJ, Weissman IL (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 116(5):639-48.
- Walsh S, Jefferiss CM, Stewart K, Beresford JN (2003). IGF-I does not affect the proliferation or early osteogenic differentiation of human marrow stromal cells. *Bone*. 33(1):80-9.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 22(7):1330-7.
- Wang Y, Cui CB, Yamauchi M, Miguez P, Roach M, Malavara R, Costello MJ, Cardinale V, Wauthier E, Barbier C, Gerber DA, Alvaro D, Reid LM (2011). Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology*. 53(1):293-305.
- Wikesjö UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, Jin L, Wozney JM (1999). Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *Journal Clinical Periodontology*. 26(6):392-400.
- Yan C, Xue G, Wu L, Liu J, Hou Y. (2015) Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes induced by rat fibrotic liver tissue extracts. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 29(7):878-83.
- Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P, Mao N (2004). Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Experimental Hematology*. 32(7):657-64.
- Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cell in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 3(3):301-13.

Zhang, Q., et al. (2009). "Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis." *The Journal of Immunology* 183(12): 7787-98.

Zhang G, Shang B, Yang P, Cao Z, Pan Y, Zhou Q (2012). Induced pluripotent stem cells consensus genes: implications for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cells therapy. *Stem Cells and Development* 21(6): 955-964

Zhang W, Huo Y, Wang X, Jia Y, Su L, Wang C, Li Y, Yang Y, Liu Y(2016). Decellularized ovine arteries as biomatrix scaffold support endothelial of mesenchymal stem cells. *Heart Vessels*. [Epub ahead of print].

Zheng W, Wang S, Ma D, Tang L, Duan Y, Jin Y (2009). Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. *Tissue Engineering Part A*. 15(9):2363-71.