



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA,
ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y
MEDICINA FÍSICA

Efecto Citoprotector de
la Melatonina sobre
Fármacos Antirreabsortivos

D^a Laura Párraga Linares
2015

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis ha sido un sueño para mí que empezó en Barcelona hace 8 años y parecía que nunca terminaría. Quiero agradecer a mi director de tesis Francisco Javier Rodríguez Lozano su gran interés, ayuda y capacidad de enseñarme a comprender un mundo nuevo para mí como el que era la investigación en laboratorio.

Ha sido una experiencia inolvidable que demuestra que detrás de la clínica hay un mundo muy interesante capaz de dar explicación a todos los materiales y/o medicamentos que usamos en nuestra práctica diaria. Gracias Fran por tu tiempo todos estos años y tu esfuerzo día a día.

También quiero agradecer a mi tutor Ricardo Oñate, al personal de laboratorio del Hospital Clínico la Arrixaca, especialmente a María Ángeles que estuvo a mi lado siempre resolviéndome todo tipo de dudas.

A mi marido e hijos por su paciencia y ratos que he tenido que dejar de estar con ellos para llevar a cabo la presente tesis.

INDICE

ÍNDICE

	Página
1. JUSTIFICACION	1
2. ABREVIATURAS	4
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 Bifosfonatos	8
3.1.1 Historia	10
3.1.2 Mecanismo de acción	11
3.1.3 Osteonecrosis por bifosfonatos	14
3.1.3.1 Criterios diagnósticos	15
3.1.3.2 Localización	18
3.1.3.3 Incidencia	21
3.1.3.4 Tratamiento la osteonecrosis	22
3.2 La melatonina	27
3.2.1 Definición	27
3.2.2 Biosíntesis de la melatonina	27
3.2.3 Mecanismo de acción	30
3.2.4. Funciones	31
3.3 Células madre	38
3.3.1 Definición y tipos	38
3.3.2 Células madre del diente	41
3.3.2.1 Células madre procedentes de pulpa dental y dientes deciduales	42
3.3.2.2 Células madre procedentes de folículo dental	44
3.3.2.3 Células madre procedentes de papila dental	44
3.3.2.4 Células madre procedentes de ligamento dental	45
3.3.3. Células madre procedentes de médula ósea	46

4. OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo general	49
4.2 Objetivo específico	49
5. MATERIAL Y MÉTODOS	50
5.1 Aislamiento celular	51
5.2 Recuento y estimación de la viabilidad	56
5.3 Cultivo de células de ligamento periodontal y médula ósea	58
5.4 Caracterización inmunofenotípica de las células madre de médula ósea y células madre de ligamento periodontal	60
5.5 MTT o ensayo de proliferación celular	63
5.6 Análisis estadístico	65
6. RESULTADOS	67
6.1 Aislamiento celular de BMMSCs y PDLSCs	68
6.2 Caracterización inmunofenotípica de las BMMSCs y PDLSCs	68
6.3 Efecto del Ácido zolendrónico sobre la línea celular PDLSCs	70
6.4 Efecto del ácido zolendrónico sobre la línea celular BMMSCs	74
6.5 Efecto de la melatonina sobre la línea celular PDLSCs	80
6.6 Efecto de la melatonina sobre la línea celular BMMSCs	84
6.7 Efecto de la combinación de melatonina y ácido zolendrónico sobre la línea celular BMMSCs a 72 horas	89
7. DISCUSIÓN	101

8. CONCLUSIONES	109
9. BIBLIOGRAFÍA	112
10. INDICE DE FIGURAS	138
11. INDICE DE TABLAS	143
12. ANEXOS	147

JUSTIFICACIÓN

1.JUSTIFICACIÓN

La osteonecrosis mandibular (ONM) es una entidad clínica que puede producirse como efecto secundario en pacientes que están tomando bifosfonatos como tratamiento a la osteoporosis o a lesiones malignas en el hueso. Puede presentarse de manera espontánea o ser desencadenado por un procedimiento quirúrgico bucal.

La incidencia de aparición de esta patología depende de la vía de administración del bifosfonato, siendo de un 0,001-0,01% en bifosfonatos orales y de un 1-15% en bifosfonatos intravenosos. Actualmente hay diversos protocolos de actuación ante esta enfermedad pero no existe la curación definitiva sobre todo en casos de estadio clínico avanzado.

Nuestro interés en esta línea de investigación surge debido a que se considera la extracción dentaria como la principal causa desencadenante de ONM en la mayoría de los casos, y no existe medidas terapéuticas efectivas para su tratamiento.

Por otro lado la melatonina es una hormona que se sintetiza principalmente en la glándula pineal, entre otros órganos, y que presenta múltiples funciones. Está involucrada en la regulación del sueño, tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, funciona como un inmunomodulador y estimula el metabolismo óseo. Esto explica que la melatonina podría ser ideal usarla en eventuales situaciones clínicas que requieran estimular la formación ósea y favorecer la cicatrización, como es en el caso de la osteonecrosis secundaria a bifosfonatos.

Para poder comprobar si la melatonina tiene efecto citoprotector y favorece la formación de hueso sano en pacientes que toman ácido zolendrónico, hemos planteado un estudio “in vitro” con células madre procedentes de ligamento periodontal (PDLSCs) y médula ósea (BMMSCs).

Las células madre son células indiferenciadas que tienen capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en cualquiera de los tres linajes celulares (ectodermo, mesodermo y endodermo). Tanto las PDLSCs como las BMMSCs pueden diferenciarse a osteoblastos y formar hueso.

El presente estudio in vitro presenta la hipótesis de que la melatonina oral podría ser utilizada en un futuro en el tratamiento y /o prevención de la ONM secundaria a bifosfonatos, debido a su papel antiinflamatorio y osteoinductor de células mesenquimales, implicadas en la reparación del alveolo dentario tras una extracción.

ABREVIATURAS

2. ABREVIATURAS

AADC: Descarboxilasa aromática de aminoácidos L.

ASBMR: American Society for Bone and Mineral Research.

AANAT: Arilalquilamina N-acetiltransferasa.

ALE: Alendronato.

APCs : Células de la papila dental.

AAOMS: American Association of Oral and Maxilofacial Surgeons.

BFs: Bifosfonatos.

BMSCs: Bone marrow derived mesenchymal stem cells. Células madre procedentes de médula ósea.

CMM: Células madre mesenquimales .

CTX: Telopéptido C- Terminal del colágeno de tipo I.

DHPR: Dihidroproteína reductasa.

DFSC: Dental Follicle Stem Cells. Células madre procedentes de folículo dental.

DM: Diabetes mellitus.

DPSCs: Adult Dental pulp stem cells. Células madre del adulto.

FNT: Factor de necrosis tumoral.

HOMT: Enzima 5-hidroxiindol-O-metiltransferasa.

HPDL: Ligamento Periodontal Humano.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.

MEL: Melatonina.

MEM: Minimum essential medium.

MSC: Células madre.

NSQ: Núcleo supraquiasmático.

ONM : Osteonecrosis de los maxilares.

PAM: Pamidronato.

PBS: Fetal bovine serum. Suero bovino fetal.

PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento.

PDLSC: Periodontal Ligament Stem Cells. Células madre procedentes de ligamento periodontal.

SNA: Serotonina N-acetilasa.

SCAP: Stem cells from the apical part of the papilla. Células madre procedentes de la papila apical.

SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth. Células madre procedentes de dientes deciduales.

THP: Triptófano hidroxilasa.

5-HT: 5 -hidroxitriptófano.

6-SMT: 6-sulfatoximelatonina.

ZA: Ácido zolédronico o Zometa®.

ZOL: zolendronato.

INTRODUCCIÓN

3.INTRODUCCIÓN

3.1. BIFOSFONATOS

Los bifosfonatos son fármacos utilizados en pacientes con osteoporosis y en oncología. Presentan una estructura molecular parecida al pirofosfato natural pero no son metabolizados por los osteoclastos por lo que evitan la reabsorción ósea (Paulo, 2014). En la fig. 1 se puede observar la similitud química entre el pirofosfato y los bifosfonatos:

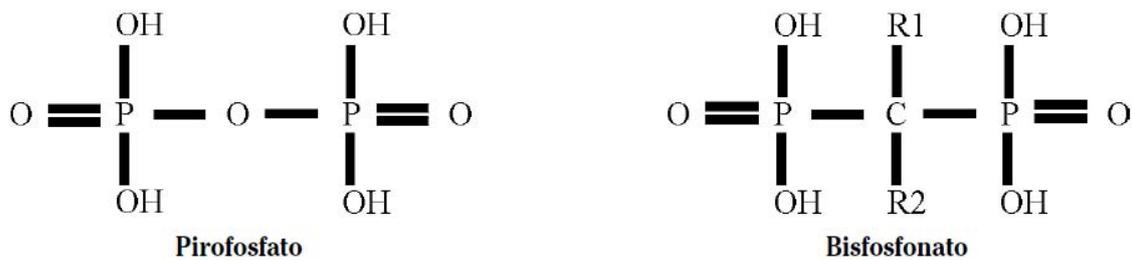


Figura 1. Estructura química del pirofosfato y bifosfonato (tomado de Cardona, 2009).

Existen varios tipos de bifosfonatos que se diferencian por los distintos *componentes de las cadenas R1y R2*. Los bifosfonatos simples no tienen nitrógeno y los aminobifosfonatos o bifosfonatos nitrogenados sí (Cardona 2009, Siqua 2014).

-Los Nitrogenados o aminados son: zolédronato, ibandronato, pamidronato, risedronato y alendronato.

-Los no nitrogenados son: tiludronato, clodronato y etidronato.

Hoy en día se utilizan los bifosfonatos nitrogenados debido a su mayor potencia (Giribone, 2013). Cuanto más potente es un bifosfonato, menos reabsorción ósea fisiológica se produce (Cardona, 2009).

Existe otra clasificación según la *época de síntesis*, tal y como se refleja en la Tabla 1:

Bisfosfonato	Vía de administración	Nitrogenado	Potencia
Etidronato	Oral	No	1
Clodronato	Oral	No	10
Tiludronato	Oral	No	50
Alendronato	Oral	Sí	1.000
Risedronato	Oral	Sí	1.000
Ibandronato	Oral / I.V.	Sí	1.000
Pamidronato	I.V.	Sí	1.000-5.000
Zoledronato	I.V.	Sí	10.000

Tabla 1. Vía de administración y potencia relativa de los bifosfonatos (tomado de King, 2008).

La vía de administración es un aspecto muy importante a la hora de hablar de potencia de los bifosfonatos. Por vía oral la biodisponibilidad es menor al 2%, a diferencia de los bifosfonatos administrados vía parenteral. En un estudio de Mavrokokki, se estimó una biodisponibilidad de los bifosfonatos administrados oralmente menor del 1%, y de un 50% para los administrados por vía intravenosa (Mavrokokki, 2007).

Los pacientes con osteoporosis reciben para su tratamiento frecuentemente los bifosfonatos (BFs) que se administran vía oral, tales como el etidronato, risedronato, tiludronato y alendronato y como excepción, en algunas casos se usa el ácido

zolédronico vía parenteral (Inderjeeth, 2014). El risedronato es considerado un fármaco de primera elección por presentar una potencia relativa 2000 veces mayor que el etidronato (Nutti, 2014). En cambio, en casos de metástasis en el hueso, cánceres primarios con reabsorción ósea (mieloma múltiple) y otras enfermedades óseas (enfermedad de Paget) se utilizan bifosfonatos intravenosos que son más potentes: pamidronato y zolendronato (Marx, 2005). En el caso de la enfermedad de Paget el zolendronato se presenta como el fármaco de elección (Wat, 2014). También son utilizados los bifosfonatos intravenosos en hipercalcemia tumoral benigna (Marx, 2003).

En el año 2003 se observó por primera vez un efecto secundario relacionado con estos medicamentos en el área maxilofacial, una lesión necrótica tras una extracción dentaria de tórpida evolución, que no responde a antibióticos tras 8 semanas de tratamiento y se la denominó **osteonecrosis de maxilares secundaria a bifosfonatos** (Marx 2005, Marx 2003, Ruggiero 2004). Es precisamente la gravedad esta patología ósea, lo que justifica el interés de nuestro trabajo de investigación y así dejar medidas terapéuticas abiertas en un futuro.

3.1.1. HISTORIA DE LOS BIFOSFONATOS.

Los bifosfonatos conocidos antiguamente como difosfonatos, fueron fabricados por Ingenieros químicos alemanes en el siglo XIX, como agentes anticorrosivos para evitar el depósitos de carbonato de calcio en sus chimeneas (Storm, 1990).

Fue en el año 1960 cuando se utilizaron por primera vez los bifosfonatos como medida terapéutica. La primera referencia de los bifosfonatos en PubMed remonta al año 1968 donde se utilizaron para el tratamiento de la miositis osificante progresiva, calcinosis tras dermatomiositis, enfermedad de Paget y osteoporosis senil (Fleisch 1968, Russell 1973). Seis años después, Sheppard y col. (Sheppard, 1974) utilizan el etidronato para tratar enfermedades pediátricas con calcificación anormal y formación ectópica de hueso.

El primer bifosfonato aprobado por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos en 1995 fue el alendronato que fue utilizado en la osteoporosis postmenopáusicas (Chaiamnuay, 2006).

3.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN

La estructura química de los bifosfonatos le confiere la característica de unirse a los iones de calcio que se hallan en los huesos (Rogers, 2004), acción que realizan sin haber sido prácticamente metabolizados en el torrente sanguíneo, lo que les confiere una vida media muy larga (Lin, 1999).

En cuanto a su *modo de actuar*, diferenciamos los bifosfonatos no nitrogenados de los nitrogenados. Los bifosfonatos no nitrogenados o simples se introducen en el osteoclasto como análogos del adenosín trifosfato provocando su apoptosis. Mientras que los bifosfonatos nitrogenados o aminobifosfonatos a tan sólo concentraciones nanomolares inhiben la enzima farnesil difosfato sintetasa en los osteoclastos, provocando la inhibición de lípidos isoprenoides, muy importantes en la farnesilación y geranilación de proteínas GTPasa señalizadoras. Al desaparecer estas proteínas

señalizadoras, disminuye la actividad reabsortiva y se produce la muerte del osteoclasto (Cardona, 2009).

El átomo de carbono que poseen unido a los dos átomos de fósforo, es lo que le confiere a los bifosfonatos la resistencia de ser degradados por la fosfatasa alcalina, enzima que sintetiza el osteoblasto, dando lugar a su acción antirresortiva (Giribone, 2013).

Las funciones más importantes de los bifosfonatos son:

- Inhibición de la reabsorción ósea osteoclástica inhibiendo la reabsorción.
- Inducen a los osteoblastos a secretar un inhibidor de la secreción ósea mediada por los osteoclastos.
- Apoptosis de los osteoclastos.
- Evitar la apoptosis de los osteoblastos.
- Efecto antiangiogénico.
- Propiedades antitumorales.
- Alteración de la cicatrización por afectación de los fibroblastos (De Colli 2015, Hagelauer, 2105). Scheper y cols. realizaron un estudio in vitro en el que observaron que el ZA liberado del hueso afectaba a la mucosa oral de los tejidos blandos ya que inducía la apoptosis temprana y reducía el crecimiento celular (Scheper, 2010). Otros estudios in vitro, examinan los cambios celulares producidos en los tejidos blandos inducidos por los osteoblastos tratados con ZA (Saracino, 2012).

Los *bisfosfonatos orales* tienen una biodisponibilidad del 1-2%. Los más usados en el mercado son (Pelayo, 2004):

- Alendronato (Fosamax®).
- Clodronato (Bonafos®).
- Etidronato (Difosfen®, Osteum®).
- Risedronato (Actonel®, Acrel®).
- Tiludronato (Skelid®).

En cambio, los bisfosfonatos usados por *vía parenteral* presentan una biodisponibilidad del 50%, lo que aumenta la incidencia de complicaciones. Las marcas comerciales más usadas son:

- Acido Ibandrónico o Ibandronato (Bondronat®, Bondeza®).
- Pamidronato (Aredia®, Linoten®, Xinsidona®).
- Zoledronato (Zometa®).

El excesivo uso de los bifosfonatos despierta polémicas en el asunto, ya que al inhibir la reabsorción ósea, los huesos resultantes presentan comportamientos metabólicos alterados que pueden perjudicar al hueso, por ello a los pacientes de menor riesgo de fractura ósea se les recomienda interrumpir el tratamiento después de 3-5 años para un "descanso de los medicamentos", en cambio en los pacientes de alto riesgo, que deben seguir la terapia al menos entre 6-10 años, el uso de bifosfonatos a largo plazo es conveniente ya que ofrece más beneficios que riesgos (Watts, 2014).

3.1.3. OSTEONECROSIS DE LOS MAXILARES SECUNDARIA A BIFOSFONATOS (ONM).

Encontramos en la literatura diferentes definiciones sobre esta patología. La American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) y la American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) la describen como un área de hueso expuesto en la región buco-maxilar que persiste más de 8 semanas después de su identificación, en un paciente que estuvo o está recibiendo tratamiento con bifosfonatos (BFs) y en ausencia de radiación previa en la región craneofacial (Rasmusson 2014, Ruggiero 2014). Por otro lado, el equipo de Bagán y cols., la define como una osteomielitis crónica de evolución lenta y tórpida, que no tiende a la curación (Bagán, 2005).

La AAOMS en la reunión efectuada en septiembre del 2013 para evaluar todos los conocimientos de la OMN hasta entonces, recomendó cambiar la nomenclatura de osteonecrosis secundaria a bifosfonatos por osteonecrosis asociada a medicamentos antirresortivos y terapias antiangiogénicas (Ruggiero, 2014). La evidencia actual, sugiere que hay una relación entre la aparición de OMN de la mandíbula y el uso de otras clases de tratamientos farmacológicos inhibidores de RANKL, así como inhibidores de la angiogénesis. Aunque estos fármacos tienen diferentes mecanismos de acción de los bisfosfonatos, todos ellos parecen interferir con el proceso de remodelación ósea es decir, alterar el equilibrio entre la resorción ósea y la formación de hueso que puede ser la explicación más plausible para la patogénesis de la osteonecrosis de la mandíbula (Hamadeh, 2015).

En cuanto a la microbiología en la ONM, después del actinomyces, el Streptococcus fue el microorganismo más colonizado (54.7%). Otras colonias crecidas incluyen Cándida, Staphylococcus, Klebsiella, Eikenella, Haemophilus, Fusobacterium, y Escherichia (Hinson, 2014). En la Fig. 2. se observa corte histológico de osteonecrosis maxilar con presencia de actinomyces.

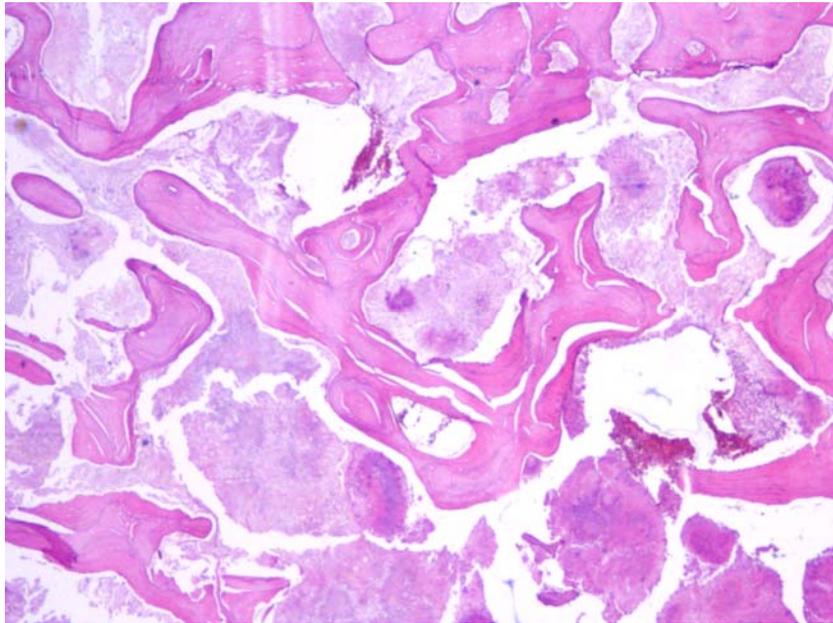


Fig. 2. Imagen histológica de la Osteonecrosis maxilar. Se observa hueso áreas de hueso necrótico con abundantes colonias de Actinomyces. Foto cedida por el Dr. Aguirre.

3.1.3.1 CRITERIOS DIAGNOSTICOS

Para diferenciar la OMN de cualquier otra patología ósea, la definición de OMN ha sido modificada de la establecida en el año 2009 por la AAOMS (Ruggiero, 2009). Según el último consenso de la AAOMS, debe considerarse la OMN si el paciente presenta todas las características siguientes (Ruggiero, 2014):

1. Paciente que recibió o está recibiendo medicamentos antirresortivos (bifosfonatos) o antiangiogénicos.
2. Hueso expuesto o hueso que puede ser sondado a través de una fístula intraoral o extraoral en la región maxilar y que persiste más de 8 semanas.
3. No hay antecedentes de radioterapia ni enfermedad metastásica en los maxilares.

La lesión se presenta de forma espontánea o, más frecuentemente, tras una extracción dental en un 52%-61% de los casos (Ruggiero, 2014).

Existen 3 estadios según el grado de la lesión (Ruggiero, 2014):

-Estadio 0: En riesgo. No hay evidencia clínica de necrosis ósea. Presenta síntomas y signos y/o hallazgos radiográficos inespecíficos.

-Estadio I: Exposición de hueso necrótico, sintomático y sin signos de infección aguda.

-Estadio II: Exposición de hueso necrótico asociado a dolor y signos de infección.

-Estadio III: Exposición de hueso necrótico asociado a dolor, signos de infección, fístula cutánea y evidencia clínica y/o radiografía de secuestro óseo u otra complicación (fracturas, etc.). En este estadio el hueso necrótico se extiende más allá de la región de hueso alveolar (seno maxilar, hueso cigomático, senos paranasales...).

A pesar de la falta de consenso sobre la evolución radiográfica de la OMN, encontramos en la literatura, que en estos casos se observa la formación de un cuerpo necrótico rodeado por una circunferencia radiolúcida, que aumenta con el tiempo (Leite, 2014).

En el año 2009, Bagán y cols. (Bagán 2009), subdividen el estadio II en 2 tipos :

-Estadio IIa: exposición ósea con hueso necrótico o bien una pequeña ulceración de la mucosa oral sin exposición de hueso necrótico pero con síntomas. Dolor e infección de los tejidos blandos/hueso. Se controla con tratamientos conservadores y no progresa.

-Estadio IIb: exposición ósea con hueso necrótico o bien una pequeña ulceración de la mucosa oral sin exposición de hueso necrótico, pero con síntomas. Dolor e infección de los tejidos blandos/hueso. No se controla con tratamientos conservadores y progresa la necrosis o bien los signos infecciosos derivados de ella.

Por otro lado Giribone y cols. la definen como una lesión crónica que avanza lentamente pudiendo aparecer en 1 ó 2 zonas a la vez, y que por su tamaño puede afectar a estructuras anexas importantes tales como senos maxilares y/o nervio dentario inferior (Giribone, 2013).

3.1.3.2. LOCALIZACIÓN

La osteonecrosis por bifosfonatos que nos interesa se localiza en el territorio maxilomandibular (López, 2014). Cuando se encuentran en la cadera suele deberse a tratamientos con corticoides (Dilisio, 2014).

La osteonecrosis maxilar se produce por la falta de aporte vascular y la falta de remodelación y regeneración ósea. Los huesos maxilares presentan una tasa de recambio en el hueso alveolar 10 veces mayor que los huesos largos, por ello son más susceptibles a la osteonecrosis (Prado, 2011) (Fig. 3.)



Fig. 3. Imagen de osteonecrosis asociada a bifosfonatos en la región mandibular tras extracción dentaria.

Existen varias hipótesis sobre esta localización. Marx en el año 2003 argumentó que era debido a la presencia de dientes (Marx, 2003), ya que estos pueden presentar patología periodontal (Li 2014, Thumbigere 2014), abscesos dentales, tratamientos endodóncicos incorrectos y otras patologías, que aumentan la tasa de recambio óseo en los maxilares

(Cheong, 2014). Estos pacientes con patología dental presentaban siete veces mayor riesgo de presentar OMN (Gupta, 2013).

Otra explicación sería por las fuerzas que se ejerce en la masticación que someten a la cavidad oral a un estrés continuo. Esto provoca la aparición de microfracturas a diario que en pacientes que se encuentran bajo tratamiento con bifosfonatos no se reparan y por tanto favorecen la aparición de osteonecrosis (Migliorati, 2005).

Dentro del territorio maxilomandibular, la osteonecrosis se encuentra con mayor prevalencia en la mandíbula y sobre todo en la zona posterior como o se puede observar en la fig. 4 (Bocanegra 2010).

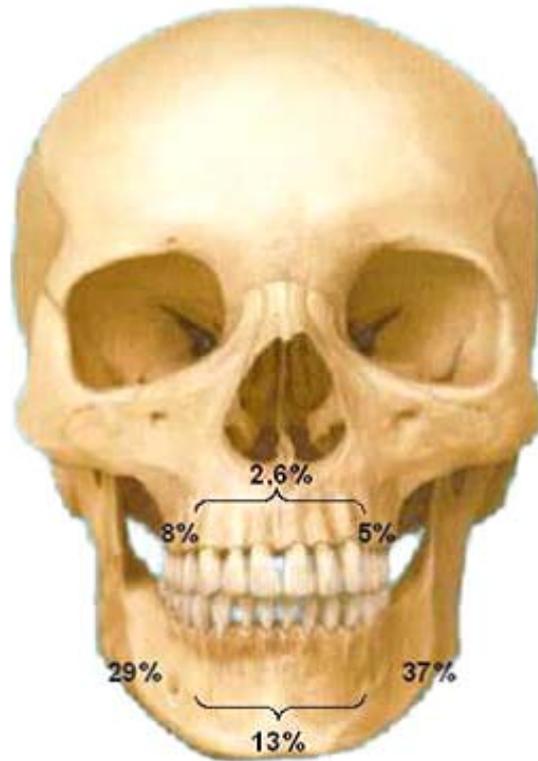


Figura 4. Prevalencia de la osteonecrosis en el territorio maxilomandibular (tomado de Bocanegra, 2010)

La ONM se suele presentar (en casi un 70% de los casos) como una zona que no cicatriza tras la extracción de un diente (Lee, 2014) o como una exposición ósea inflamada y sobreinfectada tras una intervención quirúrgica en la cavidad bucal (Cardona, 2009). Pero también hay casos en que pueden presentarse de forma espontánea sin haber realizado previamente ninguna cirugía oral. Algunos factores locales que pueden favorecer la aparición de ONM espontáneas son: torus (Kaneko, 2014) o exostosis óseas cubiertas por encía de biotipo muy fino, zonas traumatizadas por prótesis mal ajustadas y en general las zonas donde el mucoperiostio de revestimiento es muy delgado (cara lingual posterior mandibular y zona vestibular

posterior maxilar) (Castillo Pardo de Ver, 2007). De tal modo que la localización puede ser variada. Además de estos factores locales de riesgo, existen factores sistémicos que pueden contribuir al desarrollo de OMN como es el caso de la diabetes mellitus (DM). Esta relación es debida a la patogénesis de la DM: isquemia microvascular, disfunción de la célula endotelial, la reducción de la remodelación del hueso, y el aumento de la apoptosis de los osteoblastos y osteocitos. Además, DM induce cambios en la función celular inmune y promueve la inflamación (Peer, 2015).

3.1.3.3 INCIDENCIA

La incidencia de osteonecrosis es mayor en pacientes tratados con bifosfonatos por vía parenteral para patologías neoplásicas, y mucho menor cuando el bifosfonato es administrado por vía oral para el tratamiento de osteoporosis fundamentalmente (Polymenidi 2014, Lee 2014).

Existen varios estudios en la literatura científica sobre la incidencia de esta patología. Según el consenso actualizado de la AAOMS del año 2014, los pacientes que toman bifosfonatos intravenosos presentan un riesgo del 1-15% (Ruggiero 2014, Khan 2015).

Los efectos de los bisfosfonatos intravenosos sobre el hueso pueden durar incluso 10 años después de haber finalizado el tratamiento (Calvo, 2009). En contraste con otras terapias de antirresortivos en el cual la actividad se pierde rápidamente después de la interrupción (es decir, el denosumab, el estrógeno, raloxifeno, y calcitonina) (Brown,

2014). Por otro lado el riesgo de presentar ONM en pacientes tratados con *bifosfonatos orales* se estima en 0.001% a 0.01% según la AAOMS (Khan, 2015).

Además, se ha demostrado que la curación es mayor en pacientes con bifosfonatos orales (79%) que por bifosfonatos intravenosos (29%) (Hallmer, 2014). En pacientes que han tomado bifosfonatos orales, la lesión puede aparecer a partir del 3er año de tratamiento, con un tiempo medio de consumo de 5,6 años, siendo la duración del tratamiento lo que aumenta el riesgo de lesión (Erviti, 2009).

3.1.3.4 TRATAMIENTO DE LA OSTEONECROSIS DE LOS MAXILARES SECUNDARIA A BIFOSFONATOS.

El tratamiento de la osteonecrosis de los maxilares tiene como objetivo controlar el dolor, la infección y evitar que avance la necrosis ósea (Ruggiero, 2014).

Las medidas preventivas en pacientes que toman bifosfonatos resultan ser lo más eficiente para evitar esta patología (Ruggiero, 2014). Por ello es muy importante que el dentista tenga un buen conocimiento de la enfermedad. En una encuesta realizada en la provincia de Ontario (Canadá) para medir la información de los dentistas sobre la OMN, encontraron que sólo el 60% presentaba un buen nivel de conocimiento y la mayoría (un 63% de los dentistas) remitían al paciente que tomaba bifosfonatos al cirujano oral (Alhussain, 2015).

Esto implica que antes de realizar cualquier tratamiento, si el paciente refiere estar tomando esta medicación, debemos de preguntar la vía de administración, el tiempo y frecuencia de consumo y así valorar el riesgo de aparición. Existen diversos protocolos de tratamiento odontológico para los pacientes que toman bifosfonatos (Giribone 2013, Cardona 2009, Ruggiero 2014).

A continuación se detallan los aspectos más importantes a tener en cuenta en función del momento en que el paciente acude a realizarse el tratamiento dental; si lo hace antes de empezar el tratamiento con bifosfonato o no, según el tipo de bifosfonato que esté tomando en ese momento, si es por vía oral o intravenoso, o si en el momento de acudir a la clínica dental presenta ya la osteonecrosis. Para ello se divide en 3 grupos (Cardona 2009, Ruggiero 2014):

- ***Pacientes que van a empezar el tratamiento con bifosfonatos:***

Se debe hacer una historia clínica rigurosa y detallada del paciente complementada con radiografías periapicales y una radiografía panorámica. Se darán instrucciones de higiene y se realizarán tratamientos preventivos: extracción de dientes semiincluidos, dientes periodontales con mal pronóstico y dientes no restaurables.

Se estima que es el momento perfecto para colocar los implantes, hacer endodoncias y restauraciones con caries activas y en caso de presentar enfermedad periodontal, tratarla. Se debe eliminar factores irritativos realizando remodelado óseo en casos de rebordes con filo de cuchillo, torus de gran tamaño u otro tipo de exostosis ósea que pueda perforar la mucosa y ulcerarla.

En caso de que el paciente vaya a tomar bifosfonatos por vía intravenosa, debe empezar a hacerlo de 4 a 5 semanas después de haber eliminado los focos infecciosos (Dimopoulos, 2009).

- ***Pacientes que están bajo tratamiento con bifosfonatos pero que no presentan osteonecrosis:***

En función del tiempo que lleve tomando los bifosfonatos, se determinará el modo de actuación. Si los está tomando en un tiempo inferior a 3 años, el tratamiento será exactamente el mismo sin tener que actuar odontológicamente de manera diferente (Guttenberg, 2008). En cambio, si el tiempo de consumo de bifosfonatos es mayor a 3 años se debe de trabajar de manera preventiva realizando sólo aquellas cirugías justificadas y evitando grandes traumas quirúrgicos. En el caso de colocar implantes no se observa alteración en la osteointegración. Se efectuará una técnica mínimamente invasiva, evitando grandes colgajos y siempre cierre primario para favorecer cicatrización por primera intención (Ruggiero, 2014). Las extracciones dentales se realizarán de manera atraumática, intentando no dejar hueso expuesto y pudiendo colocar esponjas hemostáticas en el alveolo. Se evitarán espículas óseas que puedan ulcerar la encía. Se dará augmentine 875mg 1/8 horas, 2 días antes y 10 días después (Ruggiero, 2014) y en la medida de lo posible procuraremos utilizar anestésico sin vasoconstrictor. El paciente se enjuagará con clorhexidina al 0,12% 2 días antes y 15 días después (Junquera 2008, Ruggiero 2014). Mientras que otras intervenciones quirúrgicas como la colocación de implantes dentales no aumentan el riesgo de osteonecrosis dado que la exposición al medio ambiente bacteriano de la cavidad oral parece esencial para el desarrollo de lesiones necróticas (Rasmusson, 2014).

Existe un marcador bioquímico de remodelado óseo que es el CTX (telopéptido C-Terminal del colágeno de tipo I). En pacientes que llevaban tomando mucho tiempo bifosfonatos, las cifras del CTX indicarán una recuperación del remodelado óseo. El valor medio normal es de 400pg/ml, de tal manera que valores inferiores a 150pg/ml representan un riesgo elevado a osteonecrosis siendo aconsejable postponer la cirugía y mandar informe a su médico de cabecera, y valorar la posibilidad de interrumpir el tratamiento con bifosfonatos durante 3 meses, para después repetir la prueba y ver si ya existe menor riesgo para efectuar la cirugía (Marx 2007, Schwart 2015).

- *Pacientes que toman bifosfonatos y padecen osteonecrosis.*

Se confirmará el diagnóstico de osteonecrosis mediante una historia clínica, revisando su medicación y utilizando pruebas radiológicas complementarias. La biopsia no está indicada (Giribone, 2013), sólo se analiza el hueso expuesto si el tratamiento es el quirúrgico.

En función de los estadios clínicos anteriormente citados, el tratamiento consistirá (Ruggiero, 2014):

-Estadio I: Estos pacientes necesitan tratamiento médico incluyendo el uso de enjuagues antimicrobianos orales, tales como clorhexidina 0,12%. El tratamiento quirúrgico no es requerido.

-Estadio II: Estos pacientes necesitan del uso de enjuagues antimicrobianos orales en combinación con antibióticos. Aunque el hueso local y la infección de tejidos blandos no se consideran la etiología principal para este proceso, la colonización del hueso expuesto es muy común. La mayoría de los microbios aislados son sensibles a la penicilina.

-Estadio III: en este estado acudiremos a antibióticos vía intravenosa. Se recomienda realizar la exéresis del hueso expuesto móvil. Algunos autores son partidarios de grandes desbridamientos quirúrgicos y buscar el cierre por primera intención, en cambio otros prefieren tratamientos conservadores para evitar el riesgo de aumentar el tamaño de la osteonecrosis. Pacientes en estadio 3 pueden requerir de la reconstrucción después de la resección con placas u obturadores, aunque debe valorarse clínicamente el posible fracaso de las mismas (Ruggiero, 2014).

Independientemente de la baja incidencia, en algunos casos, la OMN puede convertirse en una condición severa y comprometer la calidad de vida del paciente. Por ello todas las líneas de investigación dirigidas a favorecer el tratamiento de dicha patología, despiertan un gran interés para su aplicación clínica.

3.2. LA MELATONINA

3.2.1. DEFINICION

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptofamina) es una neurohormona principalmente sintetizada por la glándula pineal (fundamentalmente durante el período nocturno de los ciclos circadianos), sustancia aislada por primera vez por el dermatólogo Aaron Lerner y colaboradores, quienes consiguieron aislar una pequeña cantidad de un factor activo procedente de 2500 glándulas pineales de vaca (Lerner, 1960). Estos autores observaron que dicha molécula aclaraba los melanocitos en la piel de anfibios, y le dieron el nombre de melatonina al relacionar su función con el pigmento melanina y su estructura con la serotonina (Lerner, 1959). Además de en el ser humano, la melatonina es una sustancia natural que podemos encontrarla en otras especies como en determinadas bacterias (Balzer, 1991), en algunas plantas (Reiter, 2015) o incluso en peces (Mukherjee, 2015).

La melatonina comenzó a ser una hormona de gran interés cuando se descubrió su función de regular y sincronizar el ritmo biológico (Armstrong, 1986) y como mediador de las respuestas ante cambios en el fotoperíodo.

3.2.2 BIOSINTESIS DE LA MELATONINA

Se sintetiza a partir del triptófano, a través de la serotonina (5-hidroxitriptamina) tras varios procesos enzimáticos como se muestra en la fig. 5. La enzima N-

acetiltransferasa, convierte la serotonina en N-acetilserotonina, que es convertido a melatonina por medio de la enzima 5-hidroxiindol-O-metiltransferasa (HOMT).



Figura 5. Vía para la síntesis de serotonina y melatonina a partir del triptófano.

Abreviaciones: THP = triptófano hidroxilasa, 5-HT = 5 hidroxitriptófano, AADC = descarboxilasa aromática de aminoácidos L, SNA = serotonina N- acetilasa, HOMT = hidroxindol-O-metiltransferasa.

En la producción de la melatonina ocurren dos actuaciones enzimáticas muy importantes. La primera es la N-acetilación por arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) para formar N-acetilserotonina. Esta enzima actúa principalmente en la noche (Klein, 2007). La segunda actuación viene dada por medio de la enzima 5-hidroxiindol-O-metiltransferasa (HOMT) también denominada acetilserotonina O-metiltransferasa que produce la transferencia de un grupo metilo de la Sadenosilmetionina al grupo 5-hidroxi de la N-acetilserotonina para producir melatonina. La HOMT no viene tan regulada por la oscuridad pero en cambio marca la producción máxima de melatonina durante la noche (Liu, 2005).

Esta biosíntesis se lleva a cabo por una vía multisináptica que comienza con la información recibida a través de la retina y se transmite al núcleo supraquiasmático (NSQ) por el tracto retino-hipotalámico (Moore, 1978). El NSQ, situado en el

hipotálamo anterior por encima del quiasma óptico, constituye el sitio principal de la regulación del ritmo circadiano (Kim, 2015).

La producción de melatonina está influida por el ciclo día-noche de manera que en los periodos de oscuridad obtenemos la dosis máxima (sobre todo entre las 12 y las 2 de la madrugada), y en periodos de luz la secreción queda inhibida (entre el medio día y las 14h) (Simonneaux, 2003). Otros factores que influyen en la producción de melatonina son la edad (a menor edad mayor cantidad de melatonina), el ciclo de la menstruación, el estrés, la actividad deportiva y los fármacos beta- bloqueantes (Ariznavarret, 2002).

La melatonina sintetizada pasa a sangre pudiendo alcanzar todos los tejidos (Tan, 1999) aunque la que se produce en la retina, y otros órganos que es la melatonina extrapineal, puede actuar allí (Reiter, 1991). Existen evidencias de que la placenta humana sintetiza melatonina (Valenzuela, 2015). Otras zonas donde se forma melatonina son en la piel y en médula ósea (Slominski, 2005).

La melatonina parece estar implicada en el progreso normal del embarazo, con niveles significativamente más altos después de 32 semanas. Además existe evidencia sólida de que la melatonina tiene un efecto neuroprotector (Voiculescu, 2014).

Más del 90% de la melatonina circulante se metaboliza en el hígado donde se cataboliza y se elimina en la orina en forma de compuestos sulfatados (6-sulfatoximelatonina o 6-SMT). Presenta una vida media corta (entre 20 y 45 minutos), y

un mala biodisponibilidad oral que disminuye la idoneidad de su uso como fármaco, a pesar de sus múltiples funciones fisiológicas (Carocci, 2014).

Al tratarse de una molécula muy lipofílica, la melatonina circulante atraviesa la membrana plasmática para actuar a nivel intracelular (Acuña-Catroviejo, 2002) y la barrera hematoencefálica. Además también es capaz de atravesar la placenta y se cree que regula múltiples aspectos de la fisiología perinatal (Johnston, 2015).

3.2.3 MECANISMO DE ACCION

Una de las propiedades más importantes de la melatonina es su capacidad multifuncional o pleiotropía. Esta característica viene dada por su diversa distribución de receptores, de lugares de biosíntesis y de efectos intracelulares.

La melatonina se une a receptores de membrana de alta afinidad. Hay tres descritos como bien describe Dubocovich en su artículo (Dubocovich, 2003): MT1, MT2 y MT3. Los receptores MT1 y MT2 (Mel1a y Mel1b), son receptores de membrana acoplados a proteína G. Estos receptores inhiben la acenil ciclase provocando que el adenosin monofosfato cíclico (AMPc) que se encuentra en el interior de la célula disminuya. El MT3 es un receptor de membrana no acoplado a proteína G ya que no cumple todos los requisitos y su activación estimula la hidrólisis de fosfoinositol (Duvocovich, 2005). Estos receptores los podemos localizar distribuidos en diversas zonas del SNC y en otros órganos y tejidos como en el pulmón, tracto gastrointestinal, glándula harderiana, ovarios, riñón, neutrófilos, linfocitos B, hígado, tejido adiposo, glándula adrenal y corazón (Pandi-Perumal, 2008).

3.2.4 FUNCIONES DE LA MELATONINA

La melatonina está involucrada en varios procesos fisiológicos, como la regulación del sueño / vigilia en el ciclo circadiano. Tiene propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, funciona como un inmunomodulador, y estimula el metabolismo óseo.

1- La melatonina presenta muchas funciones que le otorgan la propiedad de **agente antioxidante** (Ianas 1991, Cuesta 2011, Sánchez 2015). Estas funciones son: estimula la acción de enzimas antioxidantes, incrementa a otros antioxidantes, promueve la realización de la fosforilación oxidativa mitocondrial, reduce el escape de electrones, expresión génica de enzimas de óxido reducción y elimina radicales libres (Tan 1993, Pieri 1994).

Estas acciones se realizan en todos los niveles celulares por ser una molécula altamente lipofílica como ya dijimos anteriormente, por tanto actúa a nivel del núcleo, de la mitocondria , del citosol y de la membrana (Costa, 1995).

2- Por otro lado la melatonina ejerce como **inmunomodulador**, en tanto que, en situaciones en las que no haya producción de melatonina, el sistema inmológico disminuye. La melatonina aumenta a través de los monocitos la producción de IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral (FNT), e IL-12 y a través de las células mononucleares aumenta la producción de IL-2, IFN- γ y la IL-6. Además, mejora la función inmune mediante la estimulación directa de células polimorfonucleares, macrófagos, células NK y linfocitos (Mehta, 2014).

Los efectos de la serotonina y por tanto de la melatonina, en las células inmunes pueden ser importantes en la evolución clínica de patologías con componente inflamatorio, tales como: la depresión mayor, la fibromialgia, enfermedad de Alzheimer, psoriasis, artritis, alergias y asma. Por lo tanto, la regulación farmacológica del sistema serotoninérgico puede modular la función inmune y proporcionar alternativas terapéuticas para estas enfermedades (Arreola, 2015).

3- La melatonina presenta **propiedades anticancerígenas**. Ensayos bien controlados, que examinaron la correlación entre los niveles de melatonina y la actividad neoplásica, llegaron a la conclusión de que la melatonina, a través de su capacidad antiproliferativa, antioxidante y acciones inmunoestimulantes (activa los linfocitos CD4), debe considerarse como un agente natural oncostática (Zamfir, 2014).

Numerosos estudios han documentado que cuando se administra en combinación con quimioterapia, la melatonina aumenta la supervivencia global de un año y reduce los efectos secundarios tóxicos (Vinther, 2015). La melatonina puede ser beneficiosa en el tratamiento del cáncer de mama (Kochan, 2015), carcinoma hepatocelular o melanoma (Srinivasan, 2011), cáncer de próstata y cánceres de hueso entre otros y en los tumores de la cavidad oral como el carcinoma epidermoide (Cutando, 2011).

Por otro lado, la oscuridad de la noche suprime la producción de melatonina. Esta inhibición es la iniciación y crecimiento del cáncer por ello las personas que trabajan habitualmente en la noche o cuyos ritmos circadianos son interrumpidos presentan

mayor riesgo de cáncer de mama (Hill, 2015), próstata, endometrio y colon (Reiter, 2007).

4- En un estudio de Nakade y cols. en el año 1999 se demostró que la melatonina a dosis entre 50 y 100 microM estimula la proliferación y la síntesis de colágeno de tipo I en las células óseas humanas in vitro (Nakade, 1999) lo cual se deduce que la melatonina tiene un papel importante en la **estimulación y formación de hueso** (Litovka, 2014).

El hueso se forma mediante un proceso de remodelación continuado que implica la resorción del hueso viejo por los osteoclastos, y la formación de nuevo hueso por los osteoblastos. Esto es ejecutado por factores de crecimiento, citoquinas producidas de la médula ósea y por la acción de las hormonas sistémicas, como la hormona paratiroidea, estradiol o la hormona de crecimiento (GH). Uno de los candidatos para la modulación hormonal de la formación de osteoblastos y osteoclastos es la melatonina que está presente en altas cantidades en la médula ósea, donde se encuentran los precursores de las células óseas. Otra posible célula diana para la melatonina es la de los osteoclastos, lo cuales pueden verse inhibidos a través de su capacidad antioxidante (Cardinali, 2003). Además, la melatonina actúa a nivel de las células del hueso al producir una disminución del estrés oxidativo y mantener la función de la mitocondria (She, 2014).

En un estudio de Calvo-Guirado y cols. en tibias de conejos, se demostró que en el grupo de casos operados con injertos tratados con melatonina, el hueso se regeneraba más rápido que en las zonas con injerto de hueso porcino colagenizado (Calvo, 2015).

El grupo de investigación de Elgamma y cols., realizaron recientemente un ensayo clínico preliminar de 1 año, en implantes con carga inmediata localizados en zonas de baja densidad ósea, concretamente en la zona posterior del maxilar, aplicando melatonina en la zona de la osteotomía. Concluyeron que la aplicación de este material biomimético se asocia con una buena estabilidad y la resorción ósea mínima (Elgammal, 2015).

La evidencia experimental sugiere que las aplicaciones tópicas de melatonina pueden ser útiles en cirugía oral y en implantología, ya que provoca un aumento de los valores de contacto hueso-implante y de formación ósea, mejorando el éxito y la supervivencia a largo plazo de los tratamientos de implantes (Gomez, 2015).

Por otro lado, la melatonina ha demostrado favorecer la cicatrización de las heridas por sus efectos **antiinflamatorios e inmunomoduladores**. En un estudio realizado en ratas, se evaluó los efectos de la melatonina exógena administrada (1,2 mg / kg intradérmica) en la formación de cicatrices. El tratamiento con melatonina mejoró significativamente la calidad de la cicatrización, tanto en términos de madurez y la orientación de las fibras de colágeno (Pugazhenthii, 2008).

5- La niveles de melatonina salivales, se liberan por las células acinares de las glándulas salivales mayores y a través del fluido gingival, aportando importantes usos en la **cavidad oral** por a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Reiter, 2015). Estas acciones pueden ser beneficiosas en procesos inflamatorios de la encía y el periodonto, reducir la pérdida ósea alveolar, mejorar lesiones de herpes, úlceras orales, favorecer la osteointegración de los implantes dentales, limitar el cáncer oral, y suprimir los trastornos que tienen un componente de radicales libres (Mehta, 2015).
Tabletas sublinguales de melatonina o aerosoles de melatonina orales y gel que contiene melatonina-tópica, pueden mejorar la salud oral general y reducir lesiones de la mucosa (Gómez 2010, Cutando 2007, Cutando 2003).

6- La melatonina puede **inducir el sueño** (Gandhi 2015, Kim 2015). Diversos estudios se centran en si un aporte de melatonina exógeno puede disminuir la dosis de benzodiazepinas en pacientes de mayor edad donde la producción de melatonina disminuye y aparecen los problemas de insomnio. Cardinali y cols. en un estudio controlado doble ciego realizado en 45 pacientes de unos 70 años de edad, concluyó que la melatonina es eficaz en pacientes con insomnio pero su uso no debe reducir el uso de benzodiazepinas a dosis bajas (Cardinali, 2002). Resultados que coinciden con otras investigaciones (Peles, 2007).

En casos de ansiedad, encontramos datos clínicos que indican que la melatonina al igual que las benzodiazepinas, es un ansiolítico seguro y eficaz cuando se utiliza como premedicación en la reducción de la ansiedad preoperatoria. Es comparable al

midazolam con la ventaja que la melatonina ofrece una recuperación más rápida en el posoperatorio (Maitra, 2013).

7- La melatonina y el **jet lag**. La exposición a la luz después de la puesta del sol induce al “jet lag”, causando cambios en el reloj circadiano y por tanto alteraciones en la secreción de melatonina. El jet lag es generado por los viajes rápidos que atraviesan múltiples franjas horaria. Los síntomas más comunes incluyen alteración del sueño, la desincronización del ritmo, ansiedad, estado de ánimo depresivo, problemas gastrointestinales, afecciones cardiovasculares, mareos e irregularidad menstrual en las mujeres (Bonmati, 2014).

8- La melatonina también se ve implicada en los **trastornos del estado de ánimo**. La relación entre la melatonina y enfermedades depresivas se muestra en varias publicaciones en la literatura. Los datos científicos sugieren que los pacientes con insomnio (disminución en los niveles de melatonina) tienen un riesgo diez veces mayor de desarrollar depresión. El insomnio juega un papel importante en las recaídas de la depresión, la recurrencia de episodios depresivos y aparición de depresión crónica (Falussy, 2014).

9-La melatonina tiene un efecto **antihipertensivo** a través de sus receptores acoplados a proteína G MT1 Y MT2. Actúa interfiriendo en el sistema vascular y en el sistema nervioso central (SNC). La melatonina tiene un efecto protector en el SNC: reduce la carga de radicales libres, mejora la disfunción endotelial, reduce la inflamación y altera el equilibrio entre el sistema nervioso simpático y parasimpático en favor del sistema

parasimpático. Por ello es curioso reflexionar en que la contaminación lumínica artificial, puede ser un factor de alteración nivel de melatonina (disminuyéndola) y un factor de riesgo para el desarrollo de la hipertensión (Pechanova, 2014).

Por todas estas funciones anteriormente citadas, el desarrollo de nuevos agentes capaces de interaccionar selectivamente con receptores de la melatonina se ha convertido en un área de gran interés durante la última década. Fármacos agonistas melatonérgicos son apropiados para el tratamiento del insomnio, trastornos neuropsiquiátricos y enfermedades metabólicas asociadas con la resistencia a la insulina (Carocci,2014). La melatonina se ha demostrado que disminuye la hiperglucemia anormal, reduce la insulina, los triglicéridos y el colesterol (Laudon, 2014).

3.3 CELULAS MADRE

3.3.1 DEFINICIÓN Y TIPOS

Las células madre son células indiferenciadas que tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación en al menos uno de los tres linajes: endodermo, mesodermo y ectodermo (Wyles, 2014). Desde la embriogénesis hasta el estado adulto, se van formando distintas células madres, que en función del tejido del que proceden (origen) y en función de su capacidad de diferenciarse (potencia) podemos clasificarlas en:

1-Por su potencialidad;

- Las células madre totipotentes son aquellas células capaces de formar todas las estirpes celulares de un organismo completo, así como los tejidos extraembrionarios como la placenta (Mitalipov 2009, Hanna 2012). El ejemplo característico de célula madre totipotente es el cigoto.
- Las células madre pluripotentes tienen el potencial necesario para formar cualquier tipo de célula de las tres capas (endodermo, ectodermo y mesodermo) dando lugar a los órganos y tejidos del organismo, pero no pueden formar un organismo completo. Éstas se obtienen por excelencia del blastocito, que es un embrión de 5-6 días desde la fecundación del óvulo y el espermatozoide, y está formado por unas 200 células de estructura compleja.
- Las células madre multipotentes son aquellas que sólo pueden formar células de acuerdo al tejido de origen. Son células de línea. Ejemplos: células hematopoyéticas, hepáticas, mesenquimales de médula ósea...

- Las células madre oligopotentes, también llamadas células progenitoras son células madre que tiene la capacidad de diferenciarse en 2 ó más líneas dentro de un tejido.
- Celula madre unipotente son células madre que dan lugar a una sola línea (Mitalipov 2009, Hanna 2012).

2-Por su origen:

- Células madre embrionarias (CME) tienen la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en cualquiera de las líneas celulares. Constituyen una fuente indefinida de células para reparar tejidos. Se obtienen a partir de embriones congelados (Al-Shamekh, 2104). Son ampliamente utilizadas para muchos propósitos, tales como la orientación génica, la terapia celular, la reparación de tejidos y la regeneración de órganos (Zhao, 2013). Sin embargo, el uso de las CME se ve obstaculizado por barreras significativas, incluyendo el rechazo inmunológico, la regeneración de tejidos incorrectos, la formación de tumores, y las preocupaciones éticas relativas a la destrucción de embriones humanos (Kim 2014, Isobe 2014).
- Células madre fetales que son células madre adultas de los tejidos del feto. Se caracterizan por presentar mayor potencialidad que las células madre adultas pero menos que las células madre embrionarias.
- Células madre adultas se obtienen del adulto por lo que presentan fácil acceso. Son células multipotenciales u oligopotenciales. Están presentes en todos los

tejidos y órganos y son las responsables de madurar las células de los tejidos donde se encuentran, ejemplos: células intestinales, pancreáticas, mesenquimales de médula ósea....

Por otro lado existen las células madre inducidas (iPSs), son células madre del adulto manipuladas para que presenten el mismo potencial de diferenciación que la células madre embrionarias (Wan, 2015). Lo único que las distingue de las células madre embrionarias es su origen, ya que estas no proceden de un embrión (Yu, 2009). Recientemente, iPSs de pacientes con enfermedades neurodegenerativas han diferenciado con éxito in vitro en neuronas motoras, neuronas dopaminérgicas, y oligodendrocitos (Payne, 2015). Las IPS también han demostrado mejoras en la función cardíaca en adultos con cardiopatía isquémica (Bosman, 2015).

Las células madre podemos localizarlas en diferentes tejidos y órganos (hígado, médula ósea, tejido subcutáneo...). Estudios recientes ponen de manifiesto otras localizaciones como en el sistema nervioso central y en retina (Stemple 1992, Tropepe 2000, Weissman 2000, Okano 2002).

La terapia celular se basa en la capacidad de estas células de reparar, regenerar y curar, presentándose como una opción terapéutica esperanzadora (medicina regenerativa) (Moraleda, 2011).

3.3.2. CÉLULAS MADRE EN EL DIENTE

Las células madre se han convertido en un tema de especial interés en la investigación científica tanto en el campo de la medicina, como en la odontología. Las células madre dentales constituyen un enfoque nuevo para tratar enfermedades como la periodontitis, caries dentales y otras enfermedades (Shilpa, 2013). Estas presentan características similares a las células madre mesenquimales de médula ósea y tienen la propiedad de generar odontoblastos, adipocitos, osteoblastos (Ramamoorthi, 2015), cartílago, y músculo liso y esquelético (d' Aquino 2007, Jo 2007).

Las células madre procedentes de tejidos dentales, constituyen una fuente prometedora, ya que son fácilmente disponibles, altamente proliferativas, y presentan la capacidad de multi-diferenciación (Saito, 2015). Por ello tienen múltiples aplicaciones terapéuticas, aunque con ciertas limitaciones; el potencial oncogénico de estas células aún no se ha determinado en estudios clínicos a largo plazo. Por otra parte, la investigación se limita principalmente a los modelos animales y su amplia aplicación clínica aún no se ha probado. Otras limitaciones importantes son la dificultad para identificar, aislar, purificar y cultivar estas células en los laboratorios (Bansal, 2015).

Podemos aislarlas en diferentes localizaciones en los dientes:

1. Células madre adultas de pulpa dental (DPSCs) y de dientes deciduos (SHED)

2. Células madre de folículo dentario (DFSC)
3. Células madre de la parte apical de la papila (SCAP)
4. Células madre del ligamento periodontal (PDLSC)

3.3.2.1. CÉLULA MADRE PROCEDENTE DE PULPA DENTAL Y DE DIENTES DECIDUOS

Las células madre mesenquimales procedentes de la pulpa dental (DPSCs: Dental pulp stem cells), fueron descubiertas en el año 2000 por grupo de Songtao Shi y presentan un inmunofenotipo in vitro parecido a las células mesenquimales de médula ósea (BMSCs) (Gronthos, 2000). Son células capaces de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples líneas celulares (Gronthos 2000, Moraleda 2004, Moraleda 2006).

Debido a su origen embrionario en la cresta neural, las DPSCs se diferencian a neuronas, glía y oligodendrocitos (Sasaki 2008, Rosenbaum 2008) lo cual resulta beneficioso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y en la reparación de las neuronas motoras después de una lesión (Govindasamy, 2010). Además también pueden diferenciarse a cardiomiocitos, condrocitos, osteoblastos, células del hígado y las células β de los islotes del páncreas (Potdar, 2015).

Paino y cols. en su estudio demostraron su capacidad de diferenciarse a melanocitos maduros en un medio de diferenciación de melanocitos específico (Paino, 2010). Además, tienen una capacidad de reparación cardiomiogénica (Ventura 2007, Armiñán 2009).

Las DPSCs son utilizadas en una gran variedad de enfermedades como en la diabetes tipo I, enfermedades de inmunodeficiencia y en enfermedades que afectan a los huesos y cartílagos (Davila 2004, Drize 1992, Gronthos 2000).

En un estudio realizado en perros, pudo demostrarse la capacidad de regeneración pulpar que presentan estas células DPSCs , cuando al trasplantar las células DPSCs en pulpas amputadas se observó a los 14 días una regeneración completa con capilares y células neurales (Iohara k, 2009).

Las células madre pueden ser aisladas también de la pulpa de los dientes deciduos humanos exfoliados (SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) (de Souza 2013, Kashyap 2015). Inducen la formación de hueso, utilizándose mayormente en terapias de regeneración ósea. Estas tienen capacidad de diferenciarse a osteoblastos y hace posible que las SHED puedan reparar defectos de calota en estudios experimentales en ratas (Pravin,2015).Presentan mayor plasticidad que las DPSCs por su estado más indiferenciado. Expresan marcadores neurales y son útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Verma, 2014).

En el año 2013, de Souza y cols. tras una revisión sistemática de las aplicaciones terapéuticas de las células madre de obtenidas en diente deciduales se obtuvo que las SHED han sido utilizadas en casos de distrofia muscular, enfermedad del parkinson y en lupus eritematoso como se ha demostrado en estudios animales (De Souza, 2013).

3.3.2.2 CÉLULAS MADRE DEL FOLICULO DENTAL

Son células que encontramos en el folículo dental, que es el tejido conectivo que rodea el germen de un diente. Estas células DFSCs (Dental Follicle Stem Cells) tienen la capacidad de generar cemento, hueso y el ligamento periodontal. Por su gran potencialidad, se está aumentando su uso en terapias regenerativas óseas y periodontales (Yao, 2008). Estudios recientes avalan su diferenciación a osteoblastos/cementoblastos, adipocitos y neuronas (Morsczeck, 2009).

3.3.2.3. CÉLULAS MADRE DE LA PARTE APICAL DE LA PAPILA

Existen células madre en la zona apical de la papila de dientes permanentes inmaduros (SCAP). Son células con alta capacidad clonogénica, capaces de diferenciarse a odontoblastos, osteoblastos y adipocitos. Presentan un alto grado de proliferación, duplicación, así como una alta capacidad de regeneración por la alta actividad de la telomerasa y una aumentada capacidad de migración comparada con las células madre procedentes de pulpa dental (DPSCs), siendo obtenidas del mismo diente y cultivadas en las mismas condiciones. Por lo que se puede concluir que las SCAP tienen un alto potencial para su utilización en regeneración de pulpa/dentina, así como para endodoncia (Bluteau, 2008).

3.3.2.4 CÉLULAS MADRE DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

Las células madre que obtenemos en el ligamento periodontal o PDLSCs (Periodontal Ligament Stem Cells), son células capaces de regenerar el periodonto, constituido cemento, hueso encía y ligamento periodontal (Seo, 2004).

En el periodonto encontramos una gran diversidad celular (fibroblastos, osteoblastos, células del endotelio, células neurales, epiteliales...). Esta variabilidad de células despertó gran interés de que en este tejido hubiera una población de células madre (Melcher, 1985). Diversos estudios posteriores avalaron esta idea (Lekic 1996, McCulloch1985, McCulloch 1987).

Las PDLSCs se diferencian a cementoblastos, a células formadoras de colágeno y a adipocitos, condrocitos y osteoblastos (Seo 2004, Nagatomo 2006, Techawattanawisal 2007, Gay 2007, Coura 2008, Kadar 2009).

La periodontitis es una enfermedad infecciosa e inflamatoria que conlleva a la destrucción del tejido periodontal. Las terapias convencionales no han logrado restablecer el periodonto dañado por ello el uso de las PLDSCs es de gran interés para poder regenerar tales tejidos ya que contribuyen a la reparación (Yang 2009, Wenjun 2015, Seo 2004, Ripamonti 2009, McGuire 2008).

Por otro lado existen diversos estudios que demuestran que las PDLSCs son capaces de diferenciarse en progenie neural y mesodérmica, incluidos nervios periféricos, glía y

músculo esquelético, bajo ciertas condiciones de cultivo (Techawattanawisal 2007, Widera 2007, Coura 2008, Kadar 2009).

3.3.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PROCEDENTES DE MÉDULA ÓSEA

La médula ósea es el tejido esponjoso que se encuentra dentro de algunos huesos. La médula ósea contiene varios tipos celulares: células madre hematopoyéticas que son las células madre que forman la sangre, hemangioblastos, células madre mesenquimales (CMM) y Multipotent Adult Progenitor Cells (células madre unipotentes). A continuación hablaremos de las células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales se han convertido en las células madre más utilizadas en ensayos clínicos. Además podemos encontrarlas en diferentes sitios tales como médula ósea, grasa, pulpa dental, sangre del cordón umbilical y en la membrana amniótica (Insausti, 2010). Se diferencian a hueso (Coelho 2000, Sugiura 2004, Padial 2015) y cartílago (Mackay, 1998) por lo que son ampliamente utilizadas en patologías osteoarticulares. Además tienen funciones pro-angiogénicas y antiinflamatorias lo que explica su uso también en la cicatrización de las heridas (Insausti, 2010).

Con el fin de consensuar una definición de las células madre mesenquimales la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) "The Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committee of the International Society for Cellular Therapy" propuso unos criterios mínimos necesarios para definirlos. Dichos criterios son (Dominici, 2006):

- Capacidad de adherencia al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar.
- Más del 95% de la población debe expresar los antígenos específicos de superficie CD90, CD73 y CD105 y ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79 α ó CD19 y HLA clase II.
- Capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de diferenciación.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERALES

- El objetivo de esta Tesis Doctoral es comprobar “in vitro” el efecto citoprotector de la melatonina frente al ácido zolendrónico en células madre procedentes de ligamento periodontal (PDLSCs) y médula ósea (BMMSCs).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un cultivo primario de células madre procedentes de la médula ósea y ligamento periodontal.
2. Determinar el perfil inmunofenotípico de las células obtenidas del cultivo de médula ósea y ligamento periodontal.
3. Medir la viabilidad y proliferación de BMMSCs y PDLSCs sometidas a diferentes concentraciones de melatonina
4. Determinar la viabilidad celular de BMMSCs y PDLSCs sometidas a diferentes concentraciones de ácido zolendrónico
5. Determinar el papel citoprotector de la melatonina frente al ácido zolendrónico in vitro, midiendo la viabilidad celular de BMMSCs y PDLSCs sometidas a diferentes concentraciones de ácido zolendrónico y melatonina combinadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

5.MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 AISLAMIENTO CELULAR.

- **OBTENCIÓN DONANTES DE DIENTES**

Las extracciones dentales se realizaron en la Unidad de cirugía oral y Maxilofacial del Hospital Virgen Universitario de la Arrixaca (Murcia). Se recogieron dientes definitivos (n=200) de pacientes mayores de 14 años con enfermedad periodontal avanzada o afectación por caries, por lo que la extracción estaba indicada. Para asegurar el anonimato de los donantes no se llevó a cabo la identificación de los dientes recogidos. El estudio de este trabajo se hizo con la autorización del comité ético del Hospital Virgen de la Arrixaca y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los participantes.

Inmediatamente tras la extracción, los dientes recogidos se depositaron en tubos (FALCON) con medio de cultivo celular, que constaba de: Minimum Essential Medium Eagle (MEM, SIGMA), mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina ; SIGMA).

Las muestras se conservaron entre 4°C y 8°C hasta poder ser procesadas.

a.1. Extracción del Ligamento Periodontal Humano (hPDL):

Se trabajó en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar).

- Los dientes recogidos se colocaron en una placa de Petri que contenía PBS esteril (tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4) y una mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina ; SIGMA).

A continuación, el ligamento periodontal se retiró cuidadosamente de la superficie de la raíz de los dientes, fundamentalmente del tercio medio (fig.6), con la ayuda de unas pinzas y un bisturí (hoja nº15).

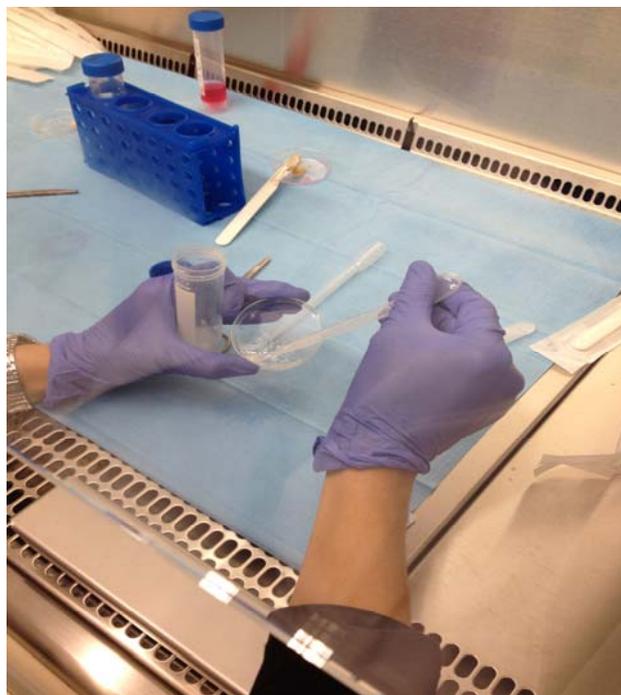


Figura 6. Bisturí con el que se raspó la superficie radicular y recogida del tejido obtenido.

- El ligamento periodontal (junto con el PBS) se traspasó por separado a un tubo (Falcon) donde se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm (Fig. 7). Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática y mecánica.



Figura 7. Imagen de la centrifugadora a 1500 rpm para la obtención del pellet celular.

Disgregación enzimática:

1. El precipitado celular fue sometido a una disgregación enzimática utilizando una solución de proteasas: Colagenasa tipo I (3mg/ml; Worthington Biochem) y dispasa (4mg/ml; GIBCO) durante 1 hora a 37°C. (Fig.8).



Figura 8. Disgregación enzimática con colagenasa.

2. Las proteasas se inactivaron añadiendo un volumen igual o mayor de medio de cultivo celular MEM muy frío.
3. Se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm.
4. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en medio de cultivo celular MEM con anfotericina (250 unidades/ml).
5. Se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm.
6. Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular MEM con anfotericina (250 unidades/ml).

Disgregación mecánica:

1. Con el fin de quitar los trozos más grandes de tejido remanente, después de la disgregación enzimática se recogieron las células del tubo con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una malla estéril de 70 μ m (Falcon, BD), donde se tamizaron a través de la malla añadiéndose medio de cultivo MEM.
2. La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm.
3. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo celular MEM.

– OBTENCIÓN DE DONANTES DE MÉDULA ÓSEA.

La médula ósea ha sido obtenida por hematólogos en los quirófanos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca en Murcia (España) mediante la técnica mini-harvest: Bajo anestesia general, con la colocación del paciente en decúbito prono y en condiciones de esterilidad, se realiza la palpación de la cresta iliaca posterosuperior seleccionada y se administró anestesia local con mepivacaína (6-8 mL) mediante punción con aguja intramuscular. A continuación se procedió a la punción con trocar de aspirado de médula ósea en la cresta iliaca posterosuperior.

Tras atravesar el periostio se procedía a la retirada del fiador y se conectaba una jeringa de 10 mL heparinizada previamente con 0.5 mL de heparina sódica al 5% (Mayne

Pharma®, España). Una vez conectada se realizaron aspiraciones de médula ósea, con la premisa de no obtener más de 2-3 mL en cada aspiración para asegurar una buena celularidad medular y la mínima contaminación con sangre periférica en la muestra obtenida. El volumen final recolectado de médula ósea fue de 10 mL en cada donante. Posteriormente se colocaba un tapón estéril a las jeringas de médula ósea y se llevaban al laboratorio de Terapia Celular para su procesamiento.

5.2 RECUENTO Y ESTIMACION DE LA VIABILIDAD CELULAR

Antes de cultivar las células obtenidas, se hizo un recuento y estimación de la viabilidad celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer o hemocitómetro y azul tripán. Este método se basa en el principio que las células vivas (viables) cuya membrana citoplasmática está intacta, no permite la entrada del colorante (azul tripán), permaneciendo refringentes. Mientras que las células muertas (no viables), debido a que su membrana citoplasmática se encuentra rota, permite el paso de colorante tiñéndolas de azul (Fig.9).



Figura 9. Lector automático *TC20TM Automatic Cell Counter* de BioRad con la que se realizó el recuento y estimación de la viabilidad celular.

Los pasos a seguir eran:

La suspensión celular se agitó y se depositaron 10 μ l de la misma en un tubo (Eppendorf), se añadió 10 μ l de la solución de azul tripán a la muestra anterior, agitándose la mezcla con la misma micropipeta y procurando no hacer burbujas. Se pegó el cubrecámara en el hemocitómetro humedeciendo los bordes del mismo, y se llenó con la mezcla anterior la cámara de aire que existe entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (0.1mm³), por uno de los lados del mismo. Contamos en el microscopio de contraste de fase las células teñidas y no teñidas en una de las regiones de la cámara según la figura.

Para un recuento más exacto pueden contarse las cuatro regiones de la cámara y obtener la media aritmética de los recuentos. Se calculó el número de células totales y viables de la muestra según las siguientes fórmulas:

a) N° células viables/ml = n° células vivas contadas x 10000 x factor de dilución

b) N° células totales/ml = (n° células vivas contadas + muertas contadas) x 10000 x factor de dilución.

$$\%Viabilidad = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células viables} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de células totales}}$$

Se multiplica el número de células por 10000, ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara Neubauer es de 0.1mm³.

Tras hacer el recuento y la estimación de la viabilidad, se ajustó la solución celular a 1x10⁵ células/ml y se sembró 3ml de la misma por frasco de cultivo de 25 cm² (Sarstedt). Las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

5.3 CULTIVO DE CELULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL Y MEDULA ÓSEA

Las células aisladas del ligamento periodontal crecen adheridas al plástico de la placa de cultivo. Para el cultivo primario de BMMSCs y PDLSCs, su expansión y mantenimiento, se utilizó un medio de cultivo celular que fue denominado medio

basal (MB). El medio basal estaba compuesto por α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification, SIGMA) al que se le añadieron los siguientes componentes, como podemos observar en la tabla 2:

<i>COMPONENTES</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>
FBS (Gibco)	15%
P/S (Sigma)	100 μ g/ml
Glutamina (Sigma)	2mmol/l
Ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma)	100 μ g/ml
Anfotericina (Sigma)	2,5 μ g/ml

Tabla 2: Componentes y concentraciones del medio basal que utilizamos.

Con el objetivo de conseguir un número de células suficientes para llevar a cabo la investigación, semanalmente, cuando las células estaban cerca de llegar al estadio de confluencia, ocupando aproximadamente el 85% de la base del frasco de cultivo, se realizaba el siguiente proceso:

Se retiraba el medio de cultivo del frasco que contenían las células, se añadía Tripsina 0.25% + EDTA 1mM (disgregación enzimática) en cantidad suficiente para cubrir la superficie del mismo y se incubaba en una estufa para cultivos celulares a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 5 minutos.

Posteriormente, se procedía a la neutralización de la actividad enzimática con igual o mayor cantidad de medio de cultivo frío. La mezcla era centrifugada durante 10 minutos a 1000 rpm, se desechaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 1

ml de medio de cultivo basal. Tras estimar la viabilidad, se ajustaba el número de células de la suspensión anterior, normalmente a 1×10^5 células/ml, y eran sembradas en un frasco de cultivos de mayor superficie que el anterior. Las células se incubaron en una estufa para cultivos celulares a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad. El medio de cultivo celular basal era cambiado con una frecuencia de 3 veces por semana aproximadamente.

5.4 CARACTERIZACION INMUNOFENOTIPICA DE LAS BMMSCs Y PDLSCs

Los antígenos de superficie de las BMMSCs y PDLSCs se evaluaron por citometría de flujo en células en P0 utilizando el panel de anticuerpos monoclonales recomendado por el *Committee of the International Society for Cellular Therapy*. (Tabla 3). En cada tubo se colocó una suspensión de 1.5×10^5 células en $100\mu\text{L}$ más $20\mu\text{L}$ del anticuerpo conjugado con el fluorocromo correspondiente: *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) para los anticuerpos CD105, CD14, CD45 y HLADR; *phycoerythrin* (PE) para los anticuerpos CD73, CD90 y CD19; *phycoerythrin cyanide 5* (PerCPCy5.5) para el CD34.

Anticuerpo	Volumen	Concentración/ 100µL	Fluorocromo	Suplidor	Clon
CD105	20µL	1.5x10 ⁵ células	FITC	BD Pharmigen™	266
CD73	20µL	1.5x10 ⁵ células	PE	BD Pharmigen™	AD2
CD90	20µL	1.5x10 ⁵ células	PE	BD Pharmigen™	5E10
CD34	20µL	1.5x10 ⁵ células	PerCP-Cy5.5	BD Pharmigen™	581
CD45	20µL	1.5x10 ⁵ células	FITC	BD Pharmigen™	HE30
CD14	20µL	1.5x10 ⁵ células	FITC	BD Pharmigen™	M5E2
CD19	20µL	1.5x10 ⁵ células	PE	BioLegend™	HIB19
HLADR	20µL	1.5x10 ⁵ células	FITC	BD Pharmigen™	G46-6

Tabla 3. Anticuerpos usados para la evaluación de antígenos de superficie de las

DPSCs y BMMSCs.

Inmunocitofluorescencia.

Los cultivos se analizaron con un fotomicroscopio de epifluorescencia LEICA modelo DMR y las imágenes se capturaron y trataron con un equipo COOLSNAP.

La sistemática de trabajo fue:

- Lavado inicial con PBS (5 minutos)
- Las células se fijaron con Paraformaldehído al 4% (8 minutos).
- Se volvió a lavar con PBS 30 minutos (3-6 lavados de 5-10 minutos)
- Se permeabiliza con Tritón al 0.05% (15 minutos), en el caso que vayamos a utilizar un anticuerpo citoplasmático.
- Se lavó con PBS 30 minutos (3-6 lavados de 5-10 minutos).
- Se bloquea con solución de bloqueo (Lisina 10%, BSA 5% (no con tejidos) y PBS, mínimo 1 hora.
- Se aporta el anticuerpo primario en solución de bloqueo permaneciendo toda la noche a 4°C.
- Al día siguiente, se lava con solución de bloqueo durante 30 minutos (cambiar cada 5-10 minutos)
- Si fuera necesario, se administra Biotina (1:200 en solución de bloqueo) mínimo 2 horas.
- Se aplica el anticuerpo secundario (texas red para rojo, fluoresceína para verde), dilución 1:500, 45 minutos.
- Se lava tres veces con PBS durante 10 minutos.
- Para marcar núcleos, se emplea DAPI (20 microlitros en 10 ml de PBS), 5 minutos, luego se lavó 2 veces con PBS.
- Se monta los portaobjetos con Moviol, Eukitt o Glicerol.

En la tabla 4, se resumen los anticuerpos utilizados con fluorescencia.

Anticuerpo	Especie	Dilución
CD90	Mouse	1:500
CD73	Mouse	1:1000
CD105	Rat	1:500
CD34	Mouse	1:100
CD45	Mouse	1:100
CD90	Mouse	1:500

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia.

5.5 MTT O ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El ensayo de MTT se realizó para medir la proliferación de las células de ligamento periodontal y médula ósea. Esta prueba permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas a través de la reducción metabólica que realiza la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa sobre el sustrato bromuro de 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Como resultado se formarán un compuesto de color azul cuya cantidad generada es proporcional a la cantidad de células vivas en cultivo.

Para la realización de este ensayo se procedió del siguiente modo:

- Se sembraron 3000 células por pocillo en 400 μ l de medio de cultivo DMEM con rojo fenol suplementado con L-glutamina (2 mM/ml), 10% de SBF y penicilina/estreptomicina (100 μ g/ml) (fig. 10).



Figura 10. Preparación del ensayo de proliferación celular.

- Se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5% durante los tres tiempos establecidos: 24h, 48h y 72 h.
- Transcurrido el tiempo de incubación (24, 48 ó 72 horas), se sustituyó el DMEM con rojo fenol por 400 µl de DMEM sin rojo fenol.
- El reactivo MTT se añadía a cada uno de los pocillos para quedar a una concentración final de 3,8 mg/ml y se incubó a 37 °C y un 5% de CO₂ durante 4 horas.
- Tras la incubación, se retiró el contenido de los pocillos y se añadieron 400 µl de DMSO por pocillo.
- Se trasvasaron 200 µl del contenido de cada pocillo a una placa de lectura y se midió la absorbancia a 570 nm con medida de referencia a 620 nm.

En todos los casos, los experimentos se realizaron por quintuplicado para evitar la variabilidad de la muestra.

5.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® (versión 15.0) para windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

Debido al escaso tamaño de la muestra, para contrastar la normalidad de las variables numéricas usamos el test de KS (Kolmogórov-Smirnov), en caso de ser normales usamos test paramétricos (ANOVA), en caso contrario No paramétricos (Kruskal-Wallis).

Para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (es decir, la existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar, cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado "p-valor") no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05 (si esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia). Para ello, se ha realizado el contraste para el estudio de las asociaciones entre las variables cuantitativas continuas mediante el test«ANOVA» de un factor, usado para comparar tres o más medias (de muestras independientes), cuando eran tres o más las variables a comparar.

RESULTADOS.

6. RESULTADOS.

6.1 AISLAMIENTO CELULAR DE BMMSCs y PDLSCs.

Las células se extrajeron de médula ósea y del ligamento periodontal y se cultivaron según las técnicas expuestas en Material y Métodos. A las 24 horas de cultivo, ya se observaron BMMSCs y PDLSCs adheridas a la superficie del frasco de cultivo (Fig.11). A las 48 horas, pequeñas colonias de células de tipo fibroblástico proliferaban y se expandían por todo el frasco. Al cabo de una semana, estas células se mostraban confluentes en un 80% de la totalidad del frasco.

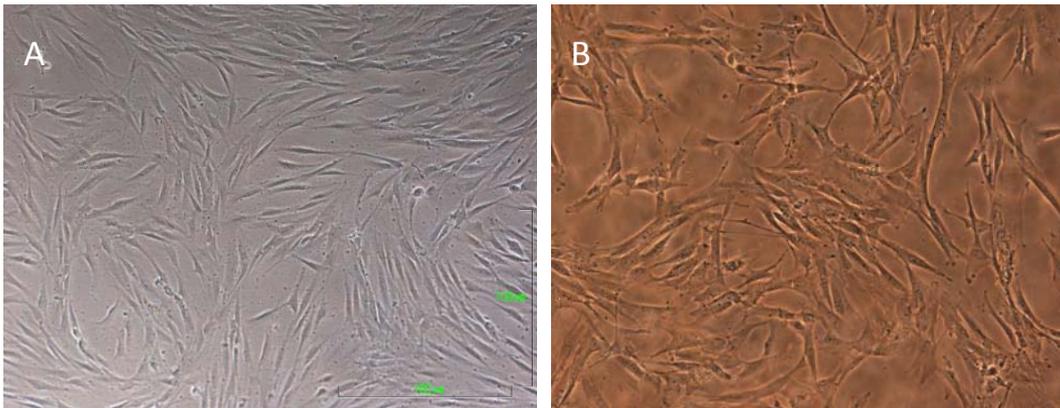


Figura 11. Imagen donde observamos la gran confluencia celular a los 7 días de cultivo.

A)PDLSCs; B)BMMSCs.

6.2. CARACTERIZACION INMUNOFENOTÍPICA DE LAS BMMSCs Y PDLSCs:

Las BMMSCs y PDLSCs expresaron positividad para los antígenos de membrana celular CD105, CD90, CD73 y negatividad para los antígenos CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR, todos incluidos en las recomendaciones de la Sociedad de Terapia Celular

Internacional (International Society of Cellular Therapy) para la tipificación de estas células (Fig. 12). Estos resultados aunados a su carácter de células adherentes constituyen dos de los 3 criterios exigidos para su definición como células MSC.

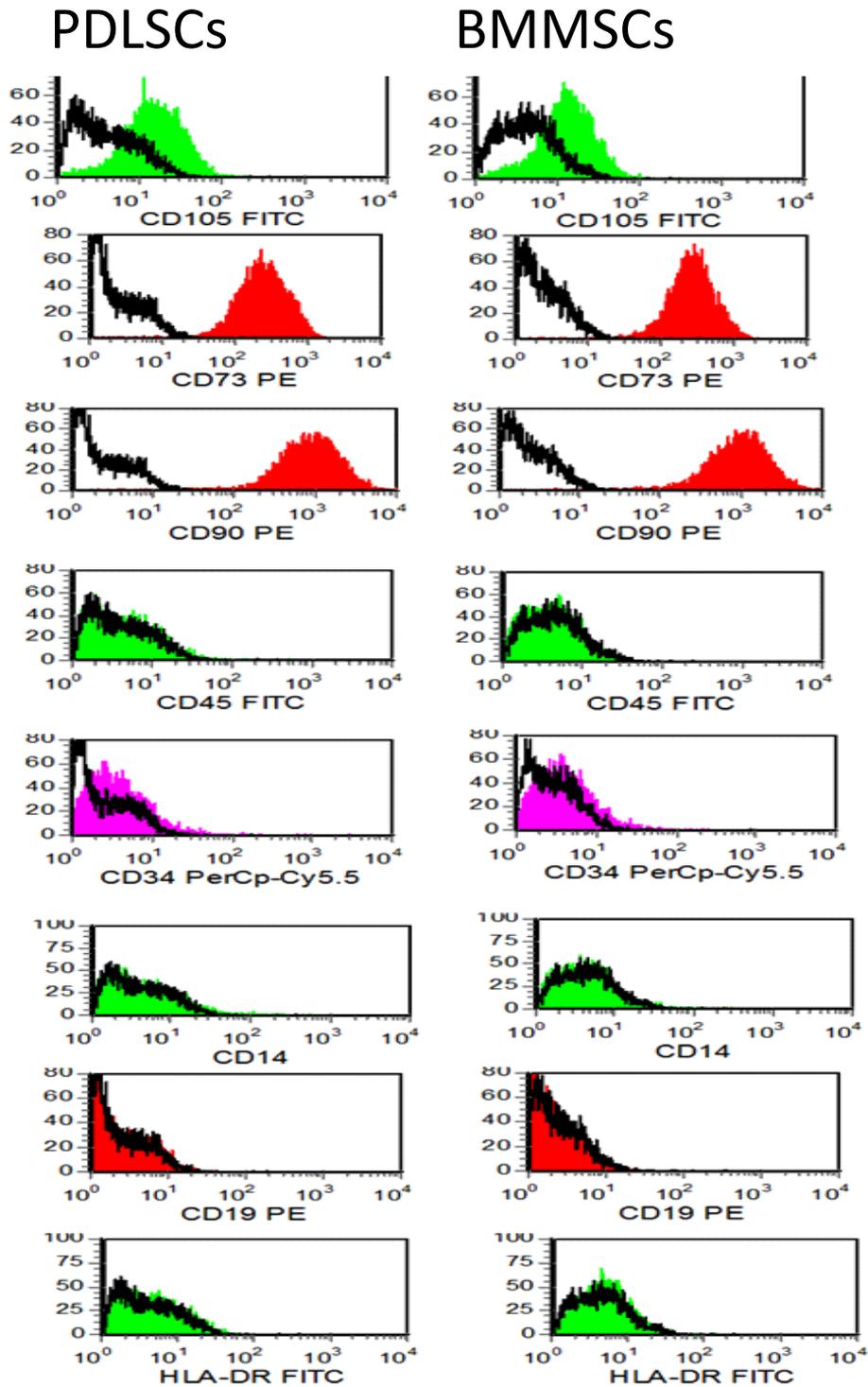


Figura12. Respuesta a los antígenos de membrana celular que expresaron las BMMSCs y PDLSCs.

6.3 EFECTO DEL ACIDO ZOLENDRÓNICO SOBRE LA LINEA CELULAR PDLSCs.

El tratamiento de la línea celular PDLSCs con ácido zolendrónico (0-30 μ M) durante 24, 48 o 72 horas provocó una disminución significativa de la viabilidad celular, que resultó dependiente de la duración de la incubación y de la concentración de ácido zolendrónico.

24 horas

Al estudiar el efecto del ácido zolendrónico a concentraciones de 1, 3, 5, 10, 20 y 30 μ M sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs (después de 24 horas de incubación), la mayor reducción de la viabilidad celular la obtuvimos con el ácido zolendrónico a 30 μ M ($0,40452 \pm 0,020163$); aunque no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas con el resto de concentraciones utilizadas ($p=0,096$) (Tabla 5 y Figura 13).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,509 \pm 0,035
1 μ M	0,473 \pm 0,104
3 μ M	0,472 \pm 0,050
5 μ M	0,492 \pm 0,085
10 μ M	0,427 \pm 0,084
20 μ M	0,424 \pm 0,054
30 μ M	0,404 \pm 0,020

p -valor=0,096

*DT = desviación típica

Tabla 5: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 24 horas de incubación (*test ANOVA*).

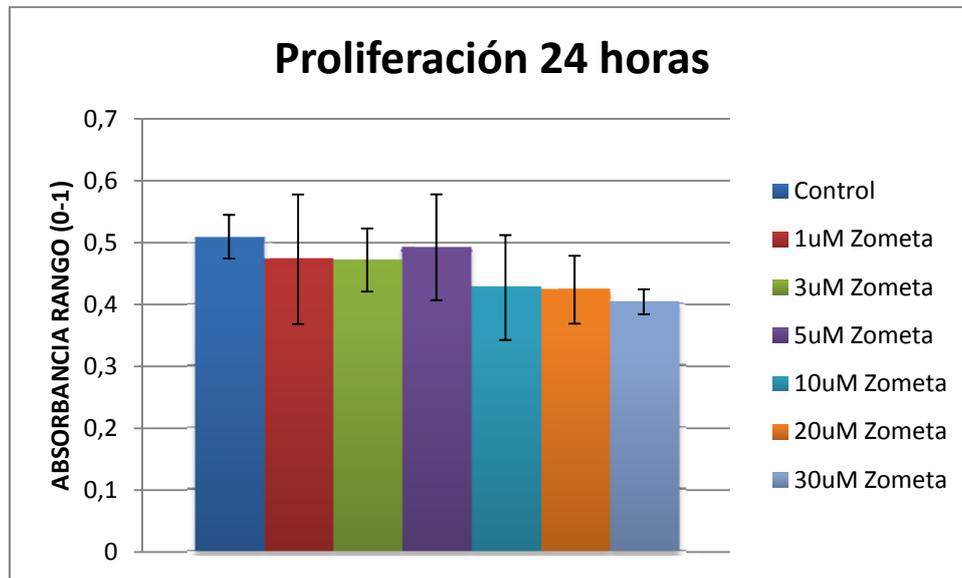


Figura 13: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA).

48 horas

Cuando analizamos el efecto del ácido zolendrónico a concentraciones de 1, 3, 5, 10, 20 y 30 μ M sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs (después de 48 horas de incubación), observamos que la mayor reducción de la viabilidad celular se produjo a dosis de 30 μ M ($0,43948 \pm 0,046088$) de ácido zolendrónico; observamos diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones 20 μ M ($p=0,017$) y 30 μ M ($p=0,002$) (Tabla 6 y Figura 14).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,648 \pm 0,034
1 μ M	0,723 \pm 0,095
3 μ M	0,707 \pm 0,111
5 μ M	0,629 \pm 0,098
10 μ M	0,519 \pm 0,082
20 μ M	0,479 \pm 0,078
30 μ M	0,439 \pm 0,046

p -valor=0,0001

DT = desviación típica

Tabla 6: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA).

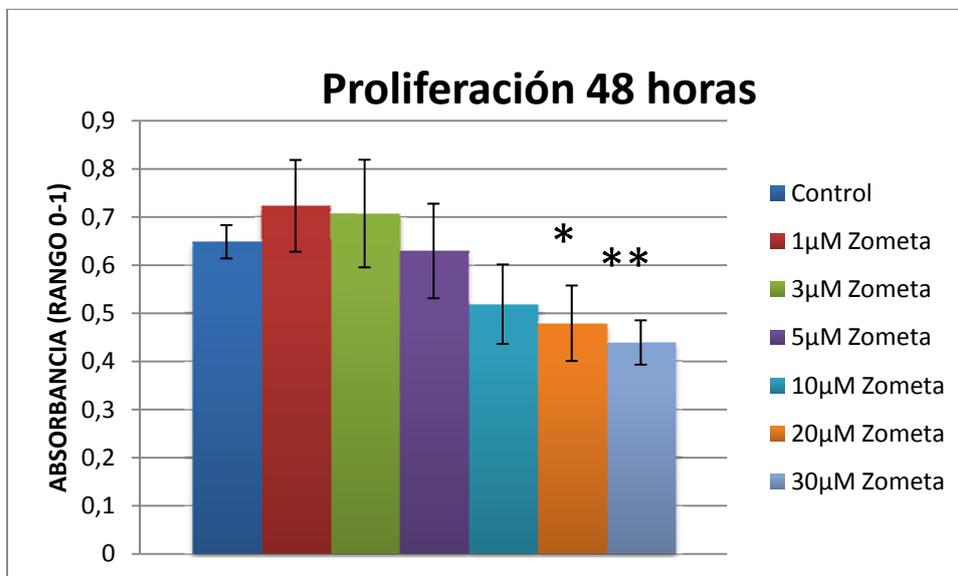


Figura 14: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

72 horas

Cuando analizamos el efecto del ácido zolendrónico a concentraciones de 1, 3, 5, 10, 20 y 30 μ M sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs (después de 72 horas de incubación), observamos que la mayor reducción de la viabilidad celular se produjo a dosis de 30 μ M (0,2112 \pm 0,015175) de ácido zolendrónico; observamos diferencias estadísticamente significativas con el resto de concentraciones utilizadas ($p=0,0001$) (Tabla 7 y Figura 15).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT
Control	0,760 \pm 0,034
1 μ M	0,731 \pm 0,082
3 μ M	0,636 \pm 0,069
5 μ M	0,527 \pm 0,081
10 μ M	0,386 \pm 0,031
20 μ M	0,268 \pm 0,016
30 μ M	0,211 \pm 0,015

p -valor=0,0001

DT = desviación típica

Tabla 7: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA).

Al comparar el efecto de las concentraciones de ác. zolendrónico a nivel intragrupal sobre la proliferación celular a las 72h, encontramos ya un efecto muy claro a partir de

3 μ M que resulta significativo ($p < 0.01$) y que aumenta este efecto en sucesivas concentraciones con una mayor significancia aún ($p = 0.0001$) (Figura 15).

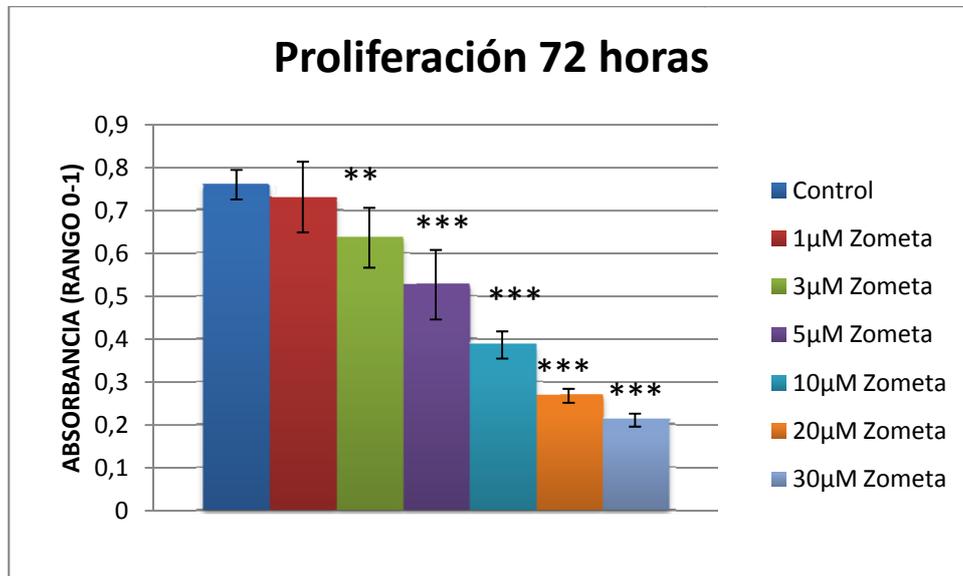


Figura 15: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). ** $p < 0.01$. *** $p = 0.0001$

6.4. EFECTO DEL ÁCIDO ZOLENDRÓNICO SOBRE LA LINEA CELULAR BMMSCs.

El tratamiento de la línea celular BMMSCs con ácido zolendrónico (0-30 μ M) durante 24, 48 o 72 horas provocó una disminución significativa de la viabilidad celular, que resultó dependiente de la duración de la incubación y de la concentración de ácido zolendrónico.

24 horas

La incubación de las células BMMSCs con ácido zolendrónico durante 24 horas no tuvo efectos significativos con las diferentes concentraciones de ácido zolendrónico en

relación al control. Al estudiar el efecto del ácido zoledrónico a concentraciones de 1, 3, 5, 10, 20 y 30 μM sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs (después de 24 horas de incubación), la mayor reducción de la viabilidad celular la obtuvimos con el ácido zoledrónico a 3 μM ($0,2922 \pm 0,04874$); aunque no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas con el resto de concentraciones utilizadas ($p=0,423$) (Tabla 8 y Figura 16).

Concentraciones de Ácido zoledrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,320 \pm 0,042
1 μM	0,355 \pm 0,050
3 μM	0,292 \pm 0,048
5 μM	0,302 \pm 0,046
10 μM	0,307 \pm 0,044
20 μM	0,339 \pm 0,097
30 μM	0,340 \pm 0,033

$p\text{-valor}=0,423$

*DT = desviación típica

Tabla 8: Efecto del ácido zoledrónico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA).

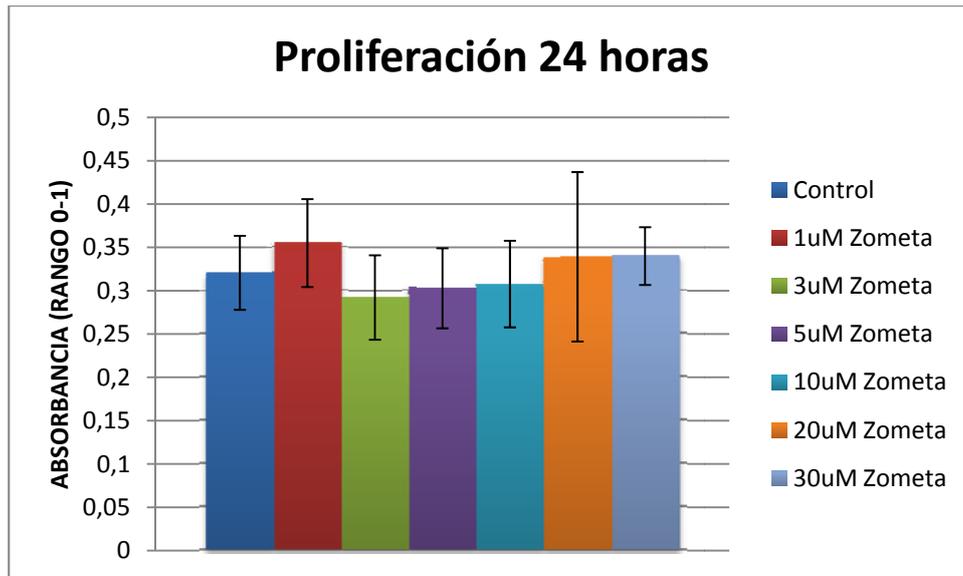


Figura 16: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA).

48 horas

Al estudiar el efecto del ácido zoledrónico a concentraciones de 1, 3, 5, 10, 20 y 30 μ M sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs (después de 48 horas de incubación), la mayor reducción de la viabilidad celular la obtuvimos con el ácido zoledrónico a 30 μ M ($0,310 \pm 0,018$); aunque no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas con el resto de concentraciones utilizadas ($p=0,257$). (Tabla 9 y Figura 17).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,351 \pm 0,043
1 μ M	0,372 \pm 0,051
3 μ M	0,371 \pm 0,070
5 μ M	0,371 \pm 0,049
10 μ M	0,354 \pm 0,053
20 μ M	0,333 \pm 0,041
30 μ M	0,310 \pm 0,018

p-valor=0,257

*DT = desviación típica

Tabla 9: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA).

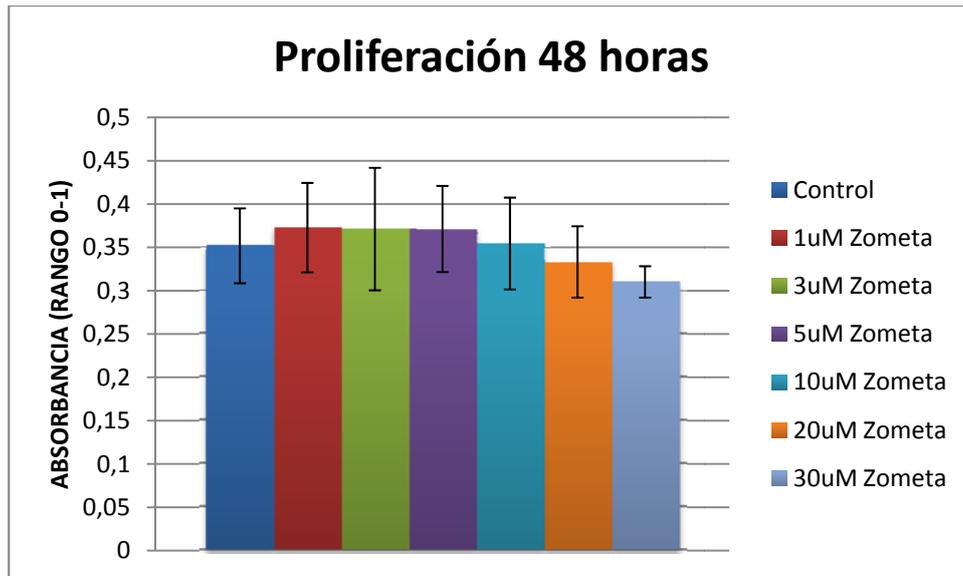


Figura 17: Efecto del ácido zolendróico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA).

72 horas

Transcurridas 72 horas de incubación se observa una clara disminución en la proliferación celular en presencia de ácido zolendróico. De esta forma, volvemos a observar como las mayores concentraciones (10-30 μM) provocan una disminución significativa de la viabilidad celular. El tratamiento que mayor disminución de la proliferación celular provoca con datos muy significativos vuelve a ser 30 μM ($0,212 \pm 0,010$). (Figura 18 y Tabla 10).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,377 \pm 0,024
1 μ M	0,404 \pm 0,054
3 μ M	0,403 \pm 0,087
5 μ M	0,342 \pm 0,099
10 μ M	0,266 \pm 0,046
20 μ M	0,243 \pm 0,050
30 μ M	0,212 \pm 0,010

p -valor=0,0001

* DT = desviación típica

Tabla 10: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA).

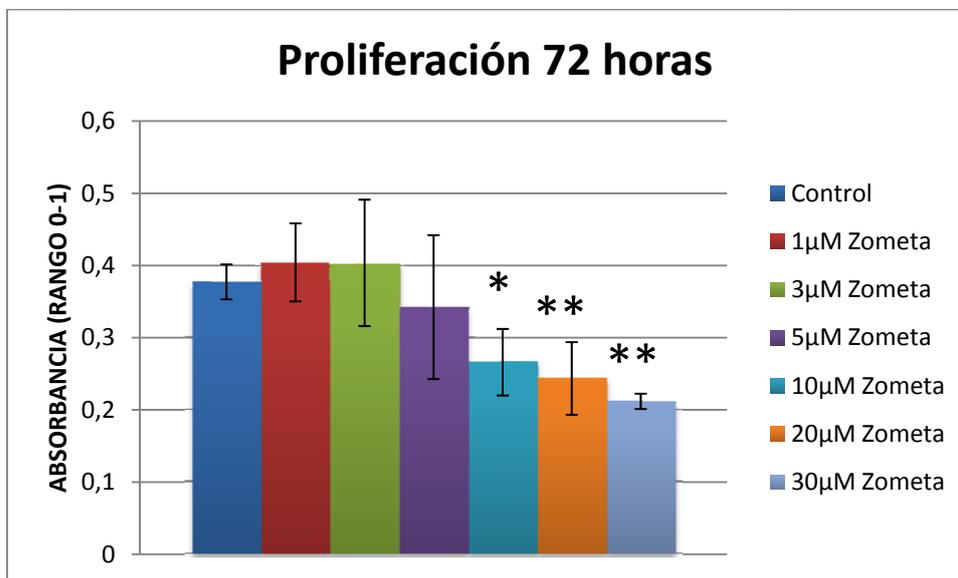


Figura 18: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). * p < 0.05; ** p <0.01.

6.5. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA LINEA CELULAR

PDLSCs.

El tratamiento de la línea celular PDLSCs con melatonina (0-500 μM) durante 24, 48 ó 72 horas no alteró la proliferación celular, que resultó dependiente de la duración de la incubación y de la concentración de la melatonina.

24 horas

La proliferación celular a las 24h fue parecida al grupo control. Encontramos un aumento de la proliferación con respecto al control con la concentración de 100 μM . Por el contrario, la concentración de 400 μM resultó ser la de menor actividad proliferativa; aunque no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas con el resto de concentraciones utilizadas ($p=0,581$) (Tabla 11 y Figura 19).

Concentraciones de Melatonina	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,476 \pm 0,057
100 μM	0,505 \pm 0,054
200 μM	0,445 \pm 0,043
300 μM	0,485 \pm 0,130
400 μM	0,431 \pm 0,033
500 μM	0,471 \pm 0,075

$p\text{-valor}=0,581$

*DT = desviación típica

Tabla 11: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA).

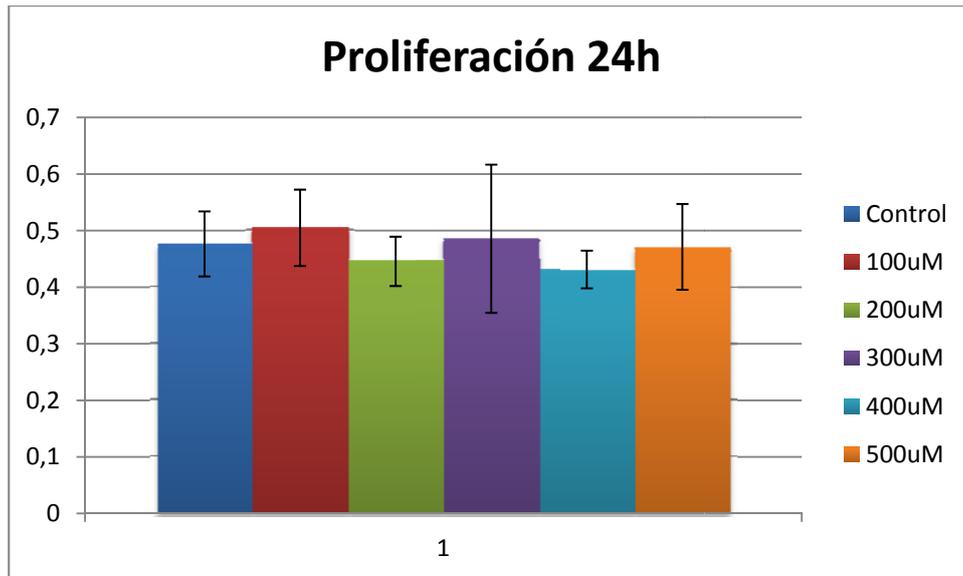


Figura 19: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA).

48 horas

No encontramos diferencias significativas en la proliferación de las PDLSCs en presencia de la melatonina ($p= 0,998$). La concentración de 100 μ M fue la que menor efecto proliferativo tuvo sobre las PDLSCs ($0,605 \pm 0,281$);($p>0.05$), (Tabla 12 y Figura 20) .

Concentraciones de Melatonina	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,615 \pm 0,517
100 μ M	0,605 \pm 0,281
200 μ M	0,628 \pm 0,084
300 μ M	0,624 \pm 0,969
400 μ M	0,623 \pm 0,154
500 μ M	0,607 \pm 0,097

p -valor=0,998

* DT = desviación típica

Tabla 12: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA).

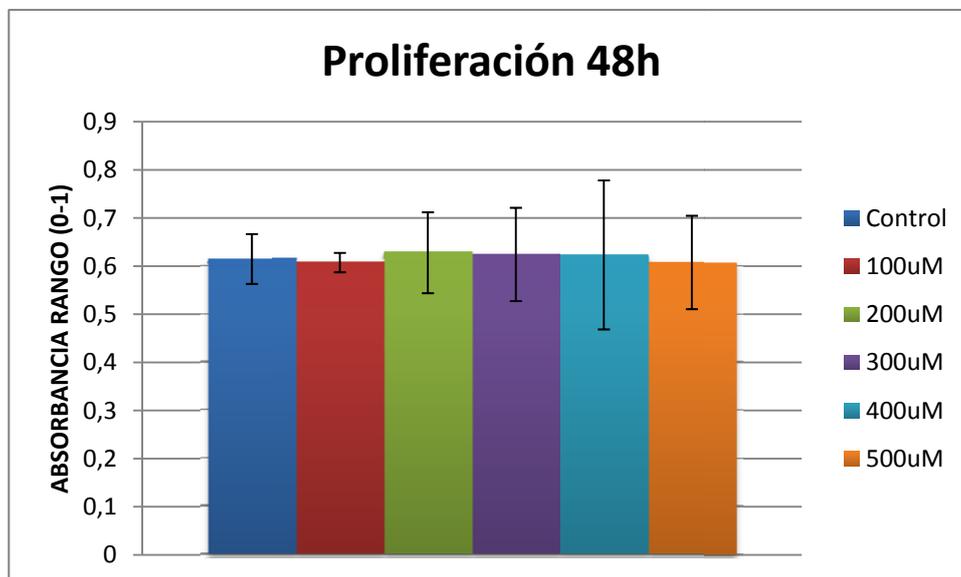


Figura 20: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA).

72 horas

No existen grandes diferencias entre las diferentes concentraciones, con un rango de absorbancia de entre 0.894 y 0.780, sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$). La concentración de 100 μM fue la que mayor efecto tuvo en la proliferación de las células ($0,826 \pm 0,139$). Por el contrario, la concentración de 200 μM fue la que menor efecto proliferativo tuvo ($0,720 \pm 0,158$) (Tabla 13 y Figura 21).

Concentraciones de Melatonina	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,894 \pm 0,041
100 μM	0,826 \pm 0,139
200 μM	0,720 \pm 0,158
300 μM	0,822 \pm 0,101
400 μM	0,787 \pm 0,144
500 μM	0,780 \pm 0,108

$p\text{-valor}=0,270$

*DT = desviación típica

Tabla 13: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA).

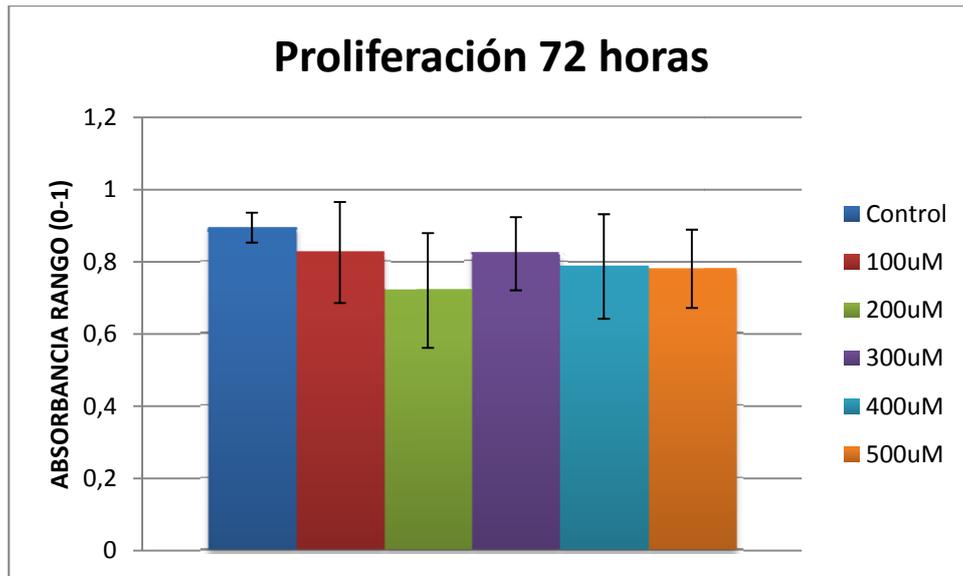


Figura 21: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA).

6.6. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA LINEA CELULAR

BMMSCs.

El tratamiento de la línea celular BMMSCs con melatonina (0-500 μ M) durante 24 y 48 horas no alteró la proliferación celular, que resultó dependiente de la duración de la incubación y de la concentración de la melatonina.

24 horas

A las 24 horas encontramos en cuanto a la proliferación del control ($0,347 \pm 0,021$) un principio de descenso con 100 y 200 μ M que se acentúa a partir de la concentración de 300 μ M, siendo la concentración de 500 μ M la que más afectó al crecimiento celular, aunque no fue estadísticamente significativo ($p= 0.055$) (Tabla 14 y Figura 22).

Concentraciones de Melatonina	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,347 \pm 0,021
100 μ M	0,309 \pm 0,037
200 μ M	0,312 \pm 0,078
300 μ M	0,277 \pm 0,036
400 μ M	0,289 \pm 0,040
500 μ M	0,265 \pm 0,040

p-valor= 0,055

* DT = desviación típica

Tabla 14: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA).

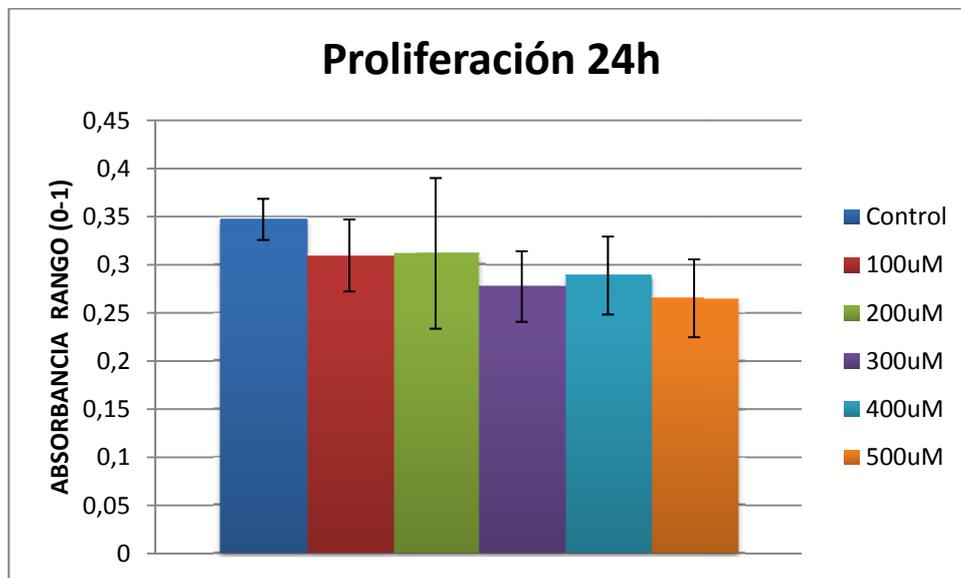


Figura 22: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA).

48 horas

A las 48 horas, encontramos un aumento en la proliferación celular con la concentración de 100 μ M ($0,396 \pm 0,092$) con respecto al control ($0,343 \pm 0,015$), no siendo estadísticamente significativa, y una caída de la proliferación a partir de 200 μ M, fenómeno similar al que ocurre a las 24 horas, siendo la concentración de 500 μ M la que mayor decrecimiento celular provocó ($p=0.061$) (Tabla 15 y Figura 23).

Concentraciones de Melatonina	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,343 \pm 0,015
100 μ M	0,396 \pm 0,092
200 μ M	0,364 \pm 0,084
300 μ M	0,339 \pm 0,072
400 μ M	0,341 \pm 0,040
500 μ M	0,275 \pm 0,031

p -valor= 0,061

* DT = desviación típica

Tabla 15: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA).

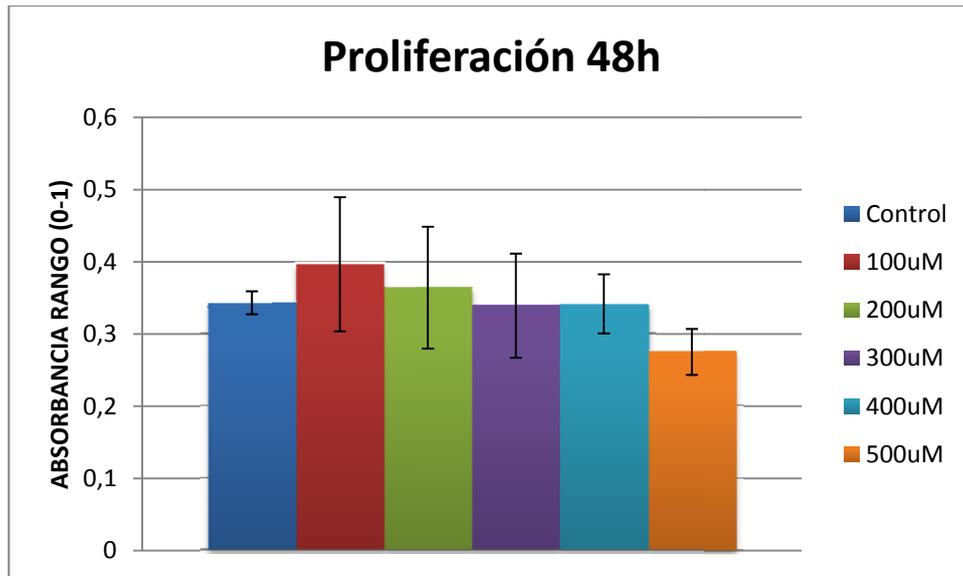


Figura 23: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA).

72 horas

La concentración de 100 μ M al igual que a 48h resulta ser la concentración que provoca un aumento en la proliferación de las BMMSCs, siendo estadísticamente significativo ($p=0.011$). A partir de 200 μ M la proliferación va decayendo gradualmente (Tabla 16 y figura 24).

Concentraciones de Melatonina	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,396 \pm 0,029
100 μ M	0,489 \pm 0,120
200 μ M	0,372 \pm 0,050
300 μ M	0,418 \pm 0,099
400 μ M	0,368 \pm 0,041
500 μ M	0,325 \pm 0,032

p -valor= 0,011

*DT = desviación típica

Tabla 16: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA).

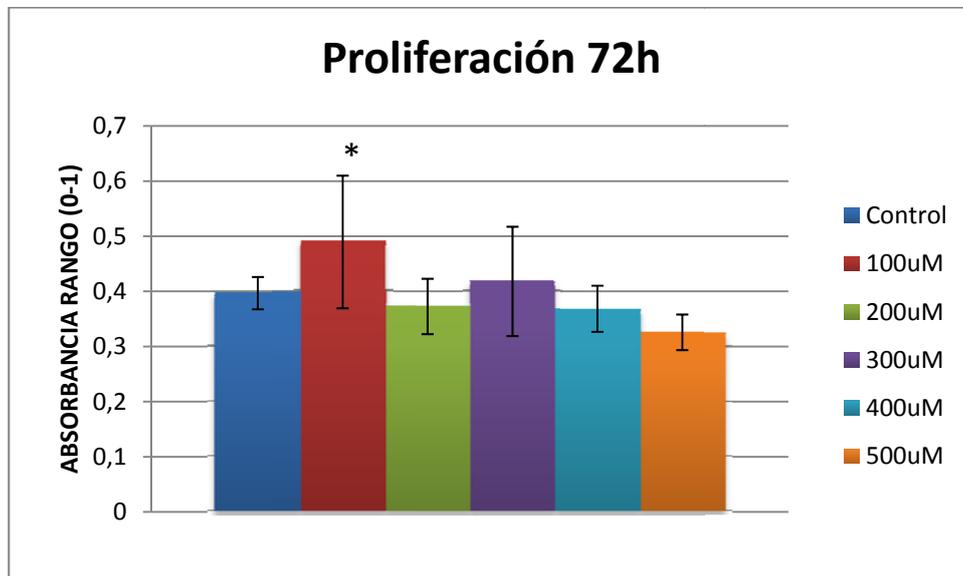


Figura 24: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). * $p < 0.05$

6.7. EFECTO DE LA COMBINACION DE MELATONINA Y ACIDO ZOLENDRONICO SOBRE LA LINEA CELULAR PDLSCsA 72 HORAS.

El tratamiento de la línea celular PDLSCs con melatonina (100, 300 y 500 μ M) y ácido zolendrónico (1, 3, 5, 10, 20, 30) durante 72 horas provocó diferencias significativas de la viabilidad celular, que resultó dependiente de la concentración de la melatonina utilizada y de la dosis de ácido zolendrónico. Dado que los mayores efectos del zolendrónico y melatonina fueron a las 72 horas, se han analizado la combinación de los mismos a 72 horas.

100 μ M Melatonina:

Transcurridas 72 horas de incubación con 100 μ M de melatonina, se observa una clara disminución en la proliferación celular en presencia de ácido zolendrónico. De esta forma, volvemos a observar como a partir de 3 μ M existe una disminución significativa de la viabilidad celular ($p < 0.01$). El tratamiento que mayor disminución de la proliferación celular provoca con datos muy significativos vuelve a ser 30 μ M ($p = 0.0001$). Estos datos sugieren un posible efecto citoprotector parcial de la melatonina sobre las PDLSCs, hasta la concentración 1 μ M (Tabla 17 y figura 25).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,760 \pm 0,034
1 μ M	0,731 \pm 0,082
3 μ M	0,636 \pm 0,069
5 μ M	0,527 \pm 0,081
10 μ M	0,386 \pm 0,031
20 μ M	0,268 \pm 0,016
30 μ M	0,211 \pm 0,015

p-valor=0,0001

*DT = desviación típica

Tabla 17: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 100 μ M de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μ M) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas.

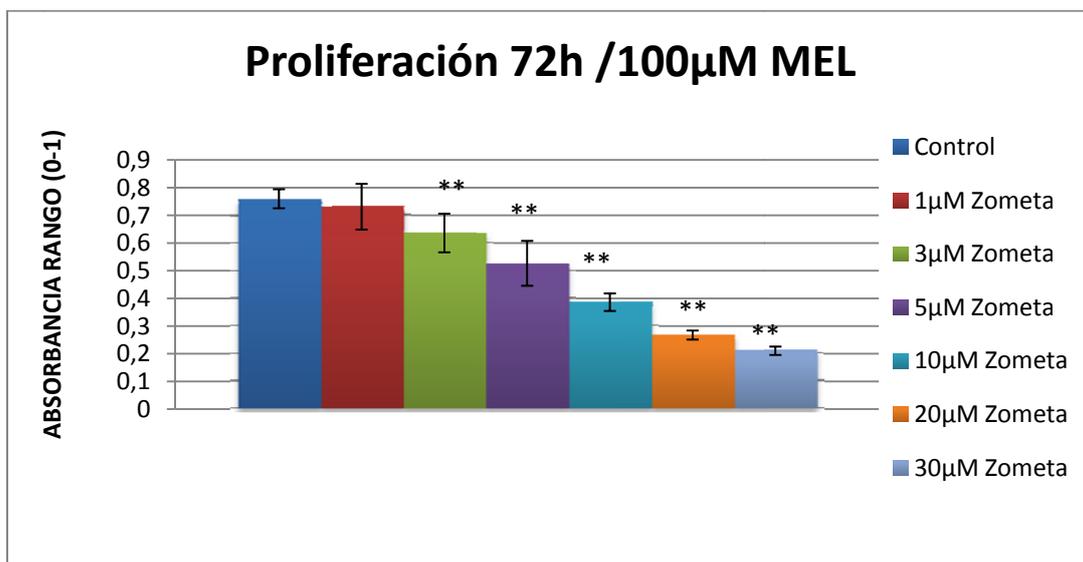


Figura 25: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 100 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. ** $p < 0.01$.

300 μM Melatonina:

Tras 72 horas de tratamiento, la concentración mínima que disminuyó de forma significativa la viabilidad celular respecto al control no tratado fue 5 μM de ácido zolendrónico en presencia de 300 μM ($p < 0.01$) (Tabla 18 y figura 26). Al comparar con la concentración de 100 μM de melatonina, se observa que es necesario una mayor concentración de ácido zolendrónico para que decaiga significativamente la proliferación celular. Lo que sugiere que a mayor concentración de melatonina, existe una mayor citoprotección.

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,852 \pm 0,371
1 μM	0,823 \pm 0,077
3 μM	0,737 \pm 0,122
5 μM	0,652 \pm 0,094
10 μM	0,470 \pm 0,059
20 μM	0,237 \pm 0,025
30 μM	0,176 \pm 0,017

p -valor=0,0001

*DT = desviación típica

Tabla 18: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 300 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas.

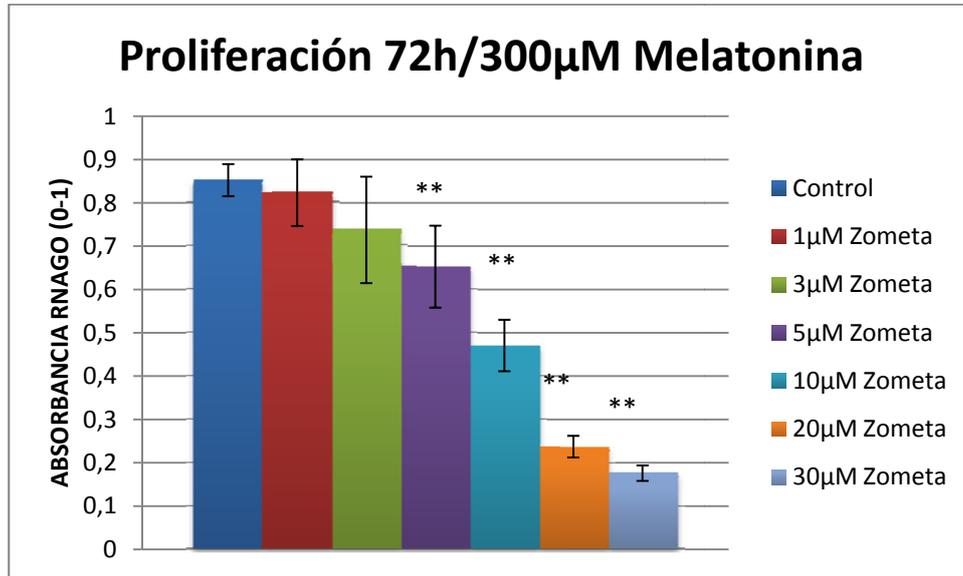


Figura 26: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 300 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. ** $p < 0.01$.

500 μM Melatonina:

El aumento de concentración de melatonina (500 μM) durante 72h, tuvo efectos inhibitorios del efecto de zolendrónico a concentración de 1 μM (0,816 \pm 0,142) y 3 μM (0,733 \pm 0,159) siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$; $p < 0.01$, respectivamente).

No obstante a partir de 10 μM de ácido zolendrónico, hubo un notable decrecimiento de la proliferación celular (Tabla 19 y Figura 27).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT
Control	0,680 \pm 0,030
1 μ M	0,816 \pm 0,142
3 μ M	0,733 \pm 0,159
5 μ M	0,659 \pm 0,049
10 μ M	0,436 \pm 0,153
20 μ M	0,192 \pm 0,025
30 μ M	0,118 \pm 0,010

p-valor=0,0001

DT = desviación típica

Tabla 19: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 500 μ M de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μ M) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas.

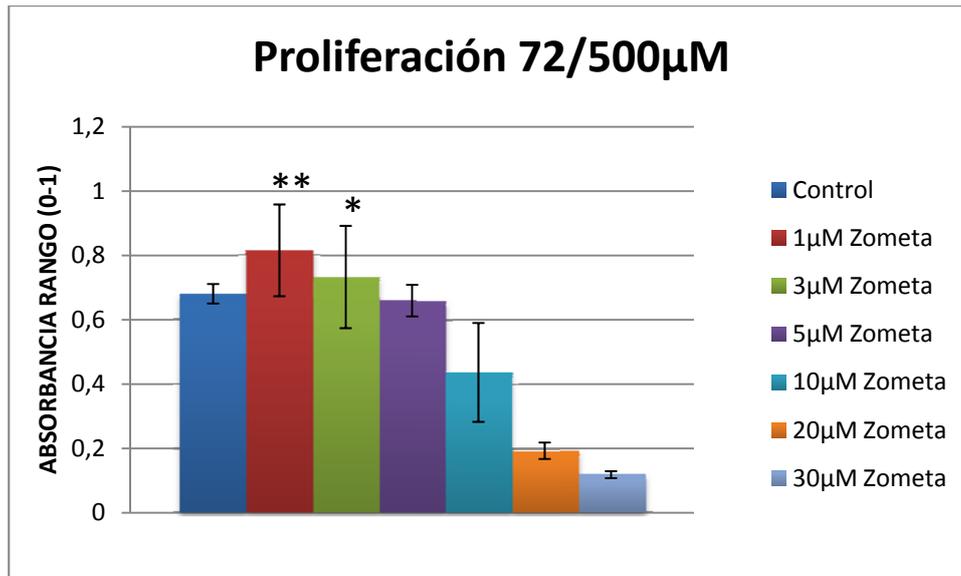


Figura 27: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 500 µM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30µM) durante 72 horas (media ± desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. **p<0.01. *p<0.05.

6.8. EFECTO DE LA COMBINACION DE MELATONINA Y ACIDO ZOLENDRONICO SOBRE LA LINEA CELULAR BMMSCS A 72 HORAS.

El tratamiento de la línea celular BMMSCs con melatonina (100, 300 y 500 µM) y ácido zolendrónico (1, 3, 5, 10, 20, 30) durante 72 horas provocó diferencias significativas de la viabilidad celular, que resultó dependiente de la concentración de la melatonina utilizada y de la dosis de ácido zolendrónico.

100µM Melatonina:

La presencia de 100µM de melatonina en presencia de diferentes concentraciones de ácido zolendrónico sobre las BMMSCs, tuvo un efecto diferente en relación a las PDLSCs. Se observa un aumento significativo de la proliferación celular en concentraciones 1µM ($0,406 \pm 0,060$) ($p < 0.01$) y 3µM ($0,376 \pm 0,042$) ($p < 0.05$), lo que sugiere una mayor protección de la melatonina a concentraciones más bajas en relación a las PDLSCs (Tabla 20 y Figura 28).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,361 \pm 0,032
1µM	0,406 \pm 0,060
3µM	0,376 \pm 0,042
5µM	0,316 \pm 0,044
10µM	0,313 \pm 0,035
20µM	0,261 \pm 0,024
30µM	0,227 \pm 0,005

p-valor=0,0001

*DT = desviación típica

Tabla 20: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 100 µM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30µM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas.

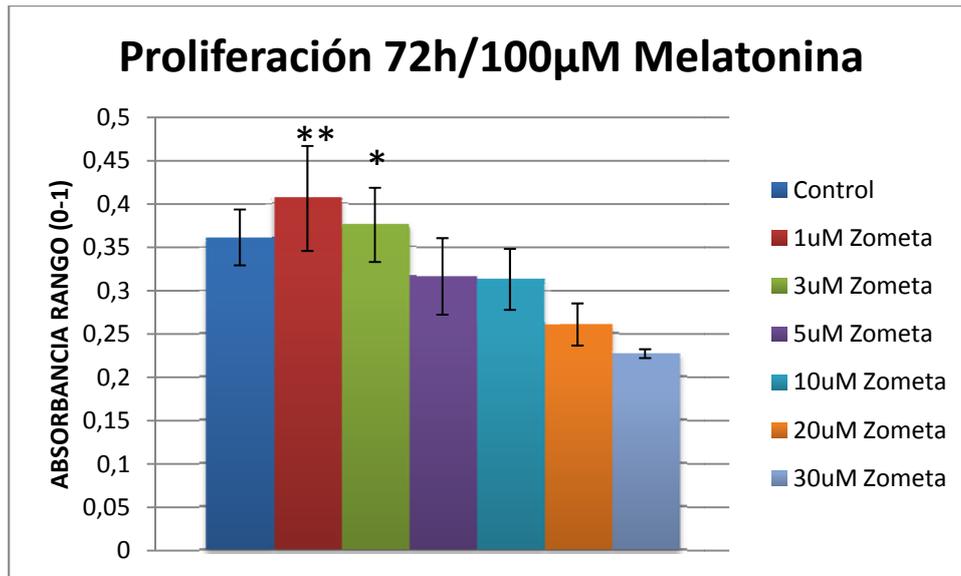


Figura 28: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 100 μ M de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μ M) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. * p <0.05; ** p <0.01.

300 μ M Melatonina:

Tras 72h de incubación de las BMMSCs en presencia de 300 μ M de Melatonina y diferentes concentraciones de zolendrónico, encontramos que parecido a lo que pasa con 100 μ M de melatonina, existe un efecto inhibitorio de la acción tóxica celular del ácido zolendrónico estadísticamente significativo en concentraciones de 3 μ M (p <0.01) y 5 μ M (p <0.05); siendo el crecimiento celular superior al control no tratado. A partir de 10 μ M de ácido zolendrónico, existe un claro decrecimiento celular (Tabla 21 y Figura 29).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,370 \pm 0,023
1 μ M	0,356 \pm 0,021
3 μ M	0,411 \pm 0,102
5 μ M	0,376 \pm 0,059
10 μ M	0,348 \pm 0,056
20 μ M	0,263 \pm 0,032
30 μ M	0,245 \pm 0,009

p -valor=0,0001

*DT = desviación típica

Tabla 21: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 300 μ M de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μ M) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas.

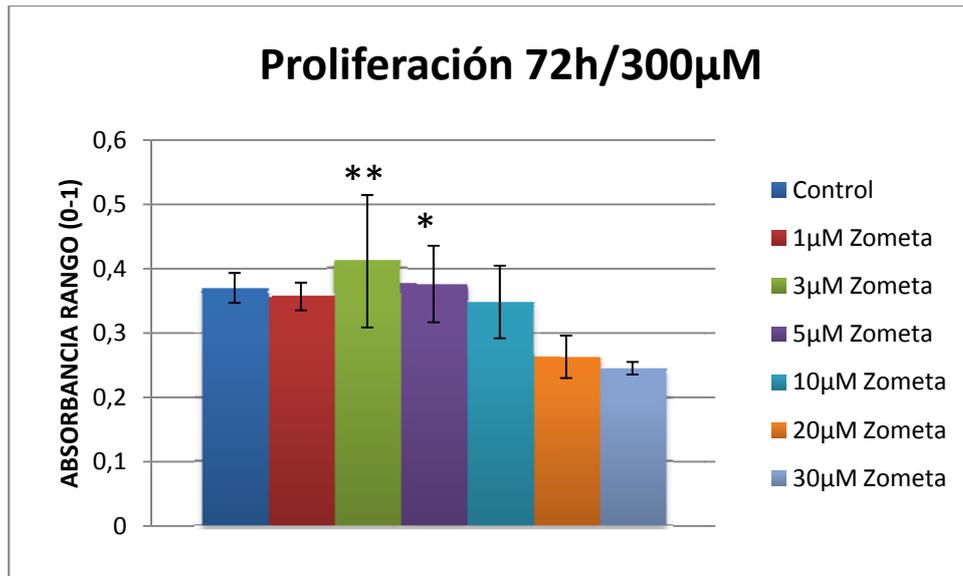


Figura 29: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 300 μ M de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μ M) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. * p <0.05; ** p <0.01.

500 μ M Melatonina:

En presencia de 500 μ M de melatonina, también hubo un efecto citoprotector de las BMMSCs a concentraciones de 1 μ M (p <0.01) y 3 μ M (p <0.05) de ácido zolendrónico. Este efecto desaparece a la concentración de 10 μ M donde se observa una bajada de la proliferación celular (Tabla 22 y Figura 30). Estos resultados sugieren que la línea BMMSCs es más resistente al ácido zolendrónico que la línea PDLSCs, necesitando mayores concentraciones de melatonina para obtener efecto citoprotector (Tabla 22 y Figura 30).

Concentraciones de Ácido zolendrónico	Proliferación celular Media \pm DT*
Control	0,329 \pm 0,120
1 μ M	0,346 \pm 0,020
3 μ M	0,332 \pm 0,143
5 μ M	0,328 \pm 0,031
10 μ M	0,297 \pm 0,078
20 μ M	0,241 \pm 0,158
30 μ M	0,227 \pm 0,071

p -valor=0,0001

*DT = desviación típica

Tabla 22: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 500 μ M de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μ M) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas.

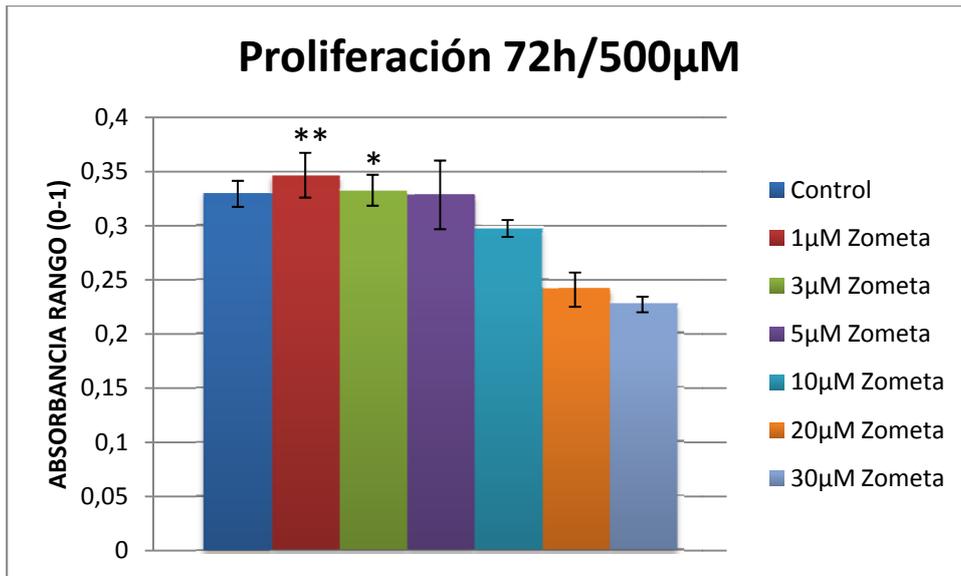


Figura 30: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 500 µM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30µM) durante 72 horas (media ± desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

La osteonecrosis de maxilares secundaria a bifosfonatos, es una entidad clínica que se localiza en los maxilares, fundamentalmente en mandíbula (López, 2014). Esta nomenclatura ha sido modificada en el último consenso realizado por la AAOMS (Ruggiero, 2014), al observar que esta patología ósea era producida también por otros medicamentos (Hamadeh, 2015) y no sólo por bifosfonatos, pasándose a llamar *osteonecrosis asociada a medicamentos antirreabsortivos* (dentro de los cuales están los bifosfonatos) *y a terapias antiangiogénicas*. La incidencia de osteonecrosis depende del tiempo, dosis y vía de administración, siendo mayor en pacientes tratados con bifosfonatos por vía parenteral para patologías neoplásicas, y mucho menor cuando el bifosfonato es administrado por vía oral para el tratamiento de osteoporosis fundamentalmente (Inderjeeth 2014, Polymenidi 2014, Lee 2014). La ASBMR y la AAOMS la describen como un área de hueso expuesto en la región bucomaxilar que persiste más de 8 semanas después de su identificación, en un paciente que estuvo o está recibiendo tratamiento con bifosfonatos (BFs) y en ausencia de radiación previa en la región craneofacial (Rasmusson 2014, Ruggiero 2014).

Los bifosfonatos detienen la pérdida ósea actuando sobre las células del hueso. Inhiben la actividad de los osteoclastos y previenen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (Bellido, 2011). Todas estas células se originan a partir de células madre mesenquimales BMMSCs (Mollazadeh, 2015). Pero se ha visto que estos medicamentos también afectan a células mesenquimales de diferentes linajes (Giribone, 2013) entre las que se encuentran las PDLSCs, alterando su viabilidad y proliferación celular (Agis 2010, Tanaka 2013).

La principal limitación de nuestro trabajo versa en que no existe evidencia científica que estudie el efector citoprotector de la melatonina en presencia de ácido zolendrónico, aunque existen estudios donde se observan los diferentes efectos “in vitro” de la melatonina y ácido zolendrónico por separado.

Los resultados de nuestro estudio in vitro indican que las PDLSCs y las BMMSCs son células de origen mesenquimal que cultivadas con ácido zolendrónico (ZA) se comportan de manera diferente en cuanto a términos de citotoxicidad se refiere. Existe disminución de la proliferación significativa en la línea celular PDLSCs a las 48h con concentraciones de 20 μ M ($p < 0.05$) mientras en la línea BMMSCs no existe diferencia estadísticamente significativa. A las 72 h de estar en cultivo, las PDLSCs mostraron una disminución significativa de su tasa de proliferación y viabilidad celular a concentraciones de 3 μ M de ZA ($p < 0.01$), y las BMMSCs sólo eran sensibles a partir de 10 μ M de ZA ($p < 0.05$). En cambio, en otro estudio realizado en osteoblastos, obtenidos de la cabeza femoral de pacientes que fueron sometidos a cirugía de reemplazo total por presentar osteoartritis, al ser tratados con 10 μ MZA durante 5 días, se obtuvo como resultado q a dosis de 10 μ M de ZA aún no había una afectación significativa sobre la viabilidad celular, considerándose tal dosis como subtóxica (Zara, 2015).

Coincidiendo con nuestros objetivos, encontramos un estudio cuyo propósito fue examinar los efectos in vitro del zolendronato intravenoso (ZOL), del pamidronato (PAM) y del alendronato oral (ALE) en la cavidad oral humana utilizando fibroblastos gingivales, osteoblastos y, además, células de sarcoma osteogénico. Tales células fueron sembradas en múltiples placas de 6 y 96 pocillos con cuatro concentraciones

diferentes (1, 5, 10 y 20 μ M) de cada BF (ZOL, PAM, ALE). Todos los BFs disminuyeron la producción de colágeno y la proliferación celular in vitro. Los osteoblastos y las células de sarcoma bajo PAM o tratamiento con ZOL a concentraciones 5 μ M entraron en apoptosis. ZOL fue el componente con mayor efecto inhibitorio en la proliferación celular y en la producción de colágeno (Acil, 2012).

Nuestros resultados confirman que las PDLSCs fueron más sensibles a ZA que BMSCs. Estos resultados podrían explicar la relación entre la enfermedad periodontal y la existencia de OMN (Thumbigere 2014, Li 2014).

Por otro lado, la melatonina es una hormona que presenta propiedades citoprotectoras (Vinther, 2015), antioxidantes y anti-inflamatorias (Sánchez, 2015), funciona como un inmunomodulador (Mehta, 2014), y estimula el metabolismo óseo (Litovka, 2104).

En la cavidad oral, la melatonina (MEL) se ha propuesto como un agente terapéutico en los implantes dentales al acelerar su osteointegración por su efecto osteoinductor (Cutando, 2008) y en las enfermedades periodontales (Almugrabi, 2013), debido a sus propiedades antioxidantes y efectos antiinflamatorios, ya que las periodontitis y/o gingivitis se ven agravadas por los radicales libres, y por la respuesta inmunológica frente a los microorganismos de la placa. Otros investigadores, realizaron un estudio in vitro que tuvo como objetivo investigar los efectos de la MEL humana en fibroblastos para su uso en aplicaciones periodontales. Se evaluó la viabilidad celular, la expresión génica, la producción de colágeno, la cicatrización de heridas y función de las metaloproteinasas. La MEL mostrós efectos biológicos prometedores al aumentar la producción de colágeno entre otros. Estos resultados

sugieren que MEL podría contribuir a proteger y recuperar la integridad de los tejidos gingivales, por lo tanto, presentan un uso potencial para el tratamiento de la enfermedad periodontal o para mejorar la integración de los tejidos blandos de los pilares protéticos de los implantes dentales (Gómez, 2013). En nuestro trabajo el efecto de la MEL no tuvo efectos significativos en la proliferación celular de la línea PDLSCs a las 24, 48 y 72h. En cambio con la línea BMMSCs a las 72h se obtuvo una mayor proliferación que fue estadísticamente significativa con la concentración de 100 μ M de MEL ($p < 0.05$).

La evidencia científica muestra que la melatonina modula la proliferación de varios tipos celulares. Según la línea celular, las condiciones de cultivo y las concentraciones de melatonina, se han descrito diferentes efectos (Fu, 2011). Otros autores, obtuvieron que la melatonina estimula la proliferación de osteoblastos humanos (Satomura, 2007). En contraste, Liu y cols., mostraron que la melatonina suprime la proliferación de las células de papila dental (APCs) de una manera dependiente de la dosis, incluso a muy baja concentración, e inhibe la formación de dentina. Esto indica que la melatonina podría estar implicada en la regulación de la proliferación de APCs en su curso fisiológico. Esta acción parece estar asociada con alteraciones en la función mitocondrial. Estos resultados sugieren que la melatonina puede regular la formación de dentina y tejido dentario (Liu, 2013). En nuestro trabajo, en contraposición con las APCs, la melatonina aumentó la proliferación celular de forma significativa ($p < 0.05$) en las BMMSCs a concentraciones de 100 μ M mientras que no tuvo un efecto significativo en las PDLSCs.

La combinación de la melatonina con células madre es un tema que despierta un gran interés científico, pero que hasta la actualidad encontramos muy pocos artículos en la literatura. Recientemente se ha publicado un estudio *in vitro* que combina la melatonina con DPSCs para investigar la acción de la MEL sobre la diferenciación hepática en ratones con fibrosis hepática. Los efectos terapéuticos *in vivo* se evaluaron por análisis histopatológico y pruebas de función hepática, incluyendo la medición de la transaminasa alanina, aspartato aminotransferasa, y los niveles de amoníaco. La combinación de melatonina y DPSCs suprimió de forma significativa la fibrosis hepática. Por primera vez, este estudio demuestra que la melatonina promueve la diferenciación hepática de DPSCs mediante la modulación de la proteína morfogenética ósea que se ve aumentada, la melatonina p38 activada, la señal extracelular-quinasaregulada y el factor nuclear JB (NF- κ B). El tratamiento combinado de DPSCs con la melatonina podría ser un enfoque viable para el tratamiento de la cirrosis hepática (Cho, 2015).

En nuestro estudio *in vitro*, el efecto citoprotector de la melatonina se confirmó en los cultivos de PDLSCs y BMMSCs tratados con ZA. Este efecto resultó diferente según el tipo de MSC tratadas con ZA. En el caso de las BMMSCs, dosis de 100 a 300 μ M de melatonina fueron suficientes para disminuir el número de células BMMSCs apoptóticas o aumentar su proliferación hasta cantidades de 3 μ M ZA, en cambio en las PDLSCs se necesitaron dosis \geq 300 μ M de la melatonina en concentraciones de hasta 5 μ M ZA para aumentar su proliferación.

Son varios los autores, que en la búsqueda de encontrar algún tratamiento que frene el efecto de los bifosfonatos, han probado diferentes alternativas terapéuticas tanto *in*

vitro como in vivo, como en el caso de Anitua y cols., que evaluaron mediante un estudio in vitro, el papel de diferentes concentraciones de ZA sobre las células de la cavidad oral humana, así como el potencial del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), para superar los efectos negativos de este BF. Para ello se utilizaron fibroblastos gingivales humanos y osteoblastos alveolares humanos. La proliferación celular se evaluó por medio de un método basado en fluorescencia. ZA tuvo un efecto citotóxico en ambas células. Sin embargo, la adición de PRGF suprimió todos los efectos negativos del ZA. El PRGF muestra un papel citoprotector contra los efectos negativos de ZA sobre las células primarias orales. En la actualidad, no existe un tratamiento definitivo para la osteonecrosis mandibular secundaria a medicamentos antirresortivos, siendo fundamentalmente paliativos. Estos resultados revelaron que PRGF tiene un papel beneficioso en las células expuestas al ácido zoledrónico (Anitua, 2015). A pesar de los efectos tóxicos de este BF, el ZA induce la formación de hueso por lo que se requieren otros medicamentos con función citoprotectora que puedan ser administrados de forma concomitante al tratamiento con el fin de reducir estos efectos secundarios. En nuestro estudio, la presencia de melatonina también hizo que la citotoxicidad del ZA fuera menor tanto en las BMMSCs como en las PDLSCs, constituyendo otro posible agente citoprotector en la terapia de dicha patología.

Encontramos en la literatura un estudio parecido al nuestro en cuanto a metodología, en el que los autores combinaron el Dexrazoxano (otro fármaco citoprotector) con osteoblastos y fibroblastos tratados con ZA. El análisis de MTT mostró una actividad significativamente mayor en las células tratadas con ZA y dexrazoxano en comparación con las tratadas sólo con ZA (Draenert, 2012).

Barba-Recreo y cols., estudiaron la aplicación local de diferentes combinaciones de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) con o sin estimulación previa con la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) y plasma rico en plaquetas (PRP) en ratas. El objetivo fue comparar diferentes tratamientos potencialmente preventivos para la aparición de OMN después de extracciones dentales en ratas tratadas con ácido zoledrónico (ZA). Cincuenta y seis ratas Wistar macho fueron tratadas con ZA durante 9 semanas. Las extracciones dentales se realizaron en la octava semana, y los animales fueron divididos en 4 grupos. En el grupo 1 (n = 14), se realizó la cobertura alveolar con colgajo mucoperióstico. En el grupo 2 (n = 14), PRP se aplicó sobre los alveolos postextracción y se cerró por primera intención. En el grupo 3 (n = 15), se aplicaron y ASCs alogénicas con PRP y cierre de la herida. En el grupo 4 (n = 13), los animales fueron tratados con ASCs cultivadas con BMP-2, PRP, y cierre primario. Se realizaron estudios histológicos, de fluorescencia, y radiológico. Los animales tratados con ASC mostraron una menor frecuencia de osteonecrosis (14% vs 50%, $p = 0,007$) y mayor recambio óseo ($p = 0,024$) y el recuento de los osteoclastos ($p = 0,045$) que los que no recibieron el tratamiento ASC. Los tratamientos basados en ASC parecen prevenir la OMN con o sin PRP. La combinación de ASC y PRP parece ser sinérgico, y la adición de BMP-2 podría mejorar aún más los resultados (Barba- Recreo, 2015).

La posibilidad de usar la melatonina como agente citoprotector en combinación con la terapia de BFs podría representar una alternativa terapéutica prometedora para evitar la ONM. Tanto como terapia preventiva de mantenimiento mientras el paciente está bajo tratamiento con BFs, como ante una situación de riesgo de OMN, como sería tras una extracción dental.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

En función de los resultados que hemos obtenido en este ensayo in vitro que constituye nuestra tesis doctoral, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. Es posible establecer un cultivo primario de células madre procedentes de la médula ósea y ligamento periodontal.
2. Estas células presentan un perfil inmunofenotípico de tipo mesenquimal.
3. El tratamiento con ácido zolendrónico provoca una disminución de la viabilidad celular en ambas líneas celulares, es decir, tanto en las BMMSCs como en las PDLSCs, siendo estas últimas más sensibles al ácido zolendrónico que las BMMSCs.
4. La melatonina no altera la proliferación celular de PDLSCs y sí aumenta la proliferación de las BMMSCs en concentraciones de 100 μ Ma las 72h que resulta estadísticamente significativo.

5. La melatonina presenta un efecto citoprotector en cultivos in vitro de PDLSCs y BMMSCs tratados con ácido zolendrónico. Este efecto resultó diferente según las células madre tratadas con ácido zolendrónico. En el caso de las BMMSCs, a igual concentración de ZA se necesitan dosis menores de melatonina para inhibir el efecto citotóxico de ZA, en cambio con las PDLSCs se necesitan dosis mayores de melatonina para conseguir efectos inhibitorio del ácido zolendrónico

6. Son necesarios estudios in vivo que ratifiquen lo obtenido en nuestros ensayos in vitro. Nuestros resultados avalan la utilización de la melatonina con la terapia de bifosfonatos como una alternativa terapéutica para evitar la ONM.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Orive G. (2015). PRGF exerts a cytoprotective role in zoledronic acid-treated oral cells. *Clin Oral Investig*; Jul 23. DOI 10.1007/s00784-015-1528-y. [Epub ahead of print].
2. Açıl Y, Möller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J et al. (2012) The cytotoxic effects of three different bisphosphonates invitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg*; 40(8):e229-35.
3. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. (2002) Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Topics Med Chem*;2:133-151.
5. Agis H, Blei J, Watzek G, Gruber R. (2010) Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts?. *J Dent Res*;89(1):40-5.
6. Alhussain A, Peel S, Dempster L, Clokie C, Azarpazhooh A. (2015) Knowledge, practices, and opinions of ontario dentists when treating patients receiving bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg*. 73(6):1095-105.

7. Almughrabi OM, Marzouk KM, Hasanato RM, Shafik SS. (2013) Melatonin levels in periodontal health and disease. *J Periodontal Res*;48:315–21.
8. Al-Shamekh S, Goldberg J L. (2014) Retinal repair with induced pluripotent stem cells. *Translational Research*;163(4):377–386.
9. Ariznavarreta C, Villanúa M.A, Cardinali D.P , Tresguerres J.A.F. (2002) Ritmos Biológicos. En: *El espectro bipolar*. Palomo T, Beninger RJ, Jiménez-Arriero M.A. y Huertas, E. (eds.), pp. 211-240 Editorial CYM, Madrid.
10. Armiñán A, Gandía C, Bartual C, García-Verdugo J.M, Lledó E, Mirabet V et al. (2009) Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*; 18(6):907-18.
11. Armstrong SM, Cassone VM, Chesworth MJ, Redman JR, Short RV. (1986) Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J Neural Transm Suppl*;21:375-394.
12. Arreola R, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Velasco-Velázquez MA, Garcés-Alvarez ME, Hurtado-Alvarado G et al. (2015) Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *J Immunol Res*; 354957. doi: 10.1155/2015/354957. Epub Apr 19. Review.
13. Bagán JV, Murillo J, Jimenez Y, Poveda R, Milian MA, Sanchis JM et al. (2005) Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med*; 34: 120-123.
14. Bagán J, Scully C, Sabater V, Jiménez Y. (2009) Osteonecrosis of the jaws in patients treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ); A concise update. *Oral Oncol*; 45: 551-554.

15. Bagán J, Sáez G, Tormos M, Hens E, Terol M, Bagan L et al. (2014). Interleukin-6 concentration changes in plasma and saliva in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis*; 20: 446-52.
16. Balzer I, Hardeland R. (1991) Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science*; 253:795-797.
17. Bansal R, Jain A. (2015) Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med*; 6(1):29-34.
18. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, Georgiev-Hristov T, Ruiz Bravo-Burguillos E, Abarrategi A, Burgueño M et al. (2015) Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. *J Craniomaxillofac Surg*; 43(7):1161-8.
19. Bellido T, Plotkin L. (2011) Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*; 49(1): 50–55.
20. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. (2008) Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*; 16:1–9.
21. Bocanegra Perez, M S. Osteonecrosis de los maxilares asociada a Bifosfonatos. (TESIS DOCTORAL) Las Palmas: Universidad de las Palmas de Gran Canaria Departamentos de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Junio 2010; 1-196.
22. Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Martinez-Madrid MJ, Reiter R, Hardeland R, Rol MA et al. (2014) Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *Int J Mol Sci*; 15(12):23448-500.

23. Bosman A, Edel MJ, Blue G, Dilley RJ, Harvey RP, Winlaw DS. (2015) Bioengineering and Stem Cell Technology in the Treatment of Congenital Heart Disease. *Clin Med*; 4(4):768-81.
24. Brown JP, Morin S, Leslie W, Papaioannou A, Cheung AM, Davison KS et al. (2014) Bisphosphonates for treatment of osteoporosis: expected benefits, potential harms, and drug holidays. *Can Fam Physician*; 60(4):324-33.
25. Burr D, Cauley J, et al. (2007) Bisphosphonate Associated Osteonecrosis of the jaw: Report of a Task Force of the American Society for bone and Mineral Research Sundeep Khosla. *J Bone Miner Res*; 22(10):1479-91.
26. Calvo Catalá J, Campos Fernández C, García-Borrás J, Román Ivorra J, Rosas Gómez de Salazar J. (2009) Riesgo de osteonecrosis mandibular en pacientes con osteoporosis tratados con bifosfonatos. *Actualidad científica Rev. Sociedad Val. Reuma*; 2:37-42.14.
27. Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez JE, López-Marí L, Delgado-Ruiz R, Romanos GE. (2015) New bone formation in bone defects after melatonin and porcine bone grafts: experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*; 26(4):399-406.
28. Cardinali DP, Gvozdzenovich E, Kaplan MR, Fainstein I, Shifis HA, Pérez Lloret S et al. (2002) A double blind-placebo controlled study on melatonin efficacy to reduce anxiolytic benzodiazepine use in the elderly. *Neuro Endocrinol Lett*; 23(1):55-60.
29. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. (2003) Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res*; 34:81-87.
30. Cardona F, Bagán JV, Sáinz E, Figuerido J, Giner f, Vidán FJ. (2009) Osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos: Actualización y puesta al día . In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud*; 32(3):423-437.

31. Carocci A, Catalano A, Sinicropi MS. (2014) Melatonergic drugs in development. *Clin Pharmacol*; 6:127-37.
32. Castillo Pardo de Ver JL, García de Marcos JA, Arroyo S, Galdeano Arenas M. (2007) Osteonecrosis de los maxilares asociada al empleo de los bisfosfonatos. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*; 29:295-308.
33. Chaiamnuay S, Saag KG. (2006) Postmenopausal osteoporosis. What have we learned since the introduction of bisphosphonates? *Rev Endocr Metab Disord*; 7:101-112.
34. Cheong S, Sun S, Kang B, Bezouglaia O, Elashoff D, McKenna CE et al. (2014) Bisphosphonate uptake in areas of tooth extraction or periapical disease. *J Oral Maxillofac Surg*; 72(12):2461-8.
35. Cho YA, Oh K, Jue SS, Lee SY, Kim EC. (2015) Melatonin promote Hepatic Differentiation of human dental pulp stem cells: clinical implications for the prevention of liver fibrosis. *J Pineal Res*; 58(1):127-35.
36. Coelho MJ, Fernandes MH. (2000) Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*; 21:1095–1102.
37. Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT. (1995) Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res*; 19:123-126.
38. Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Álvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG. (2008) Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J. Periodont Res*; 43:531-536.

39. Cozin M, Pinker BM, Solemani K, Zuniga JM, Dadaian SC, Cremers S et al. (2011) Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg*;69(10):2564-78.
- 40 .Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Escames G, Vara E et al. (2011) Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. *Mech Ageing Dev*; 132:573-582.
- 41.Cutando A, Aneiros-Fernández J, Aneiros-Cachaza J, Arias-Santiago S. (2011) Melatonin and cancer: current knowledge and its application to oral cavity tumours. *J Oral Pathol Med*; 40(8):593-7.
- 42.Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. (2007) Melatonin: potential functions in the oral cavity. *J Periodontol*; 78:1094-1102.
- 43.Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. (2003) Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res*; 35:239-244.
- 44.D'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A et al. (2007) Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: A pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*; 14:1162-71.
- 45.Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. (2004) Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci*; 79:214-223.
- 46.De Camargo Moraes P, Silva CA, Soares AB, Passador-Santos F, Corrêa ME, de Araújo NS et al. (2015) Tooth alterations in areas of bisphosphonate-induced osteonecrosis. *Clin Oral Investig*; 19(2):489-95.

47. De Colli M, Zara S, di Giacomo V, Patruno A, Marconi GD, Gallorini M et al. (2015) Nitric oxide-mediated cytotoxic effect induced by zoledronic acid treatment on human gingival fibroblasts. *Clin Oral Investig*; 19(6):1269-77.
48. Del Fabbro M, Gallesio G, Mozzati M. (2015) Autologous platelet concentrates for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw treatment and prevention. A systematic review of the literature. *Eur J Cancer*; 51(1):62-74.
49. De Souza PV, Alves FB, Costa Ayub CL, De Miranda Soares MA, Gomes JR. (2013) Human immature dental pulp stem cells (hIDPSCs), their application to cell therapy and bioengineering: an analysis by systematic revision of the last decade of literature. *Anat REc (Hoboken)*; 296(12):1923-8.
50. Dilisio MF. (2014) Osteonecrosis Following short-term, low-dose oral corticosteroids: a population -based study 24 million patients. *Orthopedics*; 37(7): 631-6.
51. Dimopoulos MA, Kastritis E, Bamia C, Melakopoulos I, Gika D, Roussou M et al. (2009) Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Ann Oncol*; 20: 117-120.
52. Dominici M, Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*; 8:315-317.
53. Draenert GF, Huetzen DO, Kammerer PW, Paire V, Nacu V, Wagner W. (2012) Dexrazoxane shows cytoprotective effects in zoledronic acid-treated human cells in vitro and in the rabbit tibia model in vivo. *J Craniomaxillofac Surg*; 40:369-374.

54. Drize NJ, Surin VL, Gan OI, Deryugina EI, Chertkov JL. Gene therapy model for stromal precursor cells of hematopoietic microenvironment. *Leukemia*. 1992; 6 Suppl 3:174S–175S.
55. Dubocovich ML, Markowska M. (2005) Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*; 27:101-110.
56. Elgammal MY, Salem AS, Anees MM, Tawfik MA. (2015) Clinical and Radiographic Evaluation of Immediate Loaded Dental Implants with Local Application of Melatonin: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Trial. *J Oral Implantol*; Jun 23. [Epub ahead of print]
57. Erviti J. Problemas óseos asociados al uso de bisfosfonatos: ¿evitan o producen fracturas? *Boletín de información farmacoterapéutica de Navarra*. Volumen 17-Nº5. Noviembre – Diciembre 2009.
58. Falussy L, Balla P, Frecska E. (2014) Relapse and insomnia in unipolar major depression. *Neuropsychopharmacol Hung*; 16(3):141-7.
59. Fleisch H, Russell RG, Bisaz S, Casey PA, Mühlbauer RC. (1968) The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution. *Calcif Tissue Res*; (Suppl.): 10-10a.
60. Fu J, Zhao SD, Liu HJ, Yuan QH, Liu SM, Zhang YM et al. (2011) Melatonin promotes proliferation and differentiation of neural stem cells subjected to hypoxia in vitro. *J Pineal Res*; 51(1):104-12.
61. Gandhi AV, Mosser EA, Oikonomou G, Prober DA. (2015) Melatonin is required for the circadian regulation of sleep. *Neuron*; 85(6):1193-9.

62. Gay IC, Chen D, MacDougall M. (2007) Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*; 10(3):149- 6
63. Giribone J, Catagnetto P. (2013) Osteonecrosis de los maxilares inducida por bifosfonatos; lo que el odontólogo debe saber hoy: pautas y protocolos. *Odontoestomatología*; 15(21).
64. Gómez-Moreno G, Aguilar-Salvatierra A, Boquete-Castro A, Guardia J, Piattelli A, Perrotti V et al. (2015) Outcomes of topical applications of melatonin in implant dentistry: a systematic review. *Implant Dent*; 24(1):25-30.
65. Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ. (2010) Melatonin in diseases of the oral cavity. *Oral Dis*; 16:242-247.
66. Gomez F, Joana M, Ramis, Monjo M. (2013) Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts in vitro. *Biochem Pharmacol*; 86(12):1784-1790.
67. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB et al. (2010) Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod*; 36:1504–15.
68. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*; 97:13625–13630.
69. Gupta S, Gupta H, Mandhyan D, Srivastava S. (2013) Bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw. *Natl J Maxillofac Surg*; 4(2):151-8.
70. Guttenberg S.A. (2008) Bisphosphonates and bone...what have we learned? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 106 (6):769-772.

- 71.Hagelauer N, Ziebart T, Pabst AM, Walter C. (2015) Bisphosphonates inhibit cell functions of HUVECs, fibroblasts and osteogenic cells via inhibition of protein geranylgeranylation. *Clin Oral Investig*; 19(5):1079-91.
- 72.Hamadeh IS, Ngwa BA, Gong Y. (2015) Drug induced osteonecrosis of the jaw.*Cancer Treat Rev*; 41(5):455-64.
- 73.Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*; 143(4):508-25.
- 74.Hallmer F, Bjørnland T, Nicklasson A, Becktor JP, Andersson G. (2014) Osteonecrosis of the jaw in patients treated with oral and intravenous bisphosphonates: experience in Sweden. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*; 118(2):202-8.
- 75.Hinson AM, Smith CW, Siegel ER, Stack JR. Is Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw an Infection? A Histological and Microbiological Ten-Year Summary. *Int J Dent*.2014; 2014:452737.
- 76.Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L et al. (2015) Melatonin: an inhibitor of breast cancer *Endocr Relat Cancer*; 22(3):R183-204.
- 77.Ianas O, Olnescu R, Badescu I. (1991) Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom J Endocrinol*; 29:147-153.
- 78.Inderjeeth CA, Glendenning P, Ratnagobal S, Inderjeeth DC, Ondhia C. (2014) Long-term efficacy, safety, and patient acceptability of ibandronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis.*Int J Womens Health*; 17:7-17.
- 79.Insausti CL, Blanquer M, Bleda P. (2010) The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol*; 25:91-99.

80. Insausti CL, Alcaraz A, García-Vizcaíno EM, Mrowiec A, López-Martínez MC, Blanquer M et al. (2010) Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen*; 18(4):368-77.
81. Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T et al. (2009) Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. *Regen Med*; 4(3):377-85.
82. Isobe K, Cheng Z, Nishio N. (2014) iPSCs, aging and age-related diseases. *N Biotechnol*; 31(5):411-421.
83. Johnston JD, Skene DJ. (2015) 60 Years of neuroendocrinology: Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin. *J Endocrinol*; 226(2):T187-98.
84. Junquera L.M, Martín R. (2008) Diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteonecrosis de los maxilares por bifosfonatos. Recomendaciones de la sociedad española de cirugía oral y maxilofacial (SECOM). *Cient dent*; 5(3):229-237.
85. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH. (2007) Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*; 13:767-73.
86. Kádár K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz G, Blazsek J et al. (2009) Differentiation potential of stem cells from human dental origin - Promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol*; 60 Suppl 7:167-175.
87. Kaneko K, Takahashi H. (2014) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the palatal torus. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*; 76(6):353-6.

- 88.Kashyap R. (2015) SHED - Basic Structure for Stem Cell Research. *J Clin Diagn Res*; 9(3):ZE07-9.
- 89.Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan Fet al. (2015) Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res*; 30(1):3-23.
- 90.Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D. (2007) Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the american society for bone and mineral research. *J Bone Miner Res*; 22: 1479-1491.
- 91.Kim C. (2014) Disease modeling and cell based therapy with iPSC: future therapeutic option with fast and safe application. *Blood Research*; 49(1):7-14.
- 92.Kim TW, Jeong JH, Hong SC. (2015) The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism. *Int J Endocrinol*; 2015:591729.
- 93.King AE, Umland EM. (2008) Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphosphonates. *Pharmacotherapy*; 28:667-677.
- 94.Klein DC. (2007) Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem*; 282:4233-4237.
- 95.Kochan DZ, Kovalchuk O. (2015) Circadian disruption and breast cancer: An epigenetic link? *Oncotarget*; 6(19):16866-82.
- 96.Laudon M, Frydman-Marom A. (2014) Therapeutic effects of melatonin receptor agonists on sleep and comorbid disorders. *Int J Mol Sci*; 15(9):15924-50.
- 97.Lee SH, Chang SS, Lee M, Chan RC, Lee C. (2014) Risk of osteonecrosis in patients taking bisphosphonates for prevention of osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*; 25(3):1131-9.

98. Leite AF, Oqada Fdos, de Melo NS, Figueiredo PT. (2014) Imaging findings of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a critical review of the quantitative studies. *Int J Dent*; 2014:7843348.
99. Lekic P, McCulloch CA. (1996) Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*; 245: 327–341.
100. Lerner AB, Case JD. (1959) Pigment cell regulatory factors. *J Invest Dermatol*; 32(2, Part 2):211-21
101. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. (1960) Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem*; 235:1992-7.
102. Li CL, Lu WW, Seneviratne CJ, Leung WK, Zwahlen RA, Zheng LW. (2014) Role of periodontal disease in bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. *Clin Oral Implants Res* Nov 5. doi: 10.1111/clr.12502. [Epub ahead of print].
103. Liu J, Zhou H, Fan W, Dong W, Fu S, He H et al. (2013) Melatonin influences proliferation and differentiation of rat dental papilla cells in vitro and dentine formation in vivo by altering mitochondrial activity. *J Pineal Res*; 54(2):170-8.
104. Litovka IH, Mazepa-Kryzhanivs'ka YO, Berezovskyĭ Via. (2014) The effect of melatonin on bone tissue metabolism. *Fiziol Zh*; 60(2):102-9.
105. Liu T, Borjigin J. (2005) N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res*; 39:91-96.

- 106.López E, Mardenlli F, Paz M. (2014) Oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of maxillary bone: A review of 18 cases. *J Clin Exp Dent*; 6(5):e530-4.
- 107.Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*; 4:415-428.
- 108.Maitra S, Baidya DK, Khanna P. (2013) Melatonin in perioperative medicine: Current perspective. *Saudi J Anaesth*; 7(3):315-21.
- 109.Martindale. (2008) Guía completa de consulta farmacoterapéutica VV.AA. Pharma Editores, S.L. Fármacos moduladores de la mineralización ósea: 1703-1725.
- 110.Marx RE, Cillo JE Jr Ulloa JJ. (2007) Oral bisphosphonate induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*; 65:2397-410.
- 111.Marx RE. (2003) Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*; 61: 1115-1118.
- 112.Marx RE , Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. (2005) Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*; 63: 1567-1575.
- 113.Mavrokokki T, Cheng A, Stein B. (2007) Nature and frequency of Bisphosphonate-associated Osteonecrosis of the jaw in Australia. *J Oral Maxillofacial Surg*; 65(3):415-423.

114. McCulloch CA. (1985) Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec*; 211: 258–262.
115. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. (1987) Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec*; 219: 233–242.
116. McGuire M, Scheyer E, Nunn M, Lavin PT. (2008) A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J Periodontol*; 79(10):1847-56.
117. Mehta A, Kaur G. (2014) Potential role of melatonin in prevention and treatment of oral carcinoma. *Indian J Dent*; 5(2):86-91.
118. Melcher AH. (1985) Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl*; 67: 130–131.
119. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. (2005) Managing the care of patients with bisphosphonate associated osteonecrosis. An American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc*; 136: 1658-1668.
120. Mitalipov S, Wolf D. (2009) Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*; 114:185-99.
121. Moraleda JM, Ruiz F, Blanquer M, Arriba F. (2004) ¿Que son las células madre?. *Hematología Mol*; 3:2-5.
122. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Ruiz F, Bonilla S. (2006) Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transpl Immunol*; 17(1):74-7.

123. Moraleda JM, Blanquer M, Gómez F, Hurtado V, Pérez MA, Rodríguez FJ, Martínez S. (2011) Terapia con células madre en enfermedades neurodegenerativas. *Rev Hematol Mex*; 12(3):144-148.
124. Moore RY. (1978) The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog Reprod Biol*; 4:1-29.
125. Morscizek C, Petersen J, Völlner F, Driemel O, Reichert T, Beck HC. (2009) Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells. *Electrophoresis*; 30(7):1175-84.
126. Mollazadeh S, Fazly Bazzaz BS, Kerachian MA. (2015) Role of apoptosis in pathogenesis and treatment of bone-related diseases. *J Orthop Surg Res*; 10:15.
127. Mukherjee S, Maitra SK. (2015) Gut Melatonin in Vertebrates: Chronobiology and Physiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*; 6:112.
128. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S et al. (2006) Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*; 41(4):303-10.
129. Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajimi A, Kaku T. (1999) Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res*; 27:106-110.
130. Nuti R. (2014) Updates on mechanism of action and clinical efficacy of risedronate in osteoporosis. *Clin Cases Miner Bone Metab*; 11(3):208-214.

131. Padial-Molina M, O'Valle F, Lanis A, Mesa F, Dohan Ehrenfest DM, Wang HL et al. (2015) Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells and Novel Supportive Therapies for Oral Bone Regeneration. *Biomed Res Int*; 2015:341327.
132. Payne N, Sylvain A, O'Brien C, Herszfeld D, Sun G, Bernard C. (2015) Application of human induced pluripotent stem cells for modeling and treating neurodegenerative diseases. *New Biotechnol*; 32(1):212–228.
133. Paino F, Ricci G, De Rosa A, D'Aquino R, Laino L, Pirozzi G et al. (2010) Ecto-mesenchymal stem cells from dental pulp are committed to differentiate into active melanocytes. *Eur Cell Mater*; 20:295-305.
134. PandiS, Trakht I, Srinivasan V, Spence D, Maestroni G, Zisapel N et al. (2008) Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*; 185:335-353.
135. Paulo S, Abrantes AM, Laranjo M, Carvalho L, Serra A, BotelhoMF et al. (2014) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: specificities. *Oncol Rev*; 23:8(2):254.
136. Pechanova O, Paulis L, Simko F. (2014) Peripheral and central effects of melatonin on blood pressure regulation. *Int J Mol Sci*; 15(10):17920-37.
137. Peer A, Khamaisi M. (2015) Diabetes as a risk factor for medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*; 94(2):252-60.
138. Pelayo M, Agra Y. (2004) Bifosfonatos en la prevención de la osteoporosis de mujeres postmenopáusicas con baja masa ósea. *Med Clin (Barc)*; 122:304-10.
139. Peles E, Hetzroni T, Bar-Hamburger R, Adelson M, Schreiber S. (2007) Melatonin for perceived sleep disturbances associated with benzodiazepine withdrawal among

patients in methadone maintenance treatment: a double-blind randomized clinical trial. *Addiction*; 102(12):1947-53.

140. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchoni R, Marcheselli F. (1994) Melatonin: A peroxy radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci*; 55:271-276.

141. Polymenidi I, Trombetti A, Carballo S. (2014) The risk of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Med Suisse*; 10(446):1930-4.

142. Potdar PD, Jethmalani YD. (2015) Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*; 7(5):839-51.

143. Prado Bernal N, Carrasco E, Prado Bernal J. (2011) Manejo estomatológico del paciente en terapia con bifosfonatos. *Rev ADM*; 68(1): 8-16.

144. Pravin D Potdar and Yogita D Jethmalani. (2015) Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*; 7(5): 839–851.

145. Pugazhenti K1, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I. (2008) Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *J Pineal Res*; 44(4):387-96.

146. Ramamoorthi M, Bakkar M, Jordan J, Tran SD. (2015) Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells in Preclinical Studies: A Systematic review using modified arriveand consort guidelines. *Stem Cells Int*; 2015:378368.

147. Rasmusson L, Abtahi J. (2014) Bisphosphate Associated Osteonecrosis of the Jaw: An Update on Pathophysiology, Risk Factors, and treatment. *Int J Dent*; 471035.

148. Reiter R, Tan D, Zhou Z, Cruz M, Fuentes L, Galano A. (2015) Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules*; 20(4):7396-437.

- 149.Reiter R, Tan D, Korkmaz A, Erren T, Piekarski C, Tamura H et al. (2007) Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev Oncog*; 13(4):303-28.
- 150.Reiter R, Rosales S, Liu X, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan D. (2015) Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *J Periodontal Res*; 50(1):9-17.
- 151.Reiter R. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev*;12:151-180.
152. Rogers MJ. (2004) From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int*; 75: 451-461.
- 153.Ruggiero S, Mehrotra B, RosenbergT, Engroff S. (2004) Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*; 62: 527- 534.
- 154.Ruggiero S, Dodson T, Assael L, Landesberg R, Marx R, Mehrotra B. (2009) American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws-2009 update. *J Oral Maxillofac Surg*; 67 (Suppl. 1): 2-12.
155. Ruggiero S, Dodson T, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B et al. (2014) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.position paper on medication related osteonecrosis of the jaw--update.*J Oral Maxillofac Surg*; 72(10):1938-56.
- 156.Russell RG, Smith R. (1973) Diphosphonates Experimental and clinical aspects. *J Bone Joint Surg Br*; 55: 66-86.

157. Saito M, Silvério K, Casati M, Sallum E, Nociti F.(2015) Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World J Stem Cells*; 7(2):399-407.
158. Sánchez A, Calpena AC, Clares B. (2015) Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci*; 16(8):16981-7004.
159. Saracino S, Canuto R, Maggiora M, Oraldi M, Scoletta M, Ciuffreda L et al. (2012) Exposing human epithelial cells to zolendronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model . *J Oral Pathol Med*; 41:788-792.
160. Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T et al. (2008) Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor. *Eur J Neurosci*; 27(3):538-48.
161. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E et al. (2007) Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res*; 42(3):231-9.
162. Schwartz HC. (2015) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update and CTX. *J Oral Maxillofac Surg*; 73(3):377.
163. Seo B, Miura M, Gronthos S, Barthold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey P, Wang C, Shi S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*; 364:149-155.
164. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:13625–13630.

165. Shane E, Burr D, Ebeling PR. (2010) Atypical subtrochanteric and diaphysealfemoral fractures: Report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*; 25(11):2267-94.
166. She F, Wang W, Wang Y, Tang P, Wei J, Chen H et al. (2014) Melatonin protects MG63 osteoblast-like cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by maintaining mitochondrial function. *Mol Med Rep*; 9:493-8.
167. Scheper M, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T. (2010) A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*; 1:3:6.
168. Sheppard H, Uttley W, Syme J, Belton N. (1974) Proceedings: use of diphosphonates in diseases associated with ectopic calcification. *Arch Dis Child*; 49: 828.
169. Shilpa P, Kaul R, Sultana N, Bhat S. (2013) Stem cells: Boon to dentistry and medicine. *Dent Res J*; 10(2): 149–154.
170. Simonneaux V, Ribelayga C. (2003) Generation of the Melatonin Endocrine Message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*; 55:325-395.
171. Sigua-Rodriguez EA, da Costa Ribeiro R, de Brito AC, Alvarez-Pinzon N, de Albergaria-Barbosa JR. (2014) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a review of the literature. *Int J Dent*; 2014:192320.
172. Slominski A. (2005) On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine*; 27:137–148.
173. Srinivasan V, Smits M, Spence W, Lowe A, Kayumov L, Pandi-Perumal S et al. (2006) Melatonin in mood disorders. *World J Biol Psychiatry*; 7(3):138-51.

174. Stemple D, Anderson D. (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*; 71:973-985.
175. Storm T, Thamsborg G, Steiniche T. (1990) Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*; 322:1265-1272.
176. Sugiura F, Kitoh H, Ishiguro N. (2004) Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Biochem Biophys Res Commun*; 316:233-239.
177. Tanaka Y, Nagai Y, Dohdoh M, Oizumi T, Ohki A, Kuroishi T et al. (2013) In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. *Arch Oral Biol*; 58(6):628-37.
178. Tan D, Manchester L, Terron M, Flores L, Tamura H, Reiter R. (2007) Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J Pineal Res*; 43:317-320.
179. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester L, Reiter R. (1993) Melatonin; A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*; 1:57-60.
180. Thumbigere-Math V, Michalowicz B, Hodges J, Tsai M, Swenson K, Rockwell L et al. (2014) Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Periodontol*; 8: 226-33.
181. Verma K, Bains R, Bains VK, Rawtiya M, Loomba K, Srivastava SC. (2014) Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview. *Dent Res J*; 11:302-308.
182. Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from

mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*; 126(4):663-76.

183. 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. *Biochem Biophys. Res. Commun*; 357(4):917-23.

184. Tropepe V, Coles B, Chiasson B, Horsford D, Elia A, McInnes R et al. (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*; 287:2032-2036.

185. Valenzuela FJ, Vera J, Venegas C, Pino F, Lagunas C. (2015) Circadian System and Melatonin Hormone: Risk Factors for Complications during Pregnancy. *Obstet Gynecol Int*; 2015:825802.

186. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I et al. (2007) Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placental human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem*; 282(19):14243-52.

187. Vinther AG, Claesson M. (2015) The influence of melatonin on the immune system and cancer. *Ugeskr Laeger*; 18:177(21).

188. Voiculescu SE, Zygouropoulos N, Zahiu CD, Zagrean AM. (2014) Role of melatonin in embryo fetal development. *J Med Life*; 7(4):488-92.

189. Wan W, Cao L, Kalionis B, Xia S, Tai X. (2015) Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Studying the Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells Int*; 2015:382530.

190. Wat Wz. (2014) Current perspectives on bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *The Clin Risk Manag*; 10:977-83.

191. Watts NB. (2014) Long-term risks of bisphosphonate therapy. *Arg Bras Endocrinol Metabol*; 58(5):523-9.

192. Weissman I. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*; 287(5457):1442-6.
193. Weissman I. (2000) Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*; 100:157-168.
194. Wenjun Zhu , and Min Liang. (2015) Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects. *Stem Cells Int*; 2015: 972313.
195. Widera D, Grimm W, Moebius J, Mikenberg I, Piechaczek C, Gassmann G et al. (2007) Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev*; 16(3):447-60.
196. Woo S, Hellstein J, Kalmar J. (2006) Systematic review: Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*; 144: 753-761.
197. Wyles S, Brandt E, Nelson T. (2014) Stem Cells: The Pursuit of Genomic Stability. *Int J Mol Sci*; 15(11): 20948–20967.
198. Yang Z, Zhang X, Dang N, Ma Z, Xu L, Wu J et al. (2009) Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J Periodontal Res*; 44(2):199-210.
199. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res*. 2008; 87:767–71.
200. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin I et al. (2009) Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*; 324(5928):797-801.
201. Zamfir Chiru AA, Popescu CR, Gheorghe DC. (2014) Melatonin and cancer. *Med Life*; 7(3):373-4.

202. Zara S , De Colli M, di Giacomo V, Zizzari VL, Di Nisio C, Di Tore U et al. (2015) Zoledronic acid at subtoxic dose extends osteoblastic stage span of primary human osteoblasts. Clin Oral Investig; 19(3):601-11.
203. Zhao J, Jiang W, Sun C, Hou C, Yang X, Gao J. (2013) Induced pluripotent stem cells: origins, applications, and future perspectives. J Zhejiang Uni Sci B; 14(12):1059–1069.

ÍNDICE DE FIGURAS

10. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del pirofosfato y bifosfonato (tomado de Cardona, 2009).

Pág. 8.

Figura 2. Osteonecrosis maxilar. Se observa hueso áreas de hueso necrótico con abundantes colonias de Actinomyces. Foto cedida por el Dr. Aguirre. Pág.15.

Figura 3. Imagen de osteonecrosis asociada a bifosfonatos en la región mandibular tras extracción dentaria. Pág. 18.

Figura 4. Prevalencia de la osteonecrosis en el territorio maxilomandibular (tomado de Bocanegra, 2010). Pág. 20.

Figura 5. Vía para la síntesis de serotonina y melatonina a partir del triptófano. Abreviaciones: THP = triptófano hidroxilasa, 5-HT = 5 hidroxitriptófano, AADC = descarboxilasa aromática de aminoácidos L, SNA = serotonina N- acetilasa, HOMT = hidroxindol-O-metiltransferasa. Pág. 28.

Figura 6. Bisturí con el que se raspó la superficie radicular y recogida de la sustancia obtenida. Pág. 52.

Figura 7. Imagen de la centrifugadora a 1500 rpm para la obtención del pellet. Pág. 53.

Figura 8. Aislamiento en colagenasa. Pág. 54.

Figura 9. Cámara de Neubauer. Pág. 57.

Figura 10. Preparación del ensayo de proliferación celular. Pág. 64.

Figura 11. Imagen donde observamos la gran confluencia celular. Pág. 68.

Figura 12. Respuesta a los antígenos de membrana celular que expresaron las BMMSCs y PDLSCs. Pág. 69.

Figura 13: Efecto del ácido zolendróico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 71.

Figura 14: Efecto del ácido zolendróico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Pág. 72.

Figura 15: Efecto del ácido zolendróico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. *** $p = 0.0001$. Pág. 74.

Figura 16: Efecto del ácido zolendróico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 76.

Figura 17: Efecto del ácido zolendróico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 78.

Figura 18: Efecto del ácido zolendróico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Pág. 79.

Figura 19: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 81.

Figura 20: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 82.

Figura 21: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 84.

Figura 22: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 85.

Figura 23: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 87.

Figura 24: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). * $p < 0.05$. Pág. 88.

Figura 25: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 100 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendróico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. ** $p < 0.01$. Pág. 90.

Figura 26: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 300 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendróico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. ** $p < 0.01$. Pág. 92.

Figura 27: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 500 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendróico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. ** $p < 0.01$. * $p < 0.05$. Pág. 94.

Figura 28: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 100 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendróico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Pág. 96.

Figura 29: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 300 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendróico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Pág. 98.

Figura 30: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 300 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendróico (1-30 μM) durante 72 horas

(media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Pág. 100.

ÍNDICE DE TABLAS

11.ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Vía de administración y potencia relativa de los bifosfonatos (tomado de King, 2008). Pág.9

Tabla2: Componentes y concentraciones del medio basal que utilizamos. Pág. 59.

Tabla 3: Anticuerpos usados para la evaluación de antígenos de superficie de las DPSC y BMMSCs. Pág. 61

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia. Página 63.

Tabla 5: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 24 horas de incubación (*test ANOVA*). Pág. 70

Tabla 6: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 48 horas de incubación (*test ANOVA*). Pág.72

Tabla 7: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 72 horas de incubación (*test ANOVA*). Pág. 73.

Tabla 8: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 24 horas de incubación (*test ANOVA*). Pág. 75.

Tabla 9: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 48 horas de incubación (*test ANOVA*). Pág. 77

Tabla 10: Efecto del ácido zolendrónico sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 72 horas de incubación (*test ANOVA*). Pág.79

Tabla 11: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 24 horas de incubación (*test ANOVA*). Pág. 80

Tabla 12: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 82

Tabla 13: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea PDLSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 83

Tabla 14: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 24 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 85

Tabla 15: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 48 horas de incubación (test ANOVA). Pág.86

Tabla 16: Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea BMMSCs, después de 72 horas de incubación (test ANOVA). Pág. 88

Tabla 17: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 100 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. Pág. 90

Tabla 18: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 300 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. Pág. 91

Tabla 19: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PDLSCs en presencia de 500 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. Pág. 93

Tabla 20: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 100 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. Pág. 95

Tabla 21: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 300 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. Pág. 97.

Tabla 22: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular BMMSCs en presencia de 500 μM de Melatonina y tratada con ácido zolendrónico (1-30 μM) durante 72 horas (media \pm desviación estándar); cada valor es la media de 6 medidas. Pág. 99.

ANEXO

12. ANEXO

– JUSTIFICANTE DEL POSTER DE SEPA:



SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE PERIODONCIA
Y OSTEointegración

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE PERIODONCIA Y OSTEointegración

Dr. Antonio Bujaldón Daza, Secretario de la Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración

CERTIFICA QUE:

Dra. LAURA PARRAGA LINARES ha presentado la **Comunicación en Formato Poster de Investigación** "ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE LA MELATONINA FRENTE AL ÁCIDO ZOLENDRÓNICO EN CÉLULAS MADRE PROCEDENTES DE LIGAMENTO PERIODONTAL (PDLSCS) Y MÉDULA ÓSEA (BMMSCS)" firmada por Parraga Linares, L; Rodríguez Lozano, FJ y Oñate Sánchez, R en la **49ª Reunión Anual de SEPA** celebrada Barcelona los días 26, 27 y 28 de Febrero 2015.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente Certificado en Barcelona a 28 de Febrero 2015.

Dr. Antonio Bujaldón Daza
Secretario