



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Potencialidad de la Fibroína de Seda como
Scaffold para Reparación y Regeneración
Pulpar

D^a María Pilar Pecci Lloret

2018



TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA,
ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA
Y MEDICINA FÍSICA

POTENCIALIDAD DE LA FIBROÍNA DE SEDA COMO
SCAFFOLD PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN
PULPAR

MARÍA PILAR PECCI LLORET





**POTENCIALIDAD DE LA FIBROÍNA DE SEDA COMO
SCAFFOLD PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN PULPAR**

Memoria presentada por
María Pilar Pecci Lloret
Para optar al Grado de
Doctora en Odontología por la
Universidad de Murcia

Directores:

Dr. Salvador David Aznar Cervantes

Dr. Ricardo Elías Oñate Sánchez

Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano





*Aprenda a amar sus derrotas, Marcus,
pues son las que le construirán.
Son sus derrotas las que
darán sabor a sus victorias.*

*“La verdad sobre el caso Harry Quebert”
Joël Dicker*



AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis Francisco Javier Rodríguez Lozano, Ricardo Elías Oñate y Salvador Aznar, por su dedicación y las horas de su tiempo que han invertido en mí, por las continuas revisiones, por ayudarme a mejorar.

En especial, gracias a Francisco Javier Rodríguez Lozano por la gran paciencia que ha tenido durante todo este tiempo, por sus ánimos y por haberme hecho partícipe de su gran pasión por la investigación, que me ha inculcado.

Gracias a todos los técnicos del LAIB, que cuando me vieron perdida por los pasillos o con las pipetas en la mano se acercaron a ofrecerme su ayuda y me guiaron para poder continuar mi trabajo. Gracias en especial a María del Mar Collado González por un trabajo espectacular, por haberme dedicado todo el tiempo que he necesitado para, en la medida de lo posible, tenerlo todo claro e intentar transmitirlo.

Sobre todo, gracias a mi familia:

Gracias Mamá por tu sonrisa y el ánimo que me has dado todos los días que resoplaba en el despacho, cuando no sabía por dónde seguir.

Gracias Papá por leerte mil veces mi tesis sin entender todo el lenguaje técnico, sólo para buscar errores que ya éramos incapaces de ver nosotros.

Gracias Miguel por la pasión que desprendes por la odontología, que hace que viva todo esto con mayor ilusión, por todas las horas que echas explicándome cosas y tu tiempo releýéndote todo para darme tu opinión.

Gracias Julia por haber sido un ejemplo a seguir, porque después de verte trabajar y leer tu tesis decidí que yo también quería ser doctora.

Y también a todas las personas, amigos, compañeros o desconocidos, que durante la elaboración de esta tesis han estado ahí, y que de una forma u otra se ha cruzado conmigo, GRACIAS, porque cada piedra del camino ha hecho esto posible.





FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por la Red Española de Terapia Celular (TerCel) otorgada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCiii) (RETICS RD07/0010/2012 y RD12/0019/0001) y el Programa Conjunto para la Investigación Biomédica en Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa del ISCiii y el FFIS (Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia).



ÍNDICE





ÍNDICE

Resumen.....	1
Palabras clave.....	2
Abreviaturas.....	4
Lista figuras.....	8
Lista tablas.....	12
1. Introducción	
1.1 Anatomía dental.....	17
1.2 Células madre.....	19
1.2.1 Células madre mesenquimales.....	20
1.2.2 Células madre derivadas de tejidos orofaciales.....	21
A) Células madre procedentes del ligamento periodontal (PDLSCs).....	21
B) Células madre procedentes del folículo dental (DFSCs).....	22
C) Células madre procedentes de la papila apical (SCAPs).....	23
D) Células madre procedentes del tejido gingival (GMSCs).....	25
E) Células madre procedentes del tejido periapical (PL-MSCs).....	26
F) Células madre procedentes de la lámina propia de la mucosa oral (OMLP-PCs).....	26
G) Células madre procedentes de la médula ósea de mandíbula (OMMSCs).....	27
H) Células madre procedentes de la pulpa dental (DPSCs).....	27
I) Células madre procedentes de dientes deciduos (SHEDs).....	28



1.3 Fibroína.....	29
1.3.1 Propiedades de la fibroína de seda como biomaterial	
A) Biocompatibilidad.....	31
B) Propiedades mecánicas.....	31
C) Biodegradación.....	32
D) Funcionalización de la superficie.....	32
1.3.2 Usos médicos regenerativos.....	32
1.4 Regeneración y reparación	
1.4.1 Pulpa.....	33
1.4.2 Reparación.....	34
1.4.3 Regeneración.....	34
1.4.4 <i>Scaffolds</i> o andamios tridimensionales para regeneración pulpar..	38
2. Objetivos.....	44
3. Material y métodos	
3.1 Aislamiento celular.....	50
3.1.1 Extracción de pulpa dental humana (hDP).....	50
3.1.2 Disgregación enzimática.....	51
3.1.3 Disgregación mecánica.....	52
3.2 Recuento y estimación viabilidad celular.....	52
3.3 Cultivo de células de dientes deciduos.....	53
3.4 Elaboración de armazón tridimensional (<i>scaffold</i>) de fibroína de seda.....	55
3.5 Cultivo celular sobre <i>scaffolds</i> de fibroína.....	57
3.6 Procesado muestras y microscopio electrónico de barrido.....	58



3.7	Análisis de la proliferación celular.....	59
3.8	Análisis de la expresión de marcadores de superficie de células madre mesenquimales por citometría de flujo.....	60
3.9	Determinación de la viabilidad celular.....	61
3.10	Estadística.....	62
4.	Resultados	
4.1	Aislamiento celular procedente de la pulpa dental.....	66
4.2	Microscopía electrónica de barrido.....	66
4.3	Análisis de la proliferación celular	71
4.4	Fenotipo.....	75
4.5	Apoptosis.....	77
5.	Discusión	
5.1	Células madre en odontología regenerativa.....	82
5.2	Tipos de <i>scaffolds</i>	85
5.3	Sobre la viabilidad celular.....	89
5.4	Sobre la apoptosis celular.....	90
5.5	Sobre el análisis de la expresión de marcadores de superficie de células madre mesenquimales por citometría de flujo.....	91
5.6	Sobre el análisis de la morfología y adherencia celular mediante microscopio electrónico de barrido.....	92
5.7	<i>Scaffold</i> de fibroína para regeneración.....	93
6.	Conclusiones.....	96
7.	Bibliografía.....	100
8.	Anexos.....	122



8.1 Anexo 1. Modelo consentimiento informado.....	124
8.2 Anexo 2. Hoja de información a la persona participante.....	125
8.3 Anexo 3. Informe de la comisión de ética de investigación de la Universidad de Murcia.....	126
8.4 Anexo 4. Póster I Jornadas doctorales Universidad de Murcia.....	127
8.5 Anexo 5. Póster III Jornadas doctorales de la Universidad de Murcia.....	128
8.6 Anexo 6. Certificado comunicación oral congreso SEOP 2016.....	129
8.7 Anexo 7. Certificado comunicación oral congreso SESPO 2016.....	130
8.9 Anexo 8. Certificado comunicación oral congreso SEOP 2017.....	131
8.10 Anexo 9. Primer accésit al premio María Luisa Galvarro a la mejor comunicación oral en la SEOP 2017.....	132
8.11 Anexo 10. Artículo en Journal of Craneofacial Surgery.....	133
8.12 Anexo 11. Artículo en Journal of Odontology.....	134



RESUMEN



RESUMEN

La fibroína de seda es una proteína de origen natural producida por el insecto *Bombyx mori* también conocido como gusano de seda. Se trata de una sustancia que presenta propiedades cicatrizantes y regenerativas, siendo un biomaterial óptimo que podría ser utilizado en regeneración y reparación pulpar. Por otro lado, las células madre son células que presentan elevada capacidad clonogénica, de autorenovación, pudiendo diferenciarse en varios linajes celulares. Además, se pueden aislar de distintas localizaciones dentro de la cavidad oral.

En nuestro caso las células madre utilizadas procedían de dientes deciduos. El objetivo de este trabajo ha sido valorar la biocompatibilidad de la fibroína de seda con células madre procedentes de dientes deciduos.

A partir de dientes de leche sin afectación pulpar se realizó la extracción de pulpa dental humana (hDP), que fue disgregada enzimática y mecánicamente; se realizó el recuento y la estimación de la viabilidad celular y posterior siembra de células madre de pulpa dental de dientes deciduos. Igualmente, se fabricó un armazón tridimensional (*scaffold*) de fibroína de seda donde se sembraron 5000 células. Se analizó la proliferación celular mediante la técnica de Alamar Blue y la morfología de las células creciendo sobre los *scaffolds* se analizó a través de microscopía electrónica de barrido. Se estudió la supervivencia y morfología celular, los resultados obtenidos demostraron que los *scaffolds* de fibroína resultan biocompatibles para las SHEDs ya que éstas mantienen su morfología y se adhieren al mismo con facilidad y las SHEDs son capaces de proliferar sobre él. Los resultados de este trabajo *in vitro* avalan el uso del *scaffold* de fibroína de seda en ingeniería tisular con células madre de dientes deciduos. Futuros trabajos *in vivo* son necesarios para confirmar su posible uso en pulpotomías y en endodoncia regenerativa.

PALABRAS CLAVE

Fibroína de seda; armazón tridimensional; *scaffold*; células madre; pulpa dental; regeneración dental.





ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

ALP	Fosfatasa alcalina
ANP	Péptido natriurético atrial.
BMP-2	Proteína morfogénica ósea 2
BSP	Bromosulfaleína
CMs	Células madre.
CMMs	Células madre mesenquimales.
CNTF	Factor neurotrófico ciliar.
CNPase	Nucleótido fosfodiesterasa
DFSCs	Células madre procedentes del folículo dental.
DPSCs	Células madre procedentes de la pulpa dental.
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico.
FRP	Factores ricos en plaquetas.
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa.
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial.
GMSC	Células madre procedentes de tejido gingival.
HA/TCP	Tricalcio fosfato hidroxiapatita.
hDP	Pulpa dental humana.
hDTM	<i>Scaffold</i> de dentina humana.
IBA1	Molécula adaptadora de enlace de calcio ionizado.
IMIDA	Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
LAIB	Laboratorio Investigación Biomédica.
MB	Medio basal.
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido.
MEM	Medio mínimo esencial Eagle.
α-MEM	Medio mínimo esencial Eagle, modificación alfa.
β-MHC	Cadena pesada de la β -miosina.



MTT	Metil-tiazol-tretazolio.
NeuN	Proteína nuclear neural específica.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
OMLP-PCs	Células madre procedentes de la lámina propia de la mucosa oral.
OMSCs	Células madre procedentes de la médula ósea de la mandíbula.
OPN	Osteopontina.
PBS	Tampón fosfato salino.
PDLSCs	Células madre procedentes de ligamento periodontal.
PL-MSCs	Células madre procedentes de tejido inflamatorio periapical de infecciones odontógenas.
PLG	Ácido láctico co-glicólido
P/S	Penicilina estreptomina
SBF	Suero bovino fetal.
SCAPs	Células madre procedentes de la papila apical.
SHEDs	Células madre procedentes de dientes deciduos.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular.





LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía dental.

Figura 2. Modelo de diferenciación de células madre en el caso de linaje neural.

Figura 3. Localización de las células madre en la cavidad oral

Figura 4. Capullo de *Bombix mori* (izquierda). Disposición de las proteínas fibroína y sericina en las fibras producidas por *Bombyx Mori* (derecha).

Figura 5. Proceso de regeneración. (Tomada de Kerstin M. et al 2014)

Figura 6. Cabina de seguridad biológica vertical tipo II.

Figura 7. Centrífuga

Figura 8. Recuento con cámara de Neubauer o hemocitómetro.

Figura 9. Incubador para cultivos celulares

Figura 10. Ilustración de parte del procesado de la seda: Fibroína desgomada (10A), disolución en LiBr 9,3M (10B) y diálisis para eliminar sales (10C).

Figura 11. Elaboración de *scaffolds* 3D de fibroína de seda. Desmoldado de los *scaffolds* (11A), lavado de la sal utilizada como porógeno (11B) y aspecto macroscópico del *scaffold* 3D (11C).

Figura 12. Muestra llevada al punto crítico

Figura 13. Muestra recubierta con oro.

Figura 14. Microscopio electrónico de barrido Jeol 6100.

Figura 15. SHEDs a las 24 horas de cultivo (15A), colonias de células de tipo fibroblástico a las 48h (15B) y confluencia de las células en un 80% a las 168h (15C).

Figura 16. SHEDs a las 24 horas sobre el *scaffold* de fibroína de seda

Figura 17. SHEDs a las 72 horas sobre el *scaffold* de fibroína de seda.

Figura 18. SHEDs a las 168 horas sobre el *scaffold* de fibroína de seda.

Figura 19. Muestra control

Figura 20. Pocillos tratados con resazurina

Figura 21. Pocillos tratados con resazurina. Scaffold sin sembrar (control negativo), scaffold con células, pocillo sin células (blanco), pocillo con células (control positivo)



Figura 22. Expresión de marcadores CD73 (22A), CD90 (22B), CD105 (22C), CD45/CD34/CD14/CD20 (22D) a las 24 horas de siembra.

Figura 23. Expresión de marcadores CD73 (23A), CD90 (23B), CD105 (23C), CD45/CD34/CD14/CD20 (23D) a las 72 horas de siembra.

Figura 24. Expresión de marcadores CD73 (24A), CD90 (24B), CD105 (24C), CD45/CD34/CD14/CD20 (24D) a las 168 horas de siembra.

Figura 25. Análisis anexina a las 24h (25A), análisis anexina a las 72h (25B), análisis anexina a las 168h (25C).





LISTA DE GRÁFICOS Y TABLAS



Gráfico 1. Alamar Blue SHEDS.

Tabla 1. Análisis fluorimetría Alamar Blue SHEDS.

Tabla 2. Diferencias significativas a las 24h según análisis t de Student.

Tabla 3. Diferencias significativas a las 48h según análisis t de Student.

Tabla 4. Diferencias significativas a las 72h según análisis t de Student.

Tabla 5. Diferencias significativas a las 168h según análisis t de Student.

Tabla 6. Resumen de estudios con células madre dentales con objetivo de reparación/regeneración dental.

Tabla 7. Resumen de estudios de Ingeniería Tisular Odontológica.





INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANATOMÍA DENTAL

El diente para su estudio se puede diferenciar en dos partes: corona clínica y corona anatómica. La corona clínica es la porción visible del diente que va desde el borde terminal de la encía hasta el borde incisal o cara oclusal y es variable; mientras que la corona anatómica va desde el borde incisal o cara oclusal hasta la unión del esmalte con el cemento y es invariable, establecido su final por la línea cervical (1). La línea cervical es el sitio de unión entre la corona y la raíz, que también conocemos como cuello; siendo la raíz es la parte del diente que se aloja en el alveolo (1).

El diente está formado por tres tejidos calcificados: esmalte, dentina y cemento, los cuales rodean a una zona central formada por tejido conjuntivo denominada pulpa (Fig. 1).

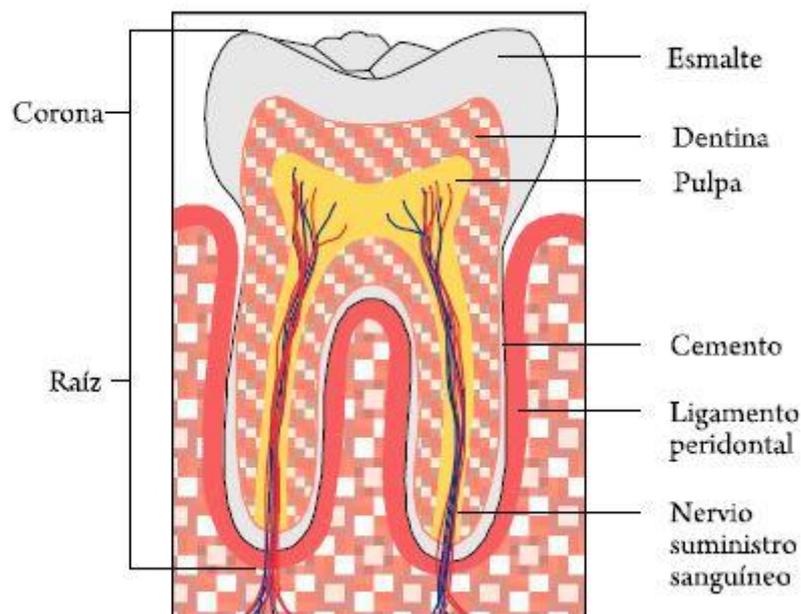


Figura 1. Anatomía dental. (Tomado de la tesis *Aislamiento, caracterización y plasticidad de las células madre de pulpa dental* de Francisco Javier Rodríguez Lozano)

El esmalte es la capa más externa situada en la porción de la corona anatómica del diente rodeando a la dentina (Fig. 1). Queda unida al complejo dentino-pulpar en la unión amelocementaria. Está compuesta por hidroxapatita (calcio en forma de fosfatos), siendo material inorgánico (calcio y fósforo son los principales elementos inorgánicos, además de aluminio, bario...) en un 96%, además de materia orgánica



(fundamentalmente proteínas como la albúmina) en un 1% y agua el 3%. Se trata del tejido mineral más duro del cuerpo humano gracias a su contenido inorgánico. Es translúcido, blanco o grisáceo, no siendo él quien proporciona el color al diente, sino la dentina (1).

La dentina es el tejido más abundante del diente, en la corona se encuentra cubierto por el esmalte y en la raíz por el cemento (Fig. 1). Es el encargado de proporcionar la forma y rigidez necesaria para llevar a cabo su función. Tiene un color amarillento pálido, siendo el responsable del color dada la translucidez del esmalte. Está compuesto en un 70% por material inorgánico (hidroxiapatita), 20% orgánico (colágeno) y 10% de agua.

El cemento cubre la dentina desde el cuello hasta el ápice (Fig. 1). Se trata de un tejido avascular y carente de inervación. Se halla unido en su superficie interna a la dentina, mientras que en su superficie externa se une a las fibras de colágeno del ligamento periodontal. Está compuesto en un 65% por material inorgánico (hidroxiapatita), un 23% de material orgánico (colágeno tipo I) y un 12% de agua (1).

Estos tejidos duros se encargan de proteger a la pulpa. La pulpa es un tejido conjuntivo laxo que ocupa tanto la cámara pulpar en la corona como los conductos radiculares en las raíces (Fig. 1). La pulpa se encuentra compuesta por:

- Células (1)
 - Odontoblastos: situados en la zona más periférica de la pulpa con prolongaciones que se alojan en la dentina. Son células que no se dividen una vez diferenciadas y se cree que su longevidad coincide con la del diente. Sin embargo, ante determinados estímulos, el diente responde creando nuevo tejido dentinario, lo que implicaría nuevos odontoblastos, suponiendo que son las células mesenquimáticas indiferenciadas, las que se diferencian cuando es necesario.
 - Fibroblastos: son las células más abundantes. Forman y mantienen la matriz pulpar junto al colágeno y la sustancia fundamental. Son los responsables de la síntesis, recambio y degradación del colágeno.
 - Células mesenquimáticas indiferenciadas: son células a partir de las cuales se diferencian otras células conjuntivas de la pulpa. Se encuentran en el área central de ésta, cerca de los vasos sanguíneos.



- **Macrófagos:** se encuentran en el centro de la pulpa, alrededor de los vasos sanguíneos.
- **Linfocitos:** células de defensa productoras de anticuerpos que participan en la inmunidad celular.
- **Sustancia fundamental:** compuesto por proteoglicanos, condroitín sulfato, queratín sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico. Se encarga de soportarlos componentes celulares y ser medio de transporte de nutrientes desde los vasos a las células (1).
- **Fibras:** son fundamentalmente de colágeno tipo I y III, ubicándose la mayor concentración del mismo en la zona apical. También existe presencia de fibronectina y fibras reticulares en la pulpa de dientes jóvenes (1).
- **Irrigación sanguínea y linfática:** los vasos sanguíneos entran y salen a través de los forámenes apicales. Suelen ser una o dos arteriolas que aumentan su luz al llegar a la pulpa y emiten vasos colaterales que se ramifican formando una red capilar extensa. El sistema eferente está formado por vénulas con diámetro similar a las arteriolas pero con paredes más delgadas. Los vasos linfáticos se originan en la región coronaria y tienen zonas abiertas en sus paredes (1).
- **Inervación:** entran a través de los nervios de los vasos arteriales por el foramen apical principal. Son aferencias sensoriales del trigémino y ramas simpáticas del ganglio cervical superior (1).

1.2 CÉLULAS MADRE

Las células madre (CMs) son células indiferenciadas que presentan alta capacidad clonogénica, de autorenovación y pueden diferenciarse en múltiples linajes celulares, incluyendo osteoblastos, adipocitos, condrocitos... (2-6).

Encontramos diferentes tipos CMs, dependiendo de su origen, grado de diferenciación o tejido en el que se encuentren (Fig. 2) (2,7):

- Células madre totipotentes: son capaces de generar 200 tipos de tejido humano además de tejidos extraembrionarios.
- Células madre pluripotentes: pueden generar cualquier estirpe del embrión, aunque no extraembrionaria.

- Células madre multipotentes: sólo pueden generar un subconjunto de tipos celulares.
- Células madre oligopotentes: cuando el subconjunto de tipos celulares que pueden generar es más reducido.
- Células madre unipotentes: si sólo generan un tipo celular. (2,7)

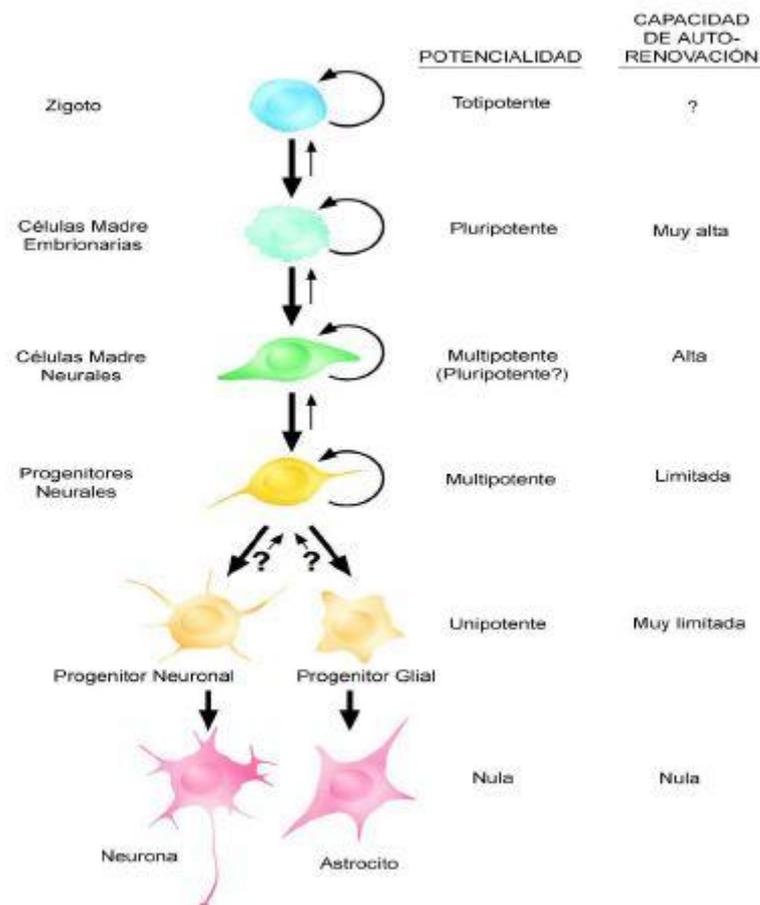


Figura 2. Modelo de diferenciación de células madre en el caso de linaje neural (Tomado de Weismann IL, 2000)

1.2.1 Células madre mesenquimales

Estas células se encuentran en la médula ósea, son llamadas células madre mesenquimales (CMMs) o mesenchymal stem cells (MSCs). Presentan aspecto fibroblástico y características de células madre. Tienen capacidad de autorenovación, proliferación y capacidad de diferenciación a varias líneas de tejido mesodérmico (8).

1.2.2 Células madre derivadas de tejidos orofaciales

Encontramos células madre dentro de boca (Fig. 3):

- Células madre procedentes del ligamento periodontal (PDLSCs)
- Células madre procedentes del folículo dental (DFSCs)
- Células madre procedentes de la papila apical (SCAPs)
- Células madre procedentes del tejido gingival (GMSCs)
- Células madre procedentes del tejido inflamatorio periapical procedente de infecciones odontógenas (PL-MSCs)
- Células madre procedentes de la lámina propia mucosa oral (OMLP-PCs)
- Células madre procedentes de médula ósea de mandíbula (OMSCs)
- Células madre procedentes de pulpa dental (DPSCs)
- Células madre procedentes de dientes deciduos (SHEDs) (9-14)

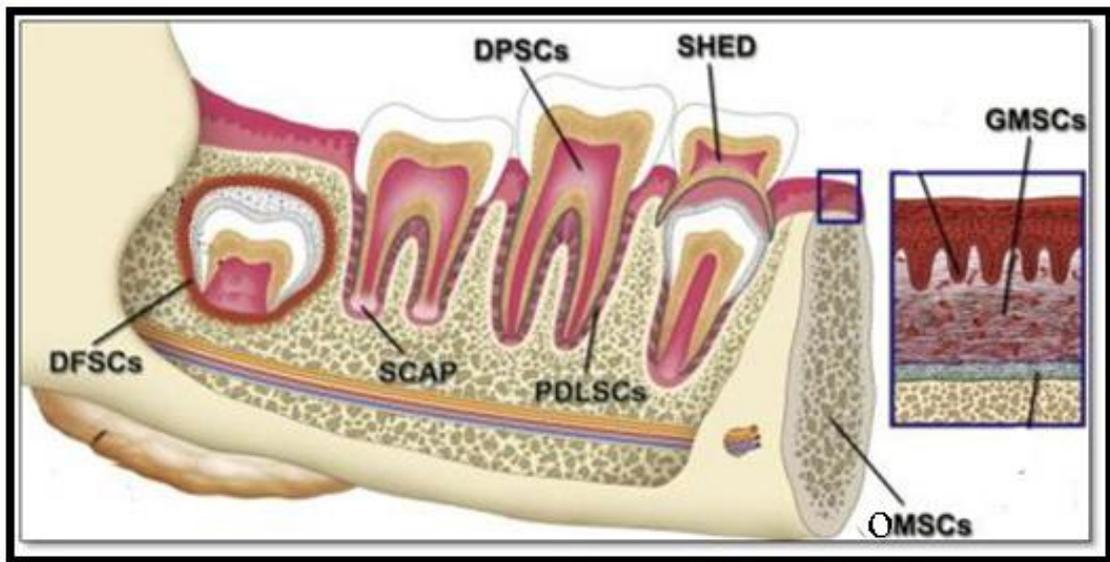


Figura 3. Localización de las células madre en la cavidad oral. (Tomado de la tesis *Aislamiento, caracterización y plasticidad de las células madre de pulpa dental* de Francisco Javier Rodríguez Lozano)

A. Células madre procedentes del ligamento periodontal (PDLSCs)

El ligamento periodontal, uno de los tejidos conectivos más complejos y especializados del cuerpo humano se encuentra entre el cemento y la pared interna del hueso alveolar (15). Se ha demostrado que no sirve únicamente de soporte a los dientes, sino que



también es capaz de contribuir a la nutrición de los dientes, a la homeostasis y a la regeneración del tejido periodontal (16). En el ligamento periodontal se encuentran unas células mesenquimales indiferenciadas (PDLSCs) que fueron descritas (11) como “células con alta capacidad clonogénica, con alta proliferación y con capacidad de regenerar tejido periodontal”. Se ha visto que las PDLSCs pueden ser obtenidas del ligamento periodontal después de su separación, por ejemplo en terceros molares extraídos (15).

Experimentos *in vivo* demuestran que son capaces tanto de diferenciarse de cementoblastos funcionales como de producir cemento cuando son trasplantados en la superficie dorsal de ratones inmunodeprimidos (11). Se ha comprobado que contribuyen a la reparación del tejido periodontal gracias a un estudio realizado con PDLSCs, trasplantadas en defectos periodontales inducidos en el área molar de mandíbulas de ratas inmunodeprimidas donde se vio que tenían un rol funcional en la regeneración de tejido periodontal (11, 17-19).

El potencial osteogénico se ha demostrado a través de su capacidad para formar una matriz mineralizada con depósitos de calcio 14 días después de estar expuestos a medios inductores de diferenciación osteogénica (20). Otro trabajo demostró que son capaces de diferenciarse las PDLSCs en células productoras de insulina, lo que implica que estas células también podrían ser capaces de generar células del linaje endodérmico (21). A su vez se comprobó con experimentos *in vitro* que presentan los marcadores celulares CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146 y CD166 (22) presentando la habilidad de diferenciarse a linajes odontoblástico, osteoblástico, adipogénico y condrogénico (23).

B. Células madre procedentes del folículo dental (DFSCs)

El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea al germen de los dientes no erupcionados y contiene células madre de origen mesenquimal (DFSCs) (24). El folículo dental es quien dará lugar al ligamento periodontal y a células con capacidad de diferenciarse a odontoblastos, cementoblastos y osteoblastos (24, 25); se cree que las células madre del folículo dental que se encuentran más cerca de la raíz se diferencian formando cementoblastos, mientras que las células madre más cercanas al hueso alveolar se diferencian a osteoblastos (15). Su función biológica principal es la



coordinación de la erupción de los dientes a través de la regulación de los procesos de la osteoclastogénesis y la osteogénesis (15, 26). Fueron identificadas por primera vez por Morsczeck y col., en la zona del folículo de terceros molares impactados utilizando el mismo protocolo que Gronthos realizó para descubrir las células madre procedentes de pulpa dental (DPSCs) (15, 24). Para el aislamiento de las DFSCs los folículos dentales se separan del diente, se separan mecánicamente y se colocan en una solución enzimática (24). La obtención de las DFPCs sólo puede ser realizada en pacientes con dientes sin erupcionar como el tercer molar (27).

Estudios *in vivo* demuestran que son capaces de expresar la proteína osteocalcina y sialoproteína ósea al mes de ser trasplantadas en un ratón inmunodeprimido, pero no en forma de hueso o cemento. Otros estudios realizados *in vitro*, demuestran su diferenciación a osteoblastos, cementoblastos, adipocitos y neuronas (28-34). Estudios *in vitro* han demostrado que presentan marcadores celulares específicos como CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD53, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 y CD271 (22). Y no expresan los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, CD117 y HLA-DR (27, 29, 36-38).

Para comprobar la población heterogénea de células en el folículo dental se realizó un estudio con tres líneas celulares a partir de DFPCs de ratones (29). Los resultados obtenidos demostraron que existían diferencias significativas entre las tres líneas celulares derivadas del folículo dental en relación a la tasa de proliferación, los patrones de distribución del ciclo celular, y marcadores de superficie celular. La primera línea celular tenía una alta actividad de proliferación pero no mostraba ninguna actividad de mineralización, lo que sugiere que podría estar relacionado con un linaje de tipo ligamento periodontal. La segunda línea fue similar a la primera con respecto a la proliferación potencial, pero la alta actividad de ALP era indicativa de un estado altamente indiferenciado. La tercera línea celular exhibía características de mineralización, lo que indica que podría ser de estirpe osteoblástica del hueso alveolar o cementoblastica (15).

C. Células madre procedentes de la papila apical (SCAPs)

La papila apical es el tejido blando que se encuentra en el ápice de los dientes permanentes que se encuentran en desarrollo, que finalmente se convierte en el tejido de



la pulpa del diente maduro (12). La formación de la raíz comienza con la proliferación del epitelio apical del tercio cervical, la papila contribuye a la formación del diente y eventualmente se convierte en tejido pulpar y en una zona apical rica en células entre la papila apical y la pulpa (39). Sonoyama y col. fueron los primeros en aislar las SCAPs de la papila apical de terceros molares impactados en pacientes de 18-20 años en 2006 (12). SCAPs muestra un mayor grado de proliferación y mineralización potencial que las DPSCs y expresan marcadores de células madre típicos, incluyendo el STRO1, CD13, CD24, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 y además son negativas para CD18, CD34, CD45 y CD150 (40). Curiosamente, las SCAPs son capaces de expresar un marcador único, no detectable en otras células madre, el CD24 (14, 41). El aislamiento de las SCAPs se consigue mediante la separación suave de la papila apical de la raíz con el ápice inmaduro durante la extracción de terceros molares (15). La papila apical se tritura y se digiere con una solución enzimática para obtener las células en suspensión (14).

Las SCAPs son células con alta plasticidad, capaces de diferenciarse a odontoblastos, osteoblastos, adipocitos y condrocitos (12), además de diferenciación neural *in vitro* (12, 39, 41). 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. En un estudio realizado con minicerdos en los que se trasplantaron SCAPs y PDLSCs generaron un complejo de raíz periodontal capaz de soportar una corona de porcelana (12). Por lo que se puede concluir que las SCAPs tienen un alto potencial para su utilización en regeneración de pulpa/dentina, así como para endodoncia (12, 39, 42). Sin embargo, no ha podido ser identificada formación de cemento o hueso (22).

Se ha especulado que las SCAPs pueden ser la fuente de odontoblastos primarios responsables de la formación de la dentina radicular, mientras que es probable que las DPSCs sean fuente de los odontoblastos de recambio que formarían la dentina reparadora (43). Para poder jugar un papel funcionan *in vivo*, la raíz tiene que conectar con el ligamento periodontal. En estudios preliminares donde se utilizaron minicerdos, el co-trasplante de SCAPs y PDLSCs en HA/TCP producen la formación de dentina y ligamento periodontal respectivamente (12). Estos hallazgos sugieren que las SCAPs



junto con PDLSCs podrían ser usados para crear una raíz biológica que podría usarse de manera similar a un implante, limitando con una corona dental artificial (15).

Una característica interesante de las SCAPs es que expresan varios marcadores neuronales incluso cuando no se exponen a la estimulación neurogénica, lo que implica su posible origen de la cresta neural (41). Sin embargo, cuando son estimuladas, se expresan más marcadores neuronales como β III-tubulina, GFAP, GAD, nestina, NeuN, NFM, enolasa neuronal específicas (NSE), y CNPase (39). Teniendo en cuenta todas estas observaciones, las SCAPs parece ser más similar al embrionario de otras fuentes de DSC (44). En consecuencia, las SCAPs podrías tener potencial para aplicaciones no sólo en odontología, sino también en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y enfermedades isquémicas, así como en investigación de la diabetes, y otras aplicaciones en el campo de la medicina regenerativa (45).

D. Células madre procedentes del tejido gingival (GMSCs)

Denominadas en inglés como *gingival mesenchymal stem cells* (GMSCs) se trata de un tejido oral único alrededor del reborde alveolar y la región retromolar, que es reconocido como una barrera mucosa biológica (46). Una de las características más llamativas de la encía es su notable capacidad de regeneración y curación de la herida, que se caracteriza por una rápida reconstitución de la arquitectura del tejido y poca evidencia de formación de cicatrices, en contraste con la cicatriz común que se forma en la piel (47).

Histológicamente, la encía se compone de tres capas: una capa epitelial, una capa basal y una capa espinosa inferior que es similar a la dermis de la piel (15). Zhang y col. fueron los primeros en citar un aislamiento de GMSCs de la capa espinosa de encía humana en 2009 (14, 15). La principal ventaja de utilizar encía es la posibilidad de conseguir una gran cantidad de células madre sin la necesidad de sacrificar un diente de manera irreversible para obtener su pulpa, ligamento periodontal o folículo dental (15). Además el tejido gingival se puede obtener de procedimientos mínimamente invasivos en cualquier momento de la vida.

Para el aislamiento de GMSCs los tejidos gingivales se incuban con dispasa para separar la capa epitelial y la capa espinosa para ser después desmenuzados y digeridos enzimáticamente con colagenasa (14, 48). Otros métodos descritos para el aislamiento



de GMSCs implicó el uso de colagenasa y dispasa al mismo tiempo, seguido por la eliminación de la primera suspensión celular digerida para excluir células epiteliales y posterior incubaciones adicionales con la misma solución enzimática (49, 50). Las GMSCs fueron identificadas como células adherentes al plástico con morfología similar a fibroblastos (14). Presentan clonogenicidad, capacidad de auto renovación y pueden diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, condrocitos, células endoteliales y neurales (14, 51, 52). Además, diferentes estudios reportan que derivan en un 90% de células procedentes de cresta neural y en un 10% del mesodermo (53). Son capaces de expresar los marcadores SSEA-4, Oct-4, STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, pero no expresan CD34, CD45 y HLA-DR (14, 54, 55). Curiosamente, las GMSCs han demostrado tener propiedades inmunomoduladores, en particular inhiben la proliferación de linfocitos y expresan una amplia gama de factores inmunosupresores, tales como la interleuquina 10 (IL-10), inducible NO sintasa (iNOS), y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en respuesta a la citocina inflamatoria interferón (14).

Estudios *in vivo* donde GMSCs fueron trasplantadas con gel de fibroína en ratones inmunocomprometidos demostraron que las GMSCs regeneraban tejido conectivo similar, incluyendo la presencia de fibroblastos y fibras de colágeno. Por lo que se concluyó que las GMSCs tienen una potente capacidad de auto renovación *in vivo* (14, 54).

E. Células madre procedentes del tejido inflamatorio periapical (PL-MSCs)

Las células madre mesenquimales de tejido inflamatorio periapical son células procedentes de infecciones odontógenas (PL-MSCs) que presentan capacidad de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condrocitos *in vitro*. *In vivo* se ha demostrado que son capaces de formar tejido mineralizado en ratas inmunocomprometidas (56, 57).

F. Células madre procedentes de la lámina propia de la mucosa oral (OMLP-PCs)

Se trata de un tejido único alrededor de los puentes alveolares y la región retromolar que es conocido como una barrera biológica mucosa (22). Fueron denominadas OMLP-PCs. Son capaces de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos, células del endodermo y células neurales (neuronas y células de Schwann) (58, 59). Parecen mostrar



clonogenicidad, capacidad de autorenovación, así como diferenciación multipotente (22).

G. Células madre procedentes de la médula ósea de mandíbula (OMSCs)

Llamadas OMSCs tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos en presencia de un medio inductor. Se demostró que expresan los marcadores: CD73, CD105, CD106, SSEA-4 y Oct-4 aunque no expresan los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45. En un estudio comparando OMSCs con células mesenquimales de médula ósea de huesos largos (BMMSCs) presentaron las primeras una mayor tasa de proliferación y de unidades formadoras de colonias (13).

H. Células madre procedentes de pulpa dental (DPSCs)

En el año 2000 el grupo de Songtao Shi (10) consiguió aislar células madre de la pulpa dental, que fueron extraídas de terceros molares de humanos, demostraron alta capacidad clonogénica y se diferenciaron hacia odontoblastos, capaces de formar el complejo dentinopulpar que se implantaron en ratas inmunocomprometidas. En este estudio se comprobó que tenían un porcentaje de proliferación mayor que las células madre de médula ósea (9).

Las células madre procedentes de la pulpa dental (DPSCs) son capaces de diferenciarse a osteoblastos aumentando el porcentaje de suero presente en el medio de cultivo, sin la necesidad de adición de otros componentes (60-64). Estas células trasplantadas *in vivo* forman un complejo dentinario similar al del diente tras cinco semanas. La obtención de células madre procedentes de pulpa dental es una práctica sencilla, ya que podemos obtenerla de los terceros molares que suelen ser extraídos y tirados (15). Para realizar la obtención de la pulpa basta con cortar y separar el cemento del esmalte y después separar suavemente la pulpa de la corona y la raíz. Los marcadores celulares específicos que presentan son: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 (15), siendo negativos para: CD14, CD34, CD45 y HLA-DR (36, 43).

Además las células madre de la pulpa dental son:

- Capaces de producir reparación cardiomiogénica de forma similar a las células madre procedentes de la médula ósea y tejido adiposo (65, 66). DPSCs cocultivadas junto a células cardiomiogénicas procedentes del corazón de ratas



neonatales, fueron capaces de expresar altos niveles de marcadores cardíacos como Troponina I, β -MHC y ANP tras cuatro semanas de cultivo. Cuando se realizó el trasplante de DPSCs en ratas inmunodeprimidas a las que se les había provocado un infarto de miocardio, éstas mejoraron la función cardíaca, aumentaron el número de vesículas cardíacas y redujeron la zona infartada (67).

- Favorecen la respuesta endógena neural. Esta evidencia quedó demostrada en un estudio en el que células de la pulpa dental procedentes de monos se inyectaron en el hipocampo de ratones inmunodeprimidos. La bromodeuxiuridina (que se utiliza para evaluar la respuesta endógena neural) aumentó al quinto día en el hemisferio de la inyección. Entre el día 7-30 se observó un aumento de Nestina, β -III tubulina, GFAP e Iba1 en la zona de inyección. A su vez se produjo un aumento de factores neutróficos como CNTF, VEGF, FGF-2 y NGF (65). Además, debido a su origen embrionario, las DPSCs tienen la capacidad de diferenciarse a neuronas, glía y oligodendrocitos (68, 69). Cuando son cultivadas en un medio de inducción neural adecuado para neuronas, se provoca un cambio de morfología y aumenta la expresión de marcadores neurales como β -III tubulina, GAD y NeuN, además de ser capaces de sobrevivir en el hipocampo de un ratón durante más de 10 días y seguir expresando marcadores neurales (9).
- Son capaces de regenerar el complejo dentino-pulpar. Cuando existe agresión al diente estas células son capaces de diferenciarse a odontoblastos para formar dentina terciaria. Estudios *in vivo* (41) demuestran que tras cinco semanas trasplantadas podemos observar un complejo dentinario similar al del diente. No están claros los factores implicados en la diferenciación odontoblástica, aun así se cree que BMP-2 es uno de los que favorece la aparición de marcadores como la sialoproteína dentinaria, la cual es clave en la formación de dentina.

I. Células madre procedentes de dientes deciduos (SHEDs)

Los dientes deciduos son conocidos coloquialmente como dientes de leche. A los seis meses de vida comienza la erupción y se cambian de los 6 a los 13 años. Los restos de la corona exfoliada contienen tejido conectivo, vasos sanguíneos y odontoblastos. Miura y col. fueron los primeros en identificar en 2003 las células madre procedentes de dientes deciduos (SHEDs) (15). Las células madre de la pulpa a partir de dientes deciduos (SHEDs) presentan una mayor plasticidad que las de la pulpa de los dientes



permanentes; se diferencian de las DPSCs por su alta capacidad de proliferación, aumentando el número de población celular en el doble, así como la habilidad de formar “colonias celulares”. Presentan diferentes marcadores de superficie como el CD13, CD29, CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD146 y CD166 (15, 70) siendo negativos para: CD14, CD34, CD45 y HLA-DR (71). Son capaces de diferenciarse hacia un linaje odontogénico, osteoblástico, adiposo, neural, miogénico y condrogénico (9, 15).

Se ha comprobado que *in vivo* son capaces de formar hueso, regenerar dentina y producir tejido pulpar, lo que sugiere podrían ser una buena fuente celular para generación de hueso orofacial y tejido pulpar (72-75). En otros estudios *in vivo* se vio que eran capaces de regenerar con eficacia la pérdida de tejido duro y tejido blando provocado por la periodontitis (76). A su vez, *in vivo*, se ha comprobado que producen tejido dentinario y son capaces de restaurar los defectos de la cámara pulpar (74, 75).

Además las SHEDs pueden inducir la formación de nuevo hueso reclutando *in vivo* células osteogénicas (9). Este descubrimiento implica que los dientes deciduos no proveen únicamente una guía para la erupción del diente permanente como se asume generalmente, sino que también están relacionados con la inducción de formación de hueso durante la erupción del diente permanente (9).

Todas estas observaciones sugieren que los dientes de leche podrían representar una fuente ideal de células madre para la reparación de estructuras de dientes dañados, induciendo la regeneración ósea, y posiblemente, el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (15).

1.3 FIBROÍNA

Investigaciones realizadas en los años 80 ayudaron a descubrir que *Bombyx mori*, conocido coloquialmente como gusano de seda, era capaz de generar una serie de productos naturales: seda del capullo y la crisálida de su interior. La seda está compuesta por sericina y fibroína, la cual presenta una importante aplicación como biomaterial (77).

La fibroína es una proteína de carácter fibroso, la cual forma un polímero lineal que constituye el núcleo de la fibra y supone el 70% del peso del capullo. La fibra de fibroína está recubierta exteriormente por otra proteína llamada sericina (Fig. 4), que

presenta una conformación globular y propiedades adhesivas, siendo ésta la que permite que se conforme en forma de estructura sólida, hueca y resistente mecánicamente (78).

La fibroína está compuesta por: una cadena pesada de 390 kDa y una cadena ligera de 26 kDa en una proporción 1:1 unidas por un puente de disulfuro. Siendo los aminoácidos predominantes en la composición de la fibroína: glicina (43%), alanina (30%), serina (12%) y otros (15%) (79).



Figura 4. Capullo de *Bombyx mori* (izquierda). Disposición de las proteínas fibroína y sericina en las fibras producidas por *B. Mori* (derecha). (Tomado de la página web “Fibroína di seta” <http://www.fibroinadiseta.it/cose-fibroina-seta/>)

Por otro lado, encontramos las sericinas que tienen un peso de 20-310 kDa. Éstas integran una familia de proteínas hidrofílicas que son las encargadas de recubrir las fibras de fibroína (80), de esta forma actúan a modo de pegamento permitiendo que las fibras formen una estructura sólida, mecánicamente resistente y hueca, conocida comúnmente como capullo (Fig. 4).

Antes de ser segregada por *Bombyx mori*, la fibroína es producida por las células que cubren la parte interior de las secciones distal y medial de la glándula sericígena. En el interior de la glándula la fibroína se encuentra en un estado soluble y micelar, con un contenido en agua del 30%, denominándose Seda I (81). Cuando el insecto comienza a depositar la seda para fabricar el capullo, la fibroína va avanzando a través de la glándula sericígena y en su parte final se queda recubierta por la sericina. El proceso de secreción del hilo hace que vaya perdiendo agua y aumentando la tensión mecánica (gracias al movimiento de la cabeza de la larva). Al producirse esta pérdida de agua y aumento de tensión, se produce un cambio en la solución metaestable de la fibroína glomerular, que pasa a ser una estructura secundaria en lámina beta, llamada seda II (82).



La fibroína disuelta en agua es la base para la fabricación de la mayoría de los biomateriales. Para su conservación se elimina el agua mediante liofilización, obteniéndose una “fibroína regenerada” que mantiene las propiedades de solubilidad, además puede disolverse en agua y otros disolventes tales como el ácido fórmico y el hexafluoroisopropanol (HFIP) que son incapaces de disolver la fibroína nativa. La fibroína regenerada presenta menor resistencia mecánica que la fibroína nativa ya que los enlaces que forman la estructura en lámina beta se rompen en el proceso de disolución. Debido a esto, los materiales basados en fibroína regenerada han de ser sometidos a un tratamiento capaz de incrementar el contenido en estructura de lámina beta para insolubilizarlos e incrementar su resistencia, procedimiento conocido como “cristalización” (82). Suele realizarse sumergiendo el material en una solución de metanol aunque éste hace que el material sea más quebradizo. Otra opción es exponer el material a vapores de metanol en caliente o con vapor de agua al vacío. El porcentaje de lámina beta en este caso será menor, por lo que habrá una menor resistencia mecánica pero las propiedades en términos de elasticidad, transparencia y biocompatibilidad serán mejores (83).

1.3.1. Propiedades de la fibroína de seda como biomaterial

A. Biocompatibilidad

La característica más importante en un biomaterial es la biocompatibilidad, ya que su importancia reside en no desencadenar ningún tipo de reacción inflamatoria pues anularía su función. La seda ha sido utilizada desde hace años como material de sutura y en algunos casos se pudo observar la aparición de reacciones inflamatorias en la zona donde se realizaban los puntos (78). No obstante, se ha podido comprobar en estudios realizados que esta inflamación es producida por la sericina y que la fibroína en sí no produce ningún tipo de inflamación (83).

B. Propiedades mecánicas

Encontramos una alta resistencia a la rotura y al alargamiento, por lo que su tenacidad y ductilidad es buena (84). Además, hay estudios que han comprobado que las curvas de tensión-deformación de las fibras de los gusanos de seda tienen un aspecto y endurecimiento similar a la seda de las telas de araña (85). Por sus propiedades



mecánicas tan buenas presenta tanta importancia en el estudio de ingeniería de tejidos para el desarrollo de *scaffolds*.

C. Biodegradación

Cuando hablamos de biodegradación nos referimos a la eliminación total del material a través de la filtración y metabolización de los bioproductos degradados (86). Existen estudios *in vivo* que han demostrado que los *scaffolds* de seda se desintegran tras unas semanas y desaparecen completamente en un año, teniendo el sistema inmunitario un importante papel en su degradación, con una respuesta mediada por macrófagos, por lo que se concluye, que además de ser biodegradable también se trata de un material absorbible (87).

D. Funcionalización de la superficie

Los aminoácidos que presenta la fibroína en su superficie condicionan el enlace químico que puede establecerse, encontramos 12.1% de Ser, 5.3% de Tyr, además de Thr, Glu y Asp, que pueden ser modificados (88). Al producirse la unión de los materiales se producen procesos de activación de cascadas bioquímicas completas regulatorias de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (88).

1.3.2 Usos médicos regenerativos

La fibroína es utilizada en biomedicina sobre todo como biomaterial para la fabricación de armazones para el crecimiento celular, denominados *scaffolds*. A su vez también es adecuada para aplicación directa en solución acuosa, como componente terapéutico tanto en cicatrización, como en diabetes (78).

Se demostró que la fibroína en un medio de cultivo en la proporción de 125 $\mu\text{g/ml}$ fue capaz de producir un incremento de la proliferación de fibroblastos de la piel del 150% frente al caso control sin fibroína (89). También se ha verificado que la fibroína en polvo en heridas cutáneas a nivel histológico presenta una mejora significativa de la cicatrización, una mayor reepitalización y formación de colágeno y fibras elásticas (90), además de no existir citotoxicidad en los puntos de inyección, lo que demostraba su correcta biocompatibilidad (90). Gracias a este efecto cicatrizante, se han desarrollado diversos biomateriales como films, esponjas o mallas específicamente creadas para tratar problemas de cicatrización (91-94).



Tras fraccionar la fibroína en péptidos mediante digestión con quimiotripsina (95) se determinó la existencia de dos secuencias situadas en la región N-terminal de la molécula que parecen ser activas en la inducción del crecimiento de nuevos fibroblastos: VITTDSDGNE y NINDFDED. También se demostró que la fibroína en solución acuosa (y también la sericina) inducían la expresión y la fosforilación de la proteína c-Jun, que está implicada en la migración de los queratinocitos en el proceso de cierre de heridas cutáneas (96). De esta forma, se deduce que las proteínas de la seda tienen un efecto de señalización en el programa de cicatrización cutánea.

1.4 REGENERACIÓN Y REPARACIÓN

1.4.1 PULPA

Una pulpa dental sana debe cumplir varias funciones: función de nocicepción como advertencia para indicar daños (97), una adecuada respuesta inmunológica y por último la capacidad de formar dentina como mecanismo de defensa contra invasión de toxinas y bacterias (98-100); además en el caso de dientes inmaduros, ser capaz de favorecer la finalización de la formación radicular (101). La irritación causada por caries o trauma provoca una respuesta inflamatoria del tejido que se llama pulpitis, la cual en algunos casos puede ser reversible y la curación es posible.

Incluso después de una exposición pulpar, cuando se pierde la capa de odontoblastos, una barrera de dentina reparadora se puede formar en 2-6 semanas (102, 103), debido a que células de la pulpa migran hacia el sitio de la lesión, se diferencian a odontoblastos y comienzan a establecer una matriz de colágeno que más tarde se mineraliza (104, 105).

Este fenómeno, ha evidenciado la existencia de células indiferenciadas o “stem” presentes en el tejido pulpar y que son capaces de esta función de diferenciación y formación de tejido dentario, las conocidas como células madre de pulpa dental (DPSCs) (10).

Sin tratamiento inmediato y con el aumento del estímulo, la inflamación puede progresar hasta un estado irreversible (104). Ante esta situación el tratamiento



convencional consiste en la remoción del tejido pulpar también llamado endodoncia, sin tener en cuenta que la pulpa puede poseer capacidad regenerativa (104).

1.4.2 REPARACIÓN

En situaciones de una caries muy extensa con la pulpa afectada pero vital y sin pérdida de función, está indicado realizar una protección pulpar para intentar mantener la vitalidad del diente (106, 107). Si hay buenas condiciones se pueden conseguir buenos resultados y motiva a los clínicos a mantener la vitalidad pulpar el mayor tiempo posible por las ventajas que proporciona prolongar la vitalidad de esta (106).

Se debe diferenciar entre la regeneración del complejo dentino-pulpar y la reparación de la pulpa dental (106). Cuando se realiza reparación, no se va a crear dentina nueva, sin embargo se observa un tejido similar a la dentina secundaria, pero no es realmente el mismo, ya que no forma una continuidad con la dentina preexistente. Aunque, debido a la falta de verdaderos marcadores moleculares específicos de los tejidos recién secretados, una nueva generación de células se está denominando con el término “similares a” (por ejemplo: células similares a odontoblastos). De esta forma es posible diferenciar entre tejido normal y tejido reparado (106).

Cuando se realiza un recubrimiento pulpar directo, la certeza del tipo de estructura y ultraestructura del tejido remineralizado producido que ha sido creado es incierta, por lo que sería prudente llamar a esta cicatrización producida terapéuticamente como reparación en lugar de regeneración (106).

1.4.3 REGENERACIÓN

Actualmente, cuando la pulpa tiene mucha inflamación o está necrótica es imposible mantenerla, es entonces cuando el odontólogo debe realizar una pulpectomía para desinfectar el sistema de conductos y proporcionar a las raíces una obturación que evite una nueva contaminación bacteriana. Aunque las técnicas de tratamiento de conductos actuales proporcionan resultados fiables, parece que la formación de pulpa o tejido conectivo dentro de las raíces podría ser una alternativa más eficaz que el tratamiento endodóntico (106, 108), ya que se conseguiría mantener la vitalidad del tejido (108). La presencia de pulpa vital en cualquier diente es preferible biológicamente en



comparación con un material de relleno, ya que podría mantener la respuesta inmune ante una agresión y regenerar cualquier dentina que hiciera falta (100).

A su vez, también existen procesos de regeneración en casos en los que no hay infección de la pulpa, cuando se ha producido una avulsión del diente, una luxación intrusiva o extrusiva, donde los dientes se monitorizan para ver si se produce una revascularización espontánea (109-112). De esta forma, mediante una intervención mínimamente invasiva se controla que el diente no se vuelva necrótico. El pronóstico de revascularización y formación de la raíz en estos casos varía de un 33% a un 100% (100).

Los primeros intentos para llevar a cabo la revascularización de un conducto radicular se realizaron en 1960 (113). Uno de los principales problemas fue que la única fuente local posible de células viables debería surgir mediante la inducción de hemorragia en el espacio del conducto radicular, por lo que las células no tendrían origen pulpar, sino periodontal, de cemento o de hueso alveolar. En 2001 se volvió a prestar atención al concepto de revascularización, y fue entonces cuando se empezó a diferenciar entre procesos de reparación y procesos de regeneración (114).

Se ha propuesto que para conseguir la regeneración se puede obtener las células madre de la papila apical a través de una lima de endodoncia pinchando en el conducto y así conseguir la formación de un coágulo de sangre (106, 108, 115). Para comprobar si la regeneración se ha producido, las pruebas de vitalidad son muy subjetivas, sin embargo la evidencia radiológica es más objetiva y los resultados son demostrables (106).

La observación de que la dentina es un depósito de señales morfogénicas bioactivas que pueden ser reclutados a demanda (116) constituye un importante descubrimiento en el campo de la regeneración de los tejidos de la pulpa dental. Representa un cambio importante, ya que la dentina es una fuente morfogenética que permite y orienta los procesos regenerativos y la reparación de los tejidos, en vez de ser simplemente un tejido inerte y pasivo. Varias líneas de investigación han demostrado que las proteínas derivadas de la dentina son suficientes para la diferenciación odontoblástica (117-119). En particular, la degradación intencionada de las proteínas derivadas de la dentina con hipoclorito de sodio elimina su potencial inductivo (118). Este hallazgo, corrobora observaciones anteriores del papel crítico de las señales morfogénicas en la



diferenciación odontoblástica y se plantea la posibilidad de que el hipoclorito de sodio podría no ser la solución ideal para la irrigación del conducto radicular en endodoncia regenerativa, ya que aunque produce acción bactericida, capacidad de disolución del tejido y eficaz lubricación (120), se ha demostrado que la dentina acondicionada con hipoclorito impide la diferenciación de las DPSCs en células similares a odontoblastos, tanto *in vitro* como *in vivo* (118), lo que sugiere que tiene efectos directos e indirectos sobre la toxicidad de células madre (120). Además, un estudio evaluó la supervivencia de las SCAPs y se concluyó que había una mayor supervivencia cuando la irrigación se había realizado con EDTA que con hipoclorito de sodio, teniendo un efecto perjudicial en su supervivencia (120), es por eso que el hipoclorito de sodio para este tipo de tratamientos está contraindicado ya que puede tener un efecto negativo significativo en los resultados del tratamiento (100, 108, 121, 122)

Por otro lado, los factores de crecimiento pueden ser obtenidos de la irrigación con EDTA del conducto, ya que permite la preservación de la estructura dentinaria y provoca la liberación y exposición de los factores de crecimientos y moléculas bioactivas (108, 121, 123-125), como por ejemplo factor de crecimiento fibroblástico 2 (bFGF), factor de crecimiento beta 1 (TGF- β), proteínas morfogénicas óseas (BMPs), etc. (120, 124, 126, 127). Estos factores favorecen la atracción quimiotáctica de las células madre y son eficientes a baja concentración, promoviendo tanto la migración, como la angiogénesis y la diferenciación celular (104, 108, 120, 126, 128, 129). El factor TGF-b1 está presente en la dentina sana (130) y puede ser liberado por la actividad ácida de las bacterias (131) o cuando el EDTA se aplica sobre dentina sana (132). La liberación de TGF-b1 también ha sido identificada después de la aplicación de materiales con hidróxido de calcio (123), MTA (124), cemento tricálcico a base de silicatos (133), y adhesivos dentales autograbables (134).

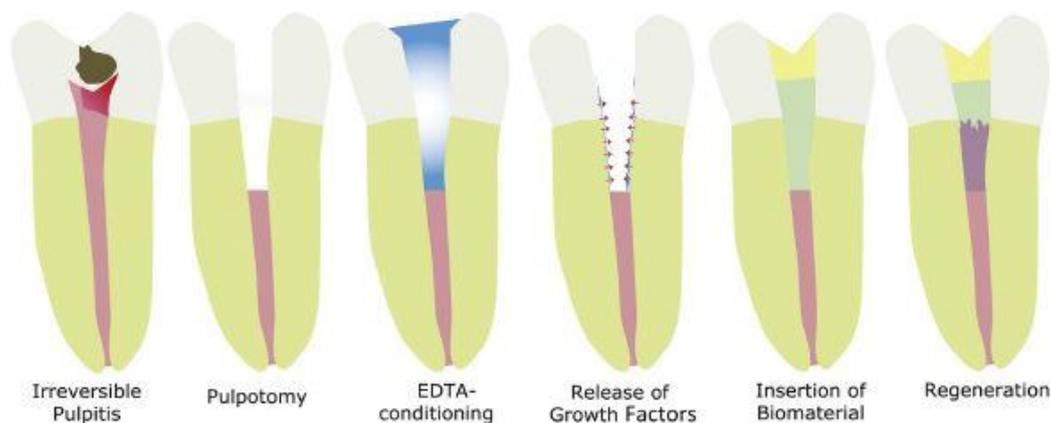


Figura 5. Proceso de regeneración. (Tomada de Kerstin M. et al 2014)

Otro punto importante a tener en cuenta es que las bacterias forman biopelículas sobre las paredes del conducto, en canales laterales, dentro de túbulos de dentina, etc. El desbridamiento del conducto radicular deja bacterias residuales (135). Tras realizar una obturación de los conductos, el medio ambiente en endodoncia tradicional puede permitir que las bacterias residuales proliferen y se restablezcan en biofilms (100). El nivel necesario de desinfección en endodoncia regenerativa es mayor que en endodoncia tradicional, porque en endodoncia tradicional simplemente con la reducción de carga bacteriana es suficiente, pero en el caso de endodoncia regenerativa es necesaria una reducción drástica (100). Es por ello que se han propuesto combinaciones de antibióticos, como la pasta de triantibiótico (ciprofloxacino, metronidazol y minociclina) para la realización de dicho tratamiento (100, 120).

Diversos estudios han demostrado que en comparación con el hipoclorito de sodio la pasta triantibiótica desinfecta el 70% del canal frente al 10% desinfectado por el hipoclorito (100, 136). Sin embargo, la minociclina puede producir tinciones y ha sido sustituido por cefaclor (137) o eliminado por completo de la mezcla (138). Otro antibiótico utilizado ha sido el [®]Augmentine (139) y se ha demostrado que es más eficaz contra la flora de la raíz (140, 141), ya que el ácido clavulánico inactiva las beta-lactamasas y no decolora los dientes. Es importante tener en cuenta que una concentración alta de antibiótico puede ser tóxica para las células madre de la papila apical (120, 122) por lo tanto, debemos bajar la concentración y se está trabajando actualmente para determinar qué concentración permite lograr la desinfección con menor toxicidad para el tejido regenerativo apical (100, 120).



La revascularización es una técnica que permite que el conducto sea rellenado con tejido vital. El uso de un tejido biológico para llenar el espacio del conducto evita las desventajas de un material sintético, es decir, la pérdida del sellado potencial, toxicidad, etc. Además el tejido biológico tiene la enorme ventaja de ser inmunocompetente y por lo tanto, ser capaz de defenderse de las bacterias como el tejido pulpar normal haría y es ahí donde radica su importancia. Actualmente no hay indicadas contraindicaciones para su realización (106, 108).

Si el objetivo del tratamiento es inducir la curación del tejido periapical, estimular la regeneración ósea y que el paciente esté libre de cualquier signo o síntoma el tratamiento sería un éxito cuando se habla de reparación. Sin embargo, si el objetivo es regenerar un tejido de la pulpa el tratamiento sería un fracaso, éxito clínico pero fracaso biológico (106).

La presencia de células madre en un canal revascularizado se ha demostrado claramente (142), lo que sugiere que el reclutamiento de células madre de la papila apical y su posterior migración juegan un papel crítico en la formación de nuevo tejido. Sin embargo, el origen de estas células no está claro. Por ello se sugiere que las indicaciones clínicas de revascularización deben limitarse a dientes inmaduros (100, 106, 108). Sin embargo, si las células madre pueden ser reclutadas de un nicho que no sea la papila apical, las indicaciones del tratamiento podrían extenderse a dientes maduros (106, 143, 144).

1.4.4 SCAFFOLDS O ANDAMIOS TRIDIMENSIONALES PARA REGENERACIÓN PULPAR

Los andamios tridimensionales o *scaffolds* deben ser desarrollados exclusivamente para la regeneración de cada tejido u órgano específico, sin embargo, comparten características comunes, tales como permitir la unión de células, la difusión de nutrientes y oxígeno, ser biodegradables, y tener propiedades físicas parecidas a las del tejido/órgano que va a ser regenerado (145, 146). Además, los *scaffolds* pueden ser funcionalizados por las condiciones que mejoran la unión celular y la supervivencia, así como proporcionar señales morfogénicas que complementan las que vienen desde el organismo y activar la orientación de la diferenciación de células madre (146).



En términos generales, los andamios se pueden dividir en (147) sólidos (es decir, bastante rígido o hechos a medida para propósitos específicos) e inyectables (148), es decir, geles de baja viscosidad que pueden ser moldeados en el sitio que requiere la regeneración de tejidos.

Ambos tipos de *scaffolds* pueden utilizarse con señales morfogénicas. Normalmente estas señales son proteínas típicas con una vida media corta. Por lo tanto, el desarrollo de una estrategia para la liberación controlada de las proteínas es crítico para maximizar sus efectos para los periodos de tiempo predeterminados. Estas proteínas se pueden incorporar tanto en los *scaffolds* formados por copolímeros (ácido láctico-co-glicólico) como los formados por gas (149, 150). También se pueden mezclar con andamios inyectables como el colágeno o el hidrogel, aunque en este caso es muy difícil reducir la velocidad de la tasa de degradación de las proteínas. Para solucionar el problema surgieron diferentes polímeros naturales derivados de las algas (alginatos), que son biocompatibles y presentan una baja inmunogenicidad (145). Se pueden utilizar en combinación con los *scaffolds* inyectables para servir como un dispositivo de liberación lenta para las señales morfogénicas (151, 152).

El proceso de gelificación en presencia de iones divalentes en niveles fisiológicos es muy sencillo de incorporar, proteger y liberar factores morfogénicos de microesferas de alginato de forma controlable (153, 154). La norma biológica para la liberación controlada de factores morfogénicos en la ingeniería de tejidos dentales depende del microambiente existente durante el desarrollo de los dientes (145, 155, 156). Los investigadores han intentado entender este entorno como un medio para crear condiciones ideales para la determinación de las células madre y el tejido dental regenerado (156, 157). Se trata de investigar e identificar las señales morfogénicas que juegan papeles importantes durante el desarrollo de los dientes y que podrían ser utilizadas terapéuticamente en regeneración dental (158-160).

Los *scaffolds* que utilizemos tienen que cumplir unos requisitos:

- Proporcionar una fijación adecuada y evitar la apoptosis de las células madre trasplantadas o reclutadas en la cámara pulpar (145)



- Tiene que vascularizar rápidamente la pulpa a regenerar para permitir oxígeno y afluencia de nutrientes, así como para permitir la llegada de células madre circulantes que complementarán la heterogeneidad celular de la pulpa (156).

Los investigadores han tratado de abordar estas cuestiones funcionalizando los andamios usados en la ingeniería de tejidos de la pulpa dental con restos que permiten una mejor fijación de las células (por ejemplo, ácido, arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) y la incorporación de factores angiogénicos (por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (161, 162).

Cada vez es más evidente que el andamio ideal para la ingeniería de tejidos dental será inyectable, no fundido. Esto es debido a los estrechos espacios dentro del conducto radicular y la complejidad de su anatomía, particularmente en la región apical (145).

Además, existe la preocupación relacionada con el uso de disolventes (por ejemplo, cloroformo, diclorometano, y acetona) que normalmente se utilizan para solubilizar el *scaffold*, pues los niveles residuales de disolvente pueden ser tóxicos para las células. Por otra parte, los hidrogeles pueden ser inyectables y por lo tanto penetrar a través del sistema de conductos radiculares. Y ser sometidos a una reacción de fraguado a un pH fisiológico (145).

Diferentes estructuras de polímeros sintéticos se han propuesto como andamios en la ingeniería de tejidos. El ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico (PLA) son poliésteres biodegradables que se pueden obtener de diferentes fuentes renovables y se han propuesto para su uso en ingeniería de tejidos dentales (163, 164). Los andamios formados a partir de PGA se ha demostrado que sirven para mejorar la adhesión y proliferación de los fibroblastos pulpares (164).

Cuando un copolímero de PGA y PLA, se siembra con células madre de pulpa dental, se ha demostrado que ayuda a la formación de tejido similar a la pulpa tanto en experimentos con xenoinjerto con conejo como con ratón (165-167).

Se han usado andamios sintéticos para utilizar una variedad de agentes antiinflamatorios tales como ibuprofeno, dexametasona, diclofenaco, rolipram... (168-172). Tales andamios, que se ha demostrado que son capaces de ayudar en la regeneración de los tejidos de la pulpa, también podrían ser utilizados para entregar estas u otras moléculas



anti-inflamatorias tales como las resolvinas con el fin de controlar la pulpitis, facilitando de esta manera la reparación pulpar. Desde la perspectiva de la regeneración de endodoncia, estos polímeros son atractivos debido a sus propiedades de manejo y relativa facilidad de producción (173).

También hay un interés significativo en el uso de andamios biomiméticos, compuestos por materiales naturales, aunque en general, no son tan mecánicamente resistentes como los polímeros sintéticos (173). Los hidrogeles formados a partir de colágeno han sido ampliamente utilizados con células madre *in vitro* y como un vehículo para entregar las células, factores de crecimiento y moléculas antiinflamatorias en diversos modelos animales, con cierto éxito en la regeneración de tejidos similares a pulpa (128, 174-176). El colágeno es, por supuesto, frecuente en el medio extracelular y es por lo tanto altamente compatible con las células y tejidos. Sin embargo, los hidrogeles formados a partir de colágeno son estructuralmente débiles, y el entrecruzamiento químico que se realiza para mejorar la rigidez del gel a menudo produce disminución de citocompatibilidad (177-178). Del mismo modo, la fibrina se ha propuesto como un candidato para la ingeniería de tejidos en diversas aplicaciones debido a su asociación con coagulación de la sangre y la adhesión de células *in vivo* aunque comparte las desventajas estructurales de colágeno (178-180).

Los alginatos son polímeros naturales versátiles que se han utilizado ampliamente como portadores de factores de crecimiento (181-183). La retención de agua, la capilaridad de los hidrogeles puede ser afectada por el pH, la temperatura, el nivel de reticulación, la viscosidad y la estabilidad (184). Los alginatos actúan como barreras mecánicas, disminuyendo la difusividad en compuestos químicos de bajo peso molecular o proteínas atrapándolas después de su gelificación. Las sustancias como el tampón fosfato que se utilizan como portadores para los factores de crecimiento se puede encapsular en alginatos de alta viscosidad (185). Por otro lado, porque dada su naturaleza hidrofílica, los alginatos presentan baja absorción de las proteínas presentes en el suero y los niveles de adherencia e interacción celular son bajos en consecuencia (152, 186).

Estos hidrogeles son compatibles con células madre mesenquimales derivadas de la encía y ligamento periodontal cuando está cargado con TGF- β 1, induce la diferenciación a células similares a odontoblastos (173). El colágeno y los andamios de



fibrina también se han usado como sistemas de administración para una variedad de moléculas con propiedades anti-inflamatorias tales como IL-10, heparina desulfatada y neurotrofina-3 y podría ser hipotéticamente utilizado para tratar la inflamación en el contexto de la regeneración pulpar (187, 189). Aunque estos andamios, por definición se asemejan más al tejido de la pulpa dental nativa, establecer un control sobre su composición específica puede ser difícil y quizá socavar tanto su biocompatibilidad como su integridad estructural (173).





OBJETIVOS





2. OBJETIVOS

Objetivo general: Comprobar la biocompatibilidad de un *scaffold* 3D de fibroína de seda con células procedentes de pulpa dental de dientes deciduos.

Objetivos específicos:

- Extracción y aislamiento de células madre de pulpa dental de dientes deciduos.
- Obtención de un *scaffold* de origen natural de fibroína del gusano de seda.
- Comprobar mediante microscopia de barrido la adhesión y proliferación de células madre procedentes de pulpa dental de dientes deciduos sobre un *scaffold* de fibroína.
- Verificar la correcta proliferación de células SHEDs sobre un *scaffold* de fibroína de seda.
- Comprobar mediante citometría de flujo la viabilidad celular de las SHEDs, así como el fenotipo celular mediante análisis de la presencia de marcadores de superficie tipo mesenquimal.

Hipótesis nula:

- La fibroína de seda no es biocompatible.





MATERIAL

Y

MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 AISLAMIENTO CELULAR

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Murcia. Los donantes firmaron un consentimiento informado. Se recogieron dientes deciduos sin afectación pulpar. Para asegurar el anonimato de los donantes no se llevó a cabo la identificación de los dientes recogidos.

Inmediatamente tras la extracción, los dientes recogidos se depositaron en tubos (FALCON) de 50 ml con 25 ml de 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 estreptomicina; SIGMA)
- Antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina; SIGMA).

Las muestras se conservaron entre 4°C y 8°C durante un máximo de 72 horas desde la extracción hasta poder ser procesadas.

3.1.1 Extracción de pulpa dental humana (hDP):

Para cumplir las condiciones de esterilidad, se trabajó en una cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar) (Fig. 6).



Figura 6. Cabina de seguridad biológica vertical tipo II.

Los dientes recogidos fueron colocados en una placa de Petri que contenía PBS estéril (tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4) y una mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de

penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina B; SIGMA). Para obtener la pulpa dental el diente se seccionó transversalmente y con la ayuda de limas manuales y tiranervios se obtuvo el tejido pulpar. La pulpa dental (junto con el PBS) se traspasó por separado a un tubo Falcon donde se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática y mecánica.

3.1.2 Disgregación enzimática:

El precipitado celular fue sometido a una disgregación enzimática utilizando una solución de proteasas: colagenasa tipo I (3 mg/ml; Worthington Biochem) y dispasa (4mg/ml; GIBCO) durante 1 hora a 37°C. Las proteasas se inactivaron añadiendo un volumen igual o mayor de medio de cultivo celular MEM frío.

Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm y tras desechar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en medio de cultivo celular MEM con anfotericina (250 unidades/ml).

Se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm (Fig. 7) y tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular MEM con anfotericina (250 unidades/ml).



Figura 7. Centrifuga



3.1.3 Disgregación mecánica:

Con el fin de quitar los trozos más grandes de tejido remanente, se recogieron las células del tubo con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una malla estéril de 70 μm (Falcon, BD), donde se tamizaron a través de la malla añadiéndose medio de cultivo MEM. La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo celular MEM en el que se resuspendieron las células.

3.2 RECUESTO Y ESTIMACIÓN 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 (Fig. 8) y azul tripán. Este método se basa en el principio de que las células vivas (viables) cuya membrana citoplasmática está intacta, no permiten la entrada del colorante (azul tripán), permaneciendo refringentes. Mientras que las células muertas (no viables), debido a que su membrana citoplasmática se encuentra rota, permiten el paso de colorante tiñéndolas de azul.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Se agitó la suspensión celular y se depositaron 10 μl de la misma en un tubo (Eppendorf)
- Se añadió 10 μl 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 (0.1 mm^3), 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:

$$\text{N}^\circ \text{ células viables/ml} = \text{n}^\circ \text{ células vivas contadas} \times 10000 \times \text{factor de dilución}$$

Nº células totales/ml = (nº células vivas contadas + muertas contadas) x 10000 x factor de dilución.

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

Se multiplica el número de células por 10.000, ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara Neubauer es de 0.1 mm³.

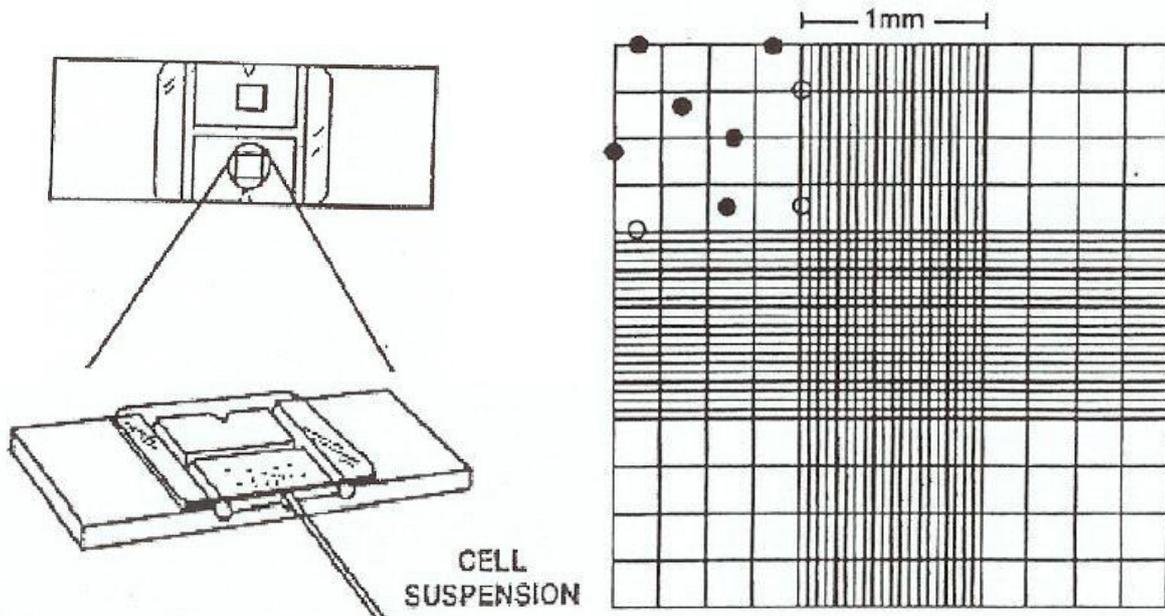


Figura 8. Recuento con cámara de Neubauer o hemocitómetro.

Tras hacer el recuento y la estimación de la viabilidad, se ajustó la solución celular a 1×10^5 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.

3.3 CULTIVO DE CÉLULAS DE DIENTES DECIDUOS (SHEDs)

Las células aisladas de los dientes deciduos crecen adheridas al plástico de la placa de cultivo. Las células fueron sembradas en frascos de 75 cm² de superficie (BD Biosciences), para el cultivo primario de SHEDs, 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 al que se le añadieron los siguientes componentes:



COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
SBF (Gibco)	10%
P/E (Sigma)	100 µg/ml
Glutamina (Sigma)	2 mmol/l

El medio de cultivo se cambió 3 veces por semana y 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 realizaron subcultivos.

Primero 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. Seguidamente 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 se centrifugaba durante 6 minutos a 300 G, se desechaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 1 ml de medio de cultivo basal frío.

Tras estimar la viabilidad, se ajustó la densidad celular a 1×10^5 células/ml y se sembraron en un nuevo frasco de 75 cm². Las células se incubaron en una estufa para cultivos celulares (Fig. 9) a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo celular basal se cambiaba con una frecuencia de 3 veces por semana aproximadamente.

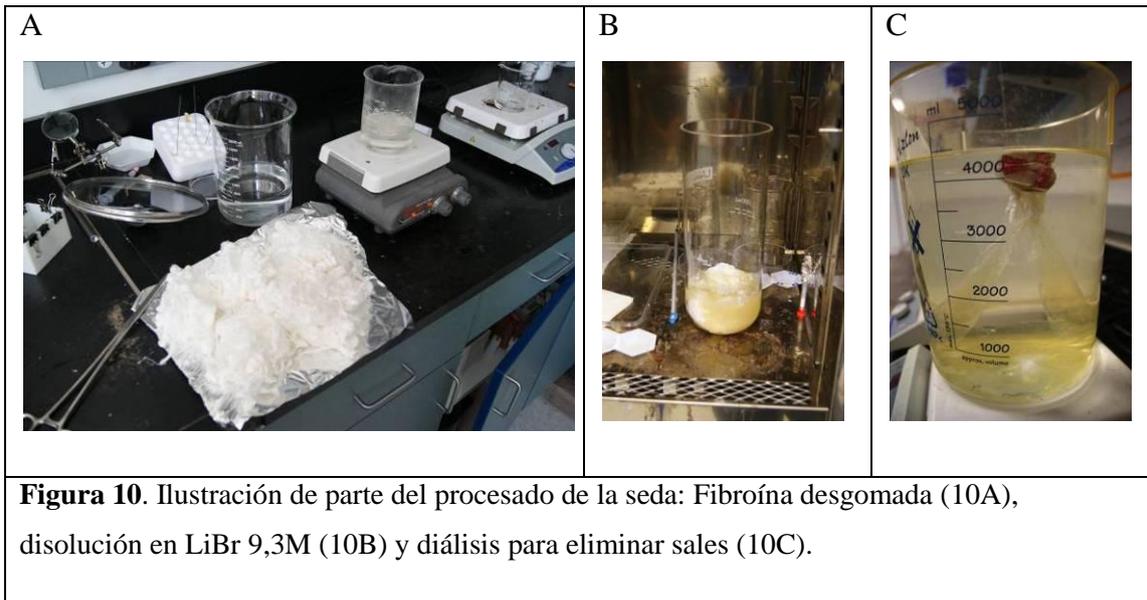


Figura 9. Incubador para cultivos celulares

3.4 ELABORACIÓN DE ARMAZÓN TRIDIMENSIONAL (SCAFFOLD) DE FIBROÍNA DE SEDA

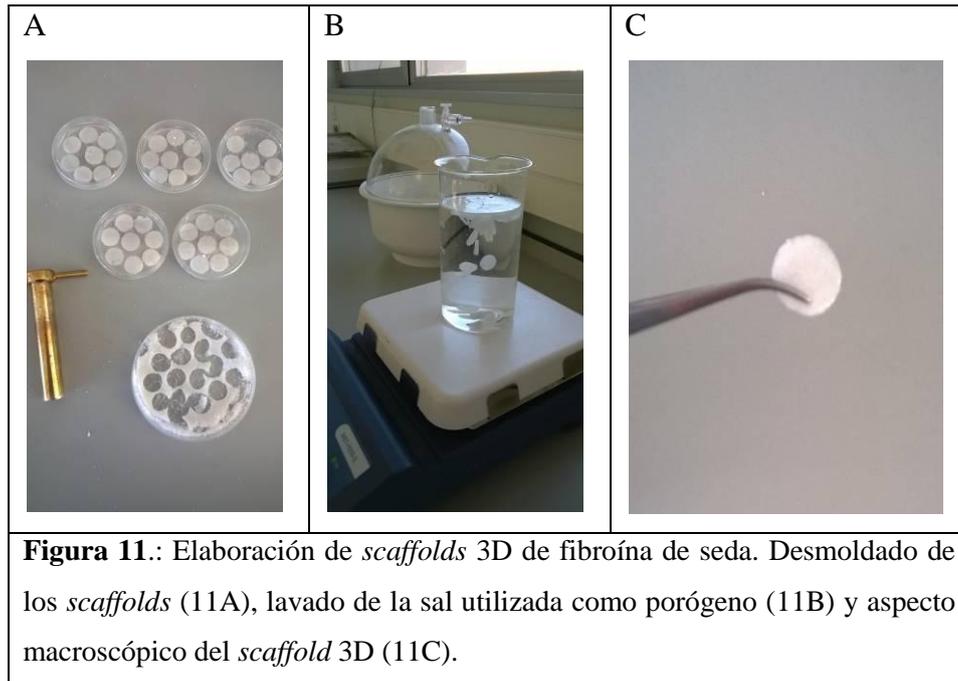
Para la elaboración de los biomateriales de fibroína se emplearon capullos blancos procedentes de gusanos criados en las instalaciones del IMIDA (La Alberca, Murcia).

La eliminación de la sericina de los capullos es un paso fundamental en la purificación de la fibroína de seda, este primer paso se conoce como desgomado. Para ello fueron troceados y se hirvieron 30 min en una disolución 0,02 N de Na_2CO_3 (Panreac, España), a continuación la malla de fibroína resultante se lavó con agua destilada para extraer la sericina remanente (Fig.10A). Tras su secado a temperatura ambiente la fibroína se disolvió en LiBr 9,3 M (AcrosOrganics, Bélgica) al 20% (p/v) durante 3 h a 60°C (Fig. 10B). El paso final consistió en un proceso de diálisis frente a agua destilada durante 3 días (con 8 cambios de agua en total), para eliminar las sales (Fig.10C). Posteriormente se realizó un filtrado con papel Miracloth (Calbiochem, Alemania). El resultado fue una disolución de fibroína acuosa regenerada al 7,5% p/v, que fue conservada a 4°C hasta su utilización.



Esta disolución acuosa de fibroína de seda es la materia prima a partir de la cual se elaboraron los *scaffolds* 3D. Para ello se empleó sal común (NaCl) como porógeno, que fue lavada al final de proceso a fin de crear un entramado poroso interconectado que permitiese la difusión de nutrientes y sustancias de desecho derivadas del metabolismo celular.

Se depositaron 15 g de sal común en una placa Petri de 9,5 cm de diámetro creando una superficie extendida de forma homogénea en cuanto a su altura. Posteriormente se añadieron 8 mL de fibroína de seda acuosa al 7,5% p/v, empapando así la capa de sal. Transcurridas 48 h la fibroína de seda ha coagulado insolubilizándose en parte y actuando como cementante entre los granos de NaCl. Para garantizar la total insolubilización de la fibroína de seda se realizó un tratamiento posterior de inmersión en baño con metanol durante 30 min. Una vez eliminado el metanol, se extrajeron fragmentos circulares de 5 mm de diámetro haciendo uso de un sacabocados de estas dimensiones (Fig.11A), para posteriormente transferir los mismos a un vaso de precipitados con agua miliQ y así lavar la sal incluida en el material (Fig.11B). Se realizaron 5 cambios de agua a lo largo de 2 días, obteniéndose como resultado unas esponjas porosas de 2-3 mm de altura (Fig.11C), aptas para su siembra en placas de 96 pocillos, así como un tamaño ajustado para poder usar en dientes deciduos al ser estos más pequeños.



Una vez elaborados los *scaffolds* éstos fueron esterilizados mediante 2 baños en etanol al 70% v/v. Se mantuvieron en el etanol 70° hasta el momento de uso. Para prepararlos se dispusieron en una placa de 96 pocillos, se lavaron con agua miliQ autoclavada y dos veces con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y se pretrataron de 1 a 2 horas con suero bovino fetal (FBS) a 37°C antes de sembrar las células.

3.5 CULTIVO CELULAR SOBRE SCAFFOLD DE FIBROINA

Para valorar la adhesión y morfología de las células procedentes de pulpa dental se acudió al edificio LAIB del Hospital Virgen de la Arrixaca y se siguió el siguiente protocolo:

Los *Scaffolds* de fibroína colocados en una placa de 96 pocillos fueron preincubados con SBF durante 1-2 horas a 37°C en un incubador. Posteriormente se retiró el SBF, se ajustó la densidad a 5×10^5 células/mL y se sembraron 200 μL de la suspensión celular sobre el *scaffold* de fibroína, permitiendo la adhesión celular durante 24 horas. Pasado este tiempo, el *scaffold* se transfirió a un pocillo mayor con medio de cultivo completo fresco y se incubó a 37°C, 5% CO_2 y 95% HR a 72 horas o 168 horas.

Para realizar el estudio microscópico, los *scaffolds* se incubaron durante 24 horas, 72 horas o 168 horas y después se procesaron para ser observados en el microscopio electrónico de barrido Jeol 6100.

3.6 PROCESADO MUESTRAS Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las muestras se prepararon en el edificio LAIB del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, donde fueron sometidas a los siguientes procesos:

1. Fueron lavadas antes de fijarlas.
2. Se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0'1 M durante 3-5 horas.
3. Se lavaron en tampón cacodilato más sacarosa durante 24 horas.

Posteriormente fueron llevadas al Servicio de Apoyo a la Investigación en el campus de Espinardo para ser procesadas y poder ser vistas en microscopía electrónica de barrido. El proceso al que fueron sometidas fue el siguiente:

1. Se postfijaron en tetróxido al 1% durante 1-2 horas.
2. Se lavaron en tampón cacodilato más sacarosa y se dejó toda una noche.
3. Se deshidrataron en acetona: 30%, 50%, 70%, 90%, 100% durante 10' cada uno.
4. Se llevaron al punto crítico con acetona 100% y CO₂ líquido (Fig. 12).
5. Se recubrieron con oro con el metalizador Bio-Rad PolaronDivision (200A) (Fig. 13).
6. Se observó al microscopio electrónico de barrido Jeol 6.100 (Fig.14).
7. Se tomaron las imágenes con el sistema de captación autobeam del sistema de microanálisis INCA X-stream and mics de OXFORD Instruments Analytical.



Figura 12. Muestra llevada al punto crítico

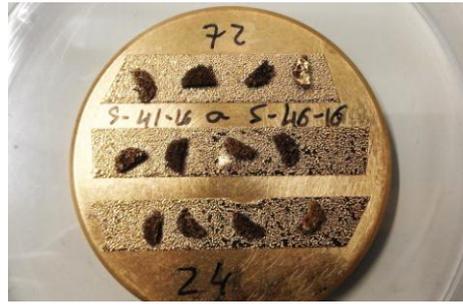


Figura 13. Muestra recubierta con oro.



Figura 14. Microscopio electrónico de barrido Jeol 6100.

3.7 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para evaluar la proliferación celular en los *scaffolds* de fibroína, tras transferir el *scaffold* a un pocillo mayor, se adicionó resazurina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración igual a 300 μ M.

La resazurina es una molécula no tóxica para las células que presenta diferente color en función de su estado de oxidación, es azul en su forma oxidada y tras ser reducida por las células vira a rojo. La inocuidad de la resazurina permite la incubación de las células en su presencia, de modo que se pueden tomar medidas del aumento de la presencia de la forma reducida y se puede estimar la proliferación celular a lo largo del tiempo. Así, al excitar una alícuota del medio de cultivo a 570 nm, se puede apreciar un incremento de la emisión de fluorescencia a 600 nm conforme aumenta la concentración de resazurina reducida en dicha alícuota. Dicho procedimiento de medida se llevó a cabo en el lector de placas Infinite 200 PRO multifuncional (Tecan Austria GmbH).



Para el experimento colocamos un pocillo sin células, células en la superficie de un pocillo, *scaffold* de fibroína sin células y células dentro de un *scaffold* durante 24, 48, 72 y 96 horas.

3.8 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Es una técnica que permite analizar cuantitativamente el fenotipo celular a través de la detección de antígenos que han sido marcados con anticuerpos porque están unidos a una molécula fluorescente.

La expresión de moléculas de superficie de células madre mesenquimales se realizó en pases de 2-4 de cultivos de SHEDs utilizando la técnica de citometría de flujo.

Las células se sembraron a una densidad de 7000 células/cm² en placas de cultivo multipocillo de 48 posiciones. Fueron incubadas durante 10 días a 37°C, en medio de cultivo completo DMEM. Una vez cumplido el periodo de incubación, las células se separaron de la superficie de cultivo empleando una solución de tripsina al 0.25% en EDTA 1mM. Después fueron lavadas con PBS 1X y se incubaron en oscuridad, a 4 °C y durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorescencia para CD73, CD90, y CD105 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), recomendados por la Sociedad Internacional de Terapia celular (ISCT) para confirmar el fenotipo mesenquimal de las células. También se analizó la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos (CD14, CD20, CD34 y CD45, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

La fluorescencia no específica se midió utilizando anticuerpos monoclonales de isotipo específico. La fluorescencia celular se midió en el citómetro de flujo BD FACS Canto y los resultados se analizaron mediante el *software* Kaluza.



3.9 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio, que se emplean junto a tinciones vitales para identificar distintos estados apoptóticos mediante citometría de flujo. En el caso de la Anexina-V, ésta se une a fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés *phosphatidyl serine*). En células sanas, la PS se localiza en la cara citosólica de la membrana plasmática. Una vez iniciada la apoptosis, la PS pierde su distribución asimétrica y se transloca a la cara extracelular de la bicapa fosfolipídica, siendo así detectable mediante Anexina-V conjugada con ficocococitrina (PE, por sus siglas en inglés *phycoerythrin*). En estados tempranos de apoptosis, la membrana plasmática excluye tinciones vitales como la 7-aminoactinomicina (7-AAD), por lo que las células sólo son positivas para la tinción con Anexina-V. En estados tardíos de apoptosis, la pérdida de integridad de la membrana celular permite tanto la unión de la Anexina-V a PS citosólica, como la captación de 7-AAD.

Las SHEDs junto con *scaffolds* de fibroína fueron sometidas a una tinción doble con Anexina-V conjugada con PE y 7-AAD (BD Biosciences) para determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Para ello las células se separaron de la superficie de cultivo empleando una solución de tripsina-EDTA al 0.25%, se lavaron con PBS 1X y se incubaron con Anexina-V conjugada con PE y 7-AAD en tampón de unión a temperatura ambiente durante 15 min.

El análisis de los resultados se realizó en el citómetro de flujo BD FACSCanto, interpretando los resultados (porcentaje) del siguiente modo:

- Células vivas: Anexina-V⁻/7-AAD⁻.
- Células en apoptosis temprana o tardía: Anexina⁺/7-AAD⁻.
- Células necróticas: Anexina-V⁺/7-AAD⁺.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



3.10 ESTADÍSTICA

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión 15.0 del software estadístico SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Dado que se cumplieron los requisitos de homogeneidad de varianzas y normalidad en las poblaciones de datos a comparar se hizo uso del test paramétrico de la t de student para determinar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas (nivel de significación al 95%).





RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO CELULAR PROCEDENTE DE PULPA DENTAL DE DIENTES DECIDUOS

Las células se extrajeron de la pulpa dental de dientes deciduos y se cultivaron según las técnicas expuestas en Material y Métodos. A las 24 horas de cultivo ya se observaron SHEDs adheridas a la superficie del frasco de cultivo. 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 (Fig. 15).

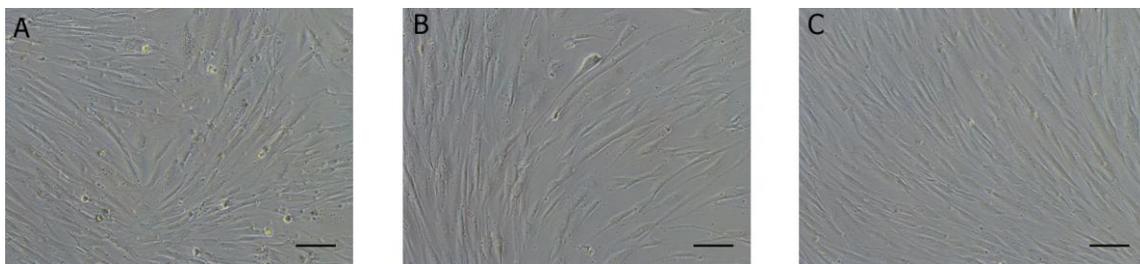


Figura 15.: SHEDs a las 24 horas de cultivo (15A), colonias de células de tipo fibroblástico a las 48h (15B) y confluencia de las células en un 80% a las 168h (15C).

En ese momento, se procedió a la tripsinización de las células y se subcultivaron, para evitar la total confluencia de éstas células frenase su proliferación.

4.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Debido a la estructura tridimensional del *scaffold* es muy difícil indicar cuál es la escala real a la que se están viendo las células, ya que la profundidad, la tercera dimensión, no nos permite obtener imágenes equivalentes entre diferentes *scaffolds*, ni siquiera entre diferentes campos de un mismo *scaffold*.

En las muestras de SHEDs sobre *scaffolds* de fibroína a las 24h podemos observar una pequeña cantidad de SHEDs de forma alargada entre los poros del *scaffold* que comienzan a proliferar y adherirse con su morfología fibroblástica (Fig. 16).

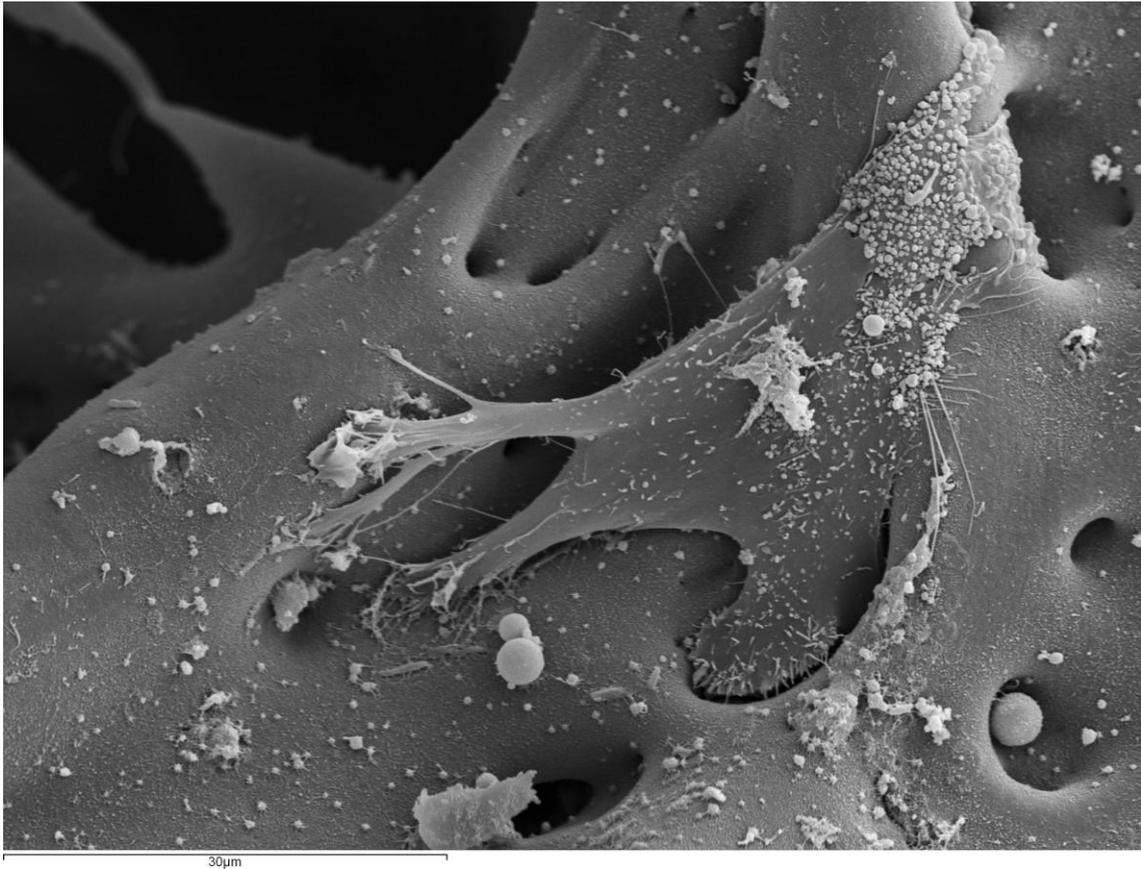


Figura 16. SHEDs a las 24 horas sobre el *scaffold* de fibroína de seda

En las muestras de SHEDs junto con fibroína a las 72h se observó como el número de células resultantes que se encontraban adheridas al *scaffold* aumentaba, viendo más cantidad de éstas sobre la superficie del *scaffold* (Fig. 17).

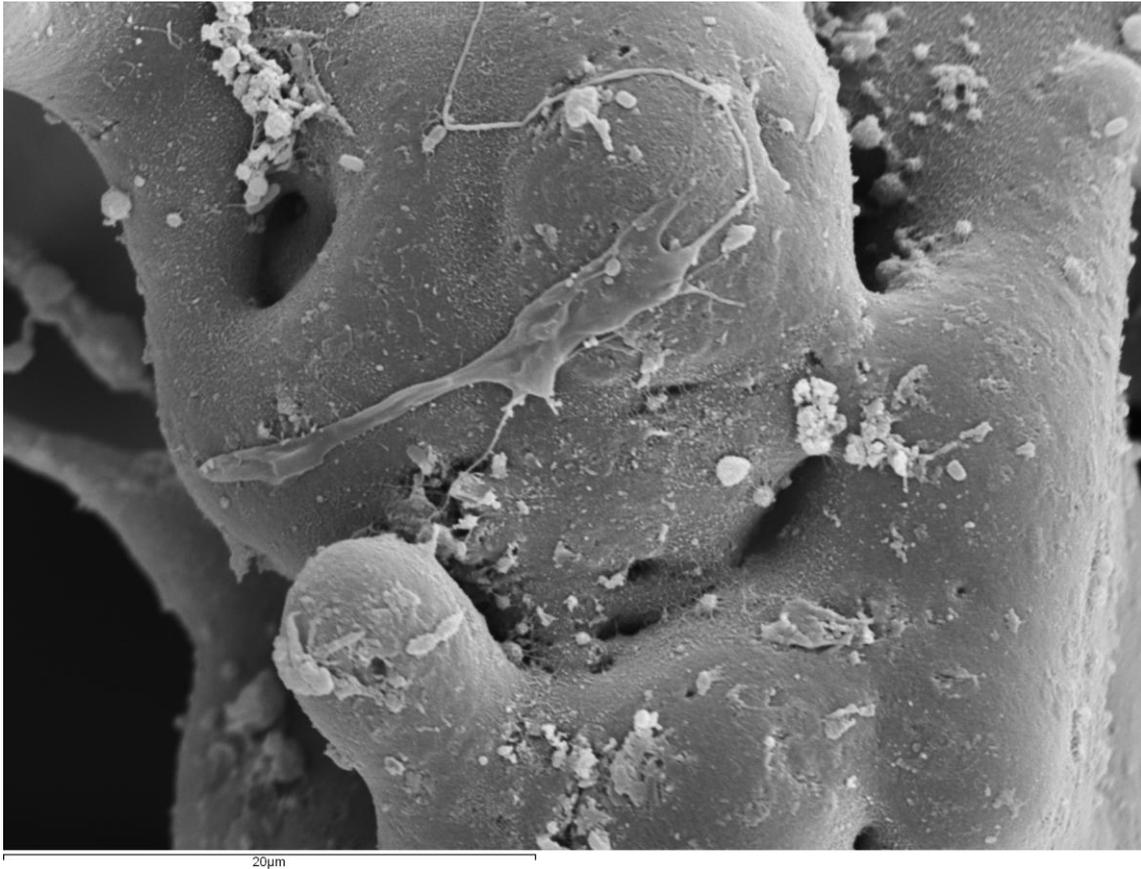


Figura 17. SHEDs a las 72 horas sobre el *scaffold* de fibroína de seda.

En las muestras de SHEDs sobre fibroína se observó a las 168h como el número de SHEDs era muy abundante y que se disponían tapizando por completo la superficie de la muestra sin dejar ver los poros que conforman el material (Fig. 18).

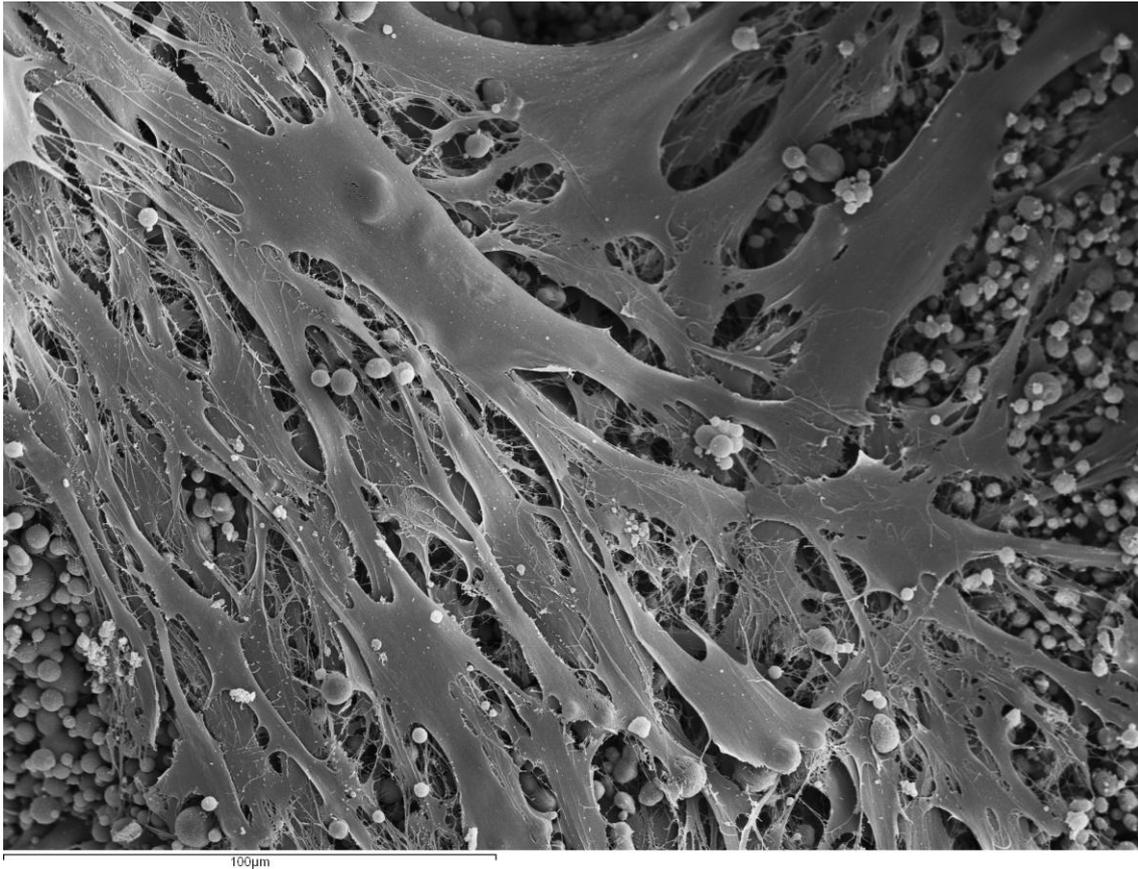


Figura 18. SHEDs a las 168 horas sobre el *scaffold* de fibroína de seda.

En las muestras control podemos observar el aspecto de los *scaffolds* de fibroína en los que no hay células, con la presencia de poros y microporos en una superficie alisada (Fig.19).

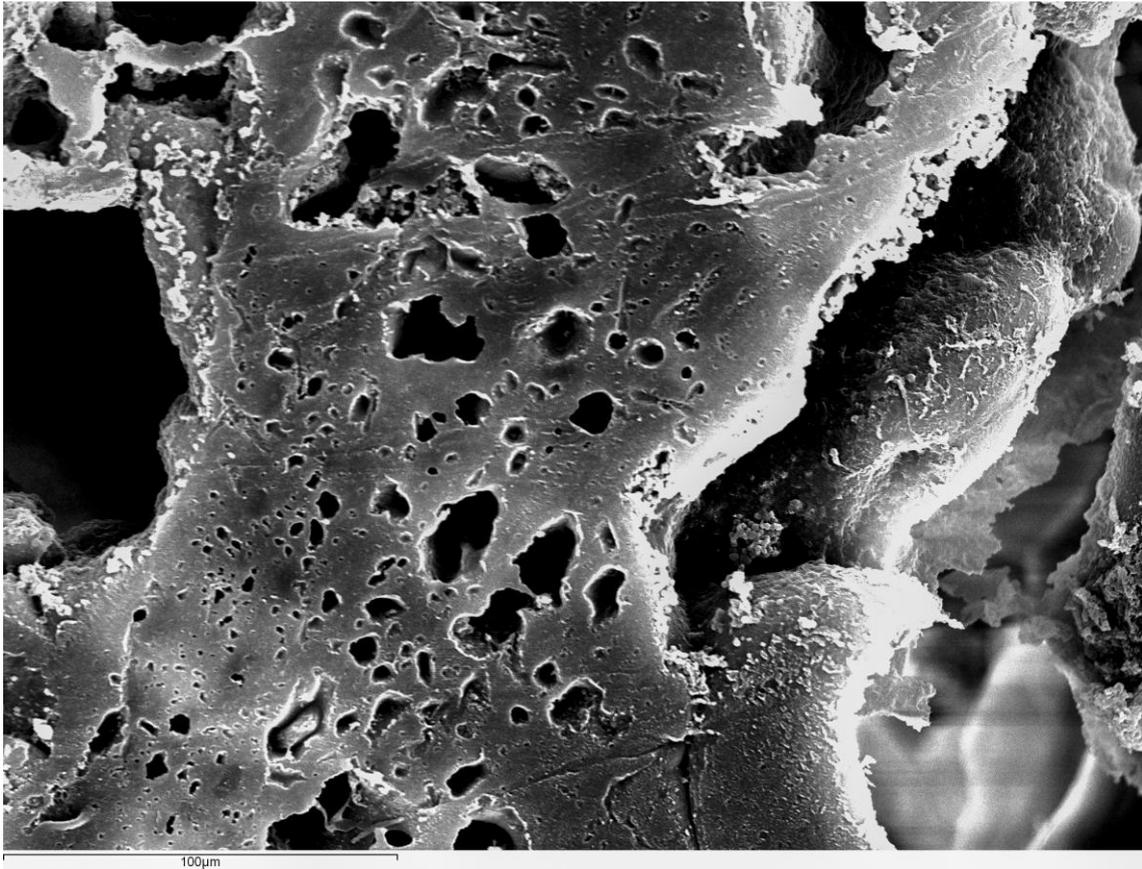


Figura 19. Muestra control

4.3 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Como ya hemos explicado en “Material y métodos” hemos usado el protocolo de Alamar Blue para verificar la proliferación celular sobre el *scaffold* de fibroína de seda. Encontramos resultados de la cantidad de resazurina reducida en diferentes casos: sin células (blanco), células en la superficie (control positivo), *scaffold* sin sembrar (control negativo) y *scaffold* con SHEDs (Fig. 20 y 21).

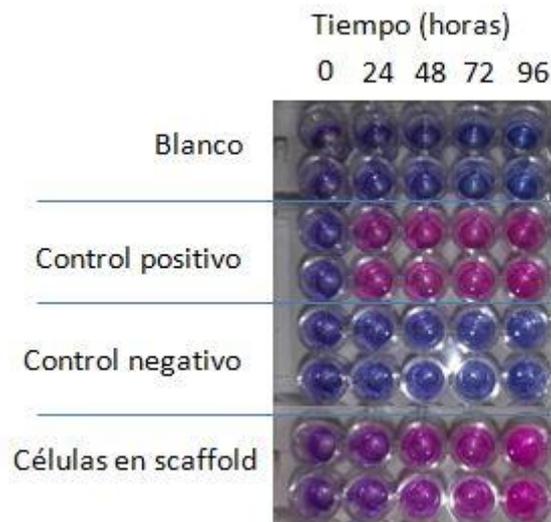


Figura 20. Pocillos tratados con resazurina. Pocillo sin células (blanco), pocillo con células (control positivo), scaffold sin sembrar (control negativo) y scaffold con células.

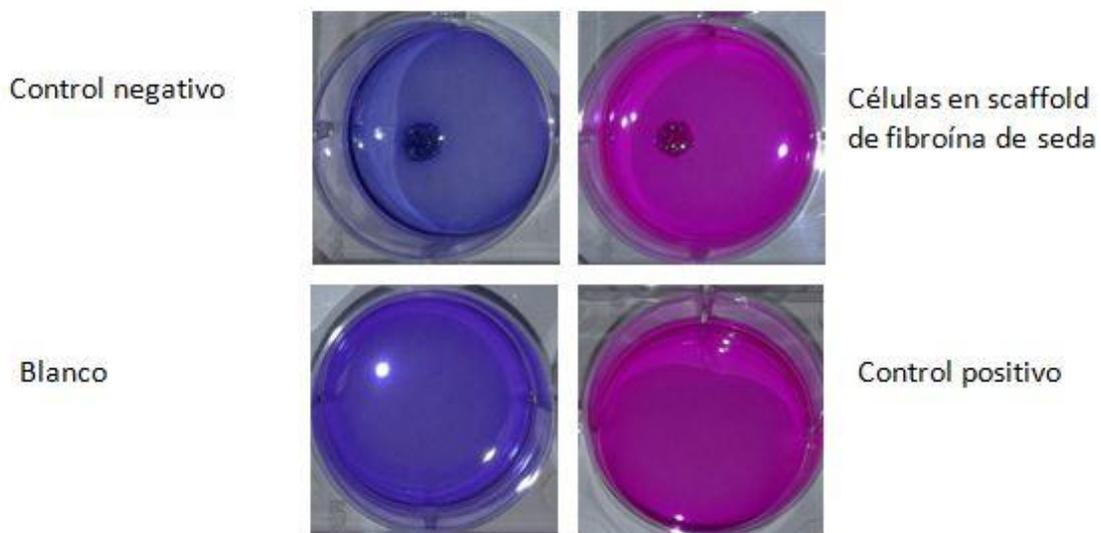


Figura 21. Pocillos tratados con resazurina. Scaffold sin sembrar (control negativo), scaffold con células, pocillo sin células (blanco), pocillo con células (control positivo).



En las anteriores figuras (Fig. 20 y 21) se puede observar un color azulado propio de la resazurina en estado oxidado, en presencia de células, debido a la actividad metabólica de las mismas, la resazurina pasa a un estado reducido, lo cual lleva aparejado un cambio de color a rosa. En aquellos pocillos que no había células (control negativo y blanco) la resazurina no variaba su estado y por tanto tampoco el color.

Tabla 1. Análisis fluorimetría Alamar Blue SHEDs.

	Blanco	Control positivo	Células en scaffold	Control negativo
0 horas	536	514	515	576
	517	520	508	496
24 horas	890	8068	3255	962
	1014	9382	2859	883
	793		2304	
48 horas	1512	12985	5779	1318
	1571	12446	5674	1390
	1176		4140	
72 horas	1872	10166	6470	1872
	1851	9594	6427	1628
	1822	6172	6081	
168 horas	2945	10233	11293	3366
	2909	11045	9543	3042

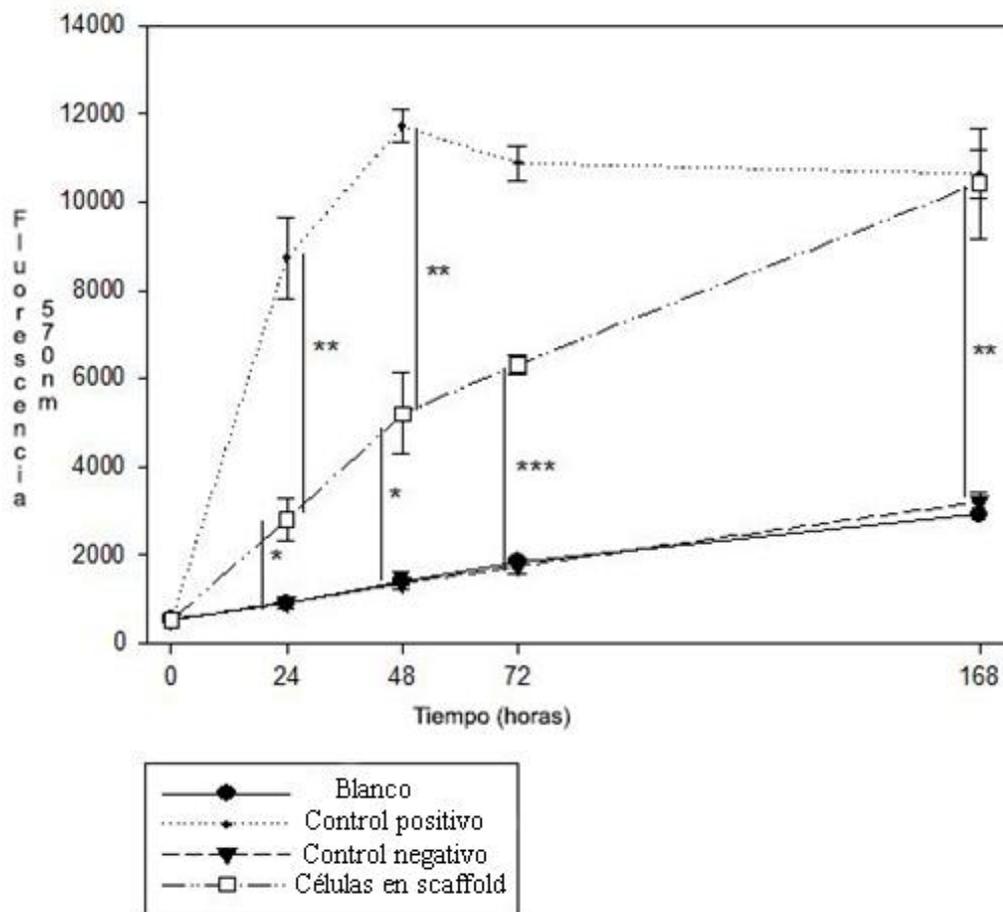


Gráfico 1. Alamar Blue SHEDS.

Tabla 2. Diferencias significativas a las 24h según análisis t de Student¹

24h	Blanco	Control positivo	Control negativo	<i>Scaffold</i> con células
No células	-	-	-	*
Células en superficie	-	-	-	**
<i>Scaffold</i> vacío	-	-	-	*
<i>Scaffold</i> con células	*	**	*	-

¹En la tabla se indican las diferencias significativas según el análisis de t de Student *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001.



Tabla 3. Diferencias significativas a las 48h según análisis t de Student.¹

48h	Blanco	Control positivo	Control negativo	Scaffold con células
No células	-	-	-	*
Células en superficie	-	-	-	**
Scaffold vacío	-	-	-	*
Scaffold con células	*	**	*	-

Tabla 4. Diferencias significativas a las 72h según análisis t de Student.¹

72h	Blanco	Control positivo	Control negativo	Scaffold con células
No células	-	-	-	***
Células en superficie	-	-	-	-
Scaffold vacío	-	-	-	***
Scaffold con células	***	-	***	-

Tabla 5. Diferencias significativas a las 168h según análisis t de Student.¹

168h	Blanco	Control positivo	Control negativo	Scaffold con células
No células	-	**	-	**
Células en superficie	**	-	**	-
Scaffold vacío	-	**	-	**
Scaffold con células	**	-	**	-



Como podemos observar en la gráfica 2, la cantidad de resazurina reducida aumenta en el caso de SHEDs con *scaffold*, lo que indica un aumento del número total de células. Comparando con el caso donde no hay células (control negativo) o solamente hay *scaffold* (control positivo) en el que se produce un ligero aumento de la resazurina reducida producido por el ambiente, encontramos una diferencia significativa (Tablas 2, 3, 4, 5).

En el caso de haber células vivas y adheridas en la superficie encontramos un aumento de la resazurina reducida, viéndose un color más rosáceo, esto se produce porque el plástico ha sido tratado para que las células puedan proliferar, va aumentando el número hasta las 48 horas donde llega a su pico máximo y se produce un fenómeno de estabilización donde la cantidad de células disminuye. A las 168h la cantidad de células en el caso con *scaffold* y sin *scaffold* (control positivo) es la misma, pero remarcamos la necesidad del *scaffold* al ser un material biocompatible y el plástico tratado no serlo. Es importante citar que el *scaffold* es un material implantable y biocompatible y no así el plástico de los cultivos celulares, diseñado solamente para un uso experimental y no de aplicación en el ámbito clínico. Estos resultados sugieren que aunque a las células les cueste más adherirse inicialmente a la fibroína, puesto que la superficie no está tratada como en el plástico de los cultivos celulares, podemos observar que a tiempo final (168h) la proliferación se iguala obteniendo una cantidad de células similar al control positivo. Este resultado avala al *scaffold* de fibroína óptimo para futuros estudios *in vivo*.

4.4 FENOTIPO

Realizamos un análisis mediante citometría de flujo, para confirmar el fenotipo mesenquimal de las células madre SHEDs, aisladas de un cultivo de pulpa dental de dientes temporales, y para determinar posibles cambios fenotípicos, tras el cultivo con los *scaffolds* de fibroína.

Los resultados obtenidos en la citometría de flujo fueron los siguientes:

Más del 95% de las células SHEDs, presentaron resultados positivos de los marcadores mesenquimales, CD73, CD90 y CD105, mientras que sólo un 5%

presentaron resultados positivos de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45 como se puede observar en la fig. 22.

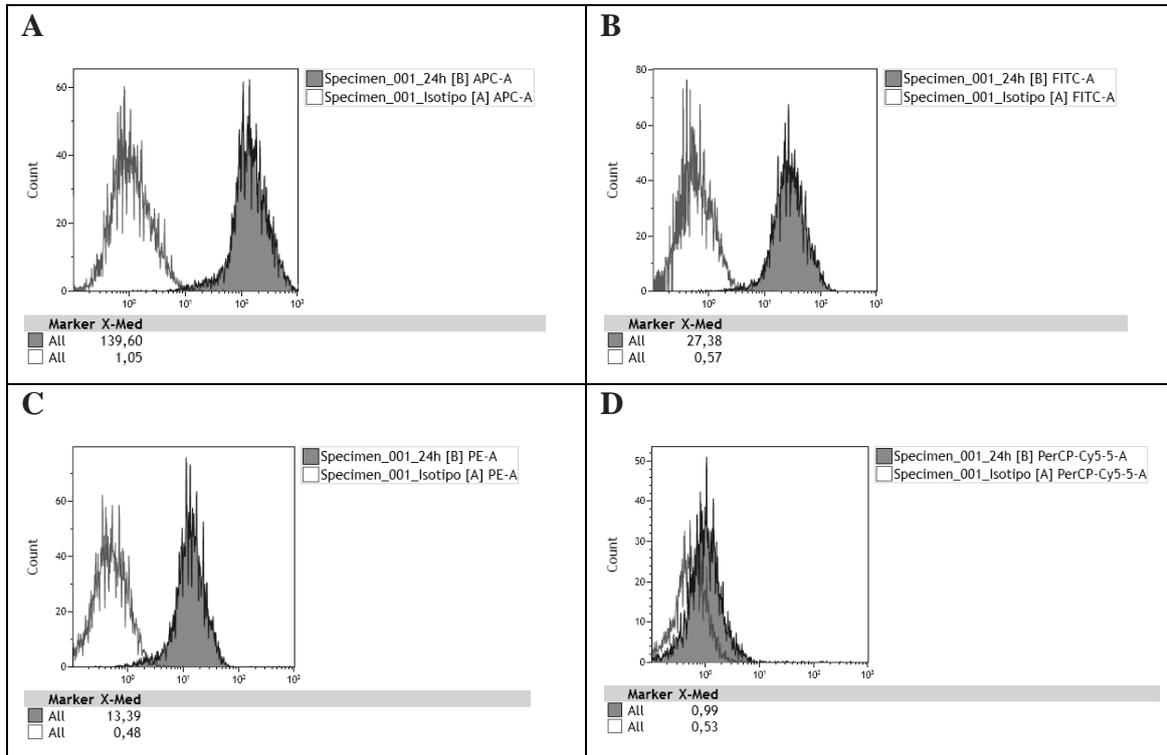


Figura 22. Expresión de marcadores CD73 (22A), CD90 (22B), CD105 (22C), CD45/CD34/CD14/CD20 (22D) a las 24 horas de siembra.

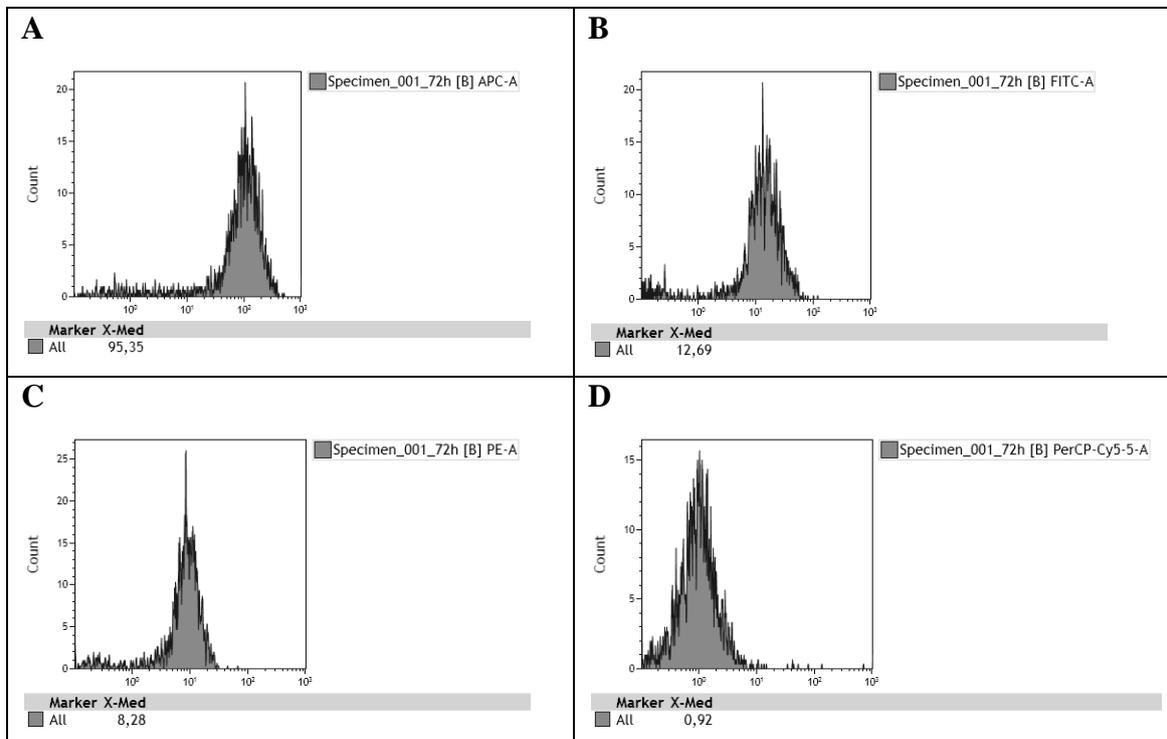


Figura 23. Expresión de marcadores CD73 (23A), CD90 (23B), CD105 (23C), CD45/CD34/CD14/CD20 (23D) a las 72 horas de siembra.

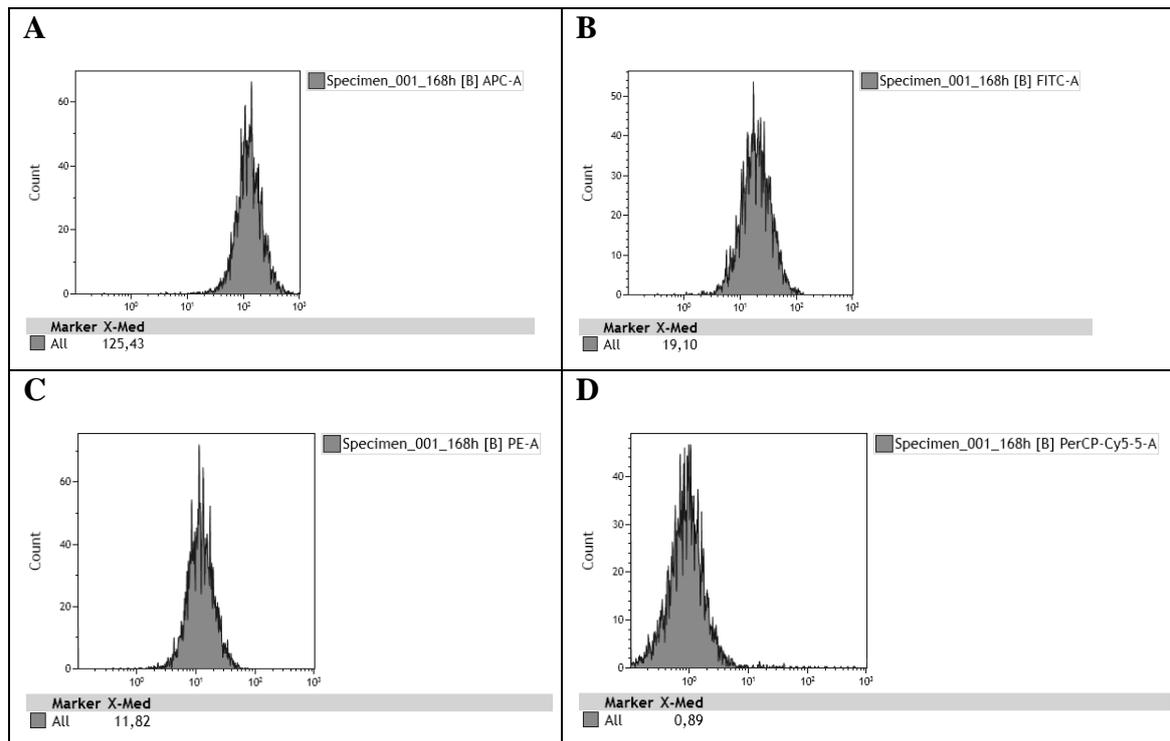


Figura 24. Expresión de marcadores CD73 (24A), CD90 (24B), CD105 (24C), CD45/CD34/CD14/CD20 (24D) a las 168 horas de siembra.

En las figuras encontramos los marcadores específicos CD73, CD90, CD105, CD45, CD34, CD14 y CD20 que se observan a las 24 horas (Fig. 22) y a las 168 horas (Fig. 24) estos siguen mostrándose. De esta forma podemos confirmar que tanto a las 24 horas como a tiempo final los marcadores específicos necesarios para la identificación del fenotipo celular siguieron mostrándose, por tanto, las células quedaron identificadas y se pudo concluir que se trataba de células madre de dientes deciduos.

4.5 APOPTOSIS

Las SHEDs se cultivaron sobre *scaffold* y plástico (control) durante tres periodos en el tiempo: 24, 72 y 168 h. Transcurrido éste tiempo, las células fueron marcadas con Anexina-V y 7-AAD y analizadas mediante citometría de flujo.

Se representó mediante diagrama de puntos bidimensional, la distribución de las células vivas (Anexina- V⁻/7-AAD⁻), células en apoptosis temprana (Anexina-V⁺/7-AAD⁻) y células en apoptosis tardía y necróticas (Anexina-V⁺/7-AAD⁺ y Anexina-V⁻/7-

AAD⁺) en SHEDs no tratadas, o en las sembradas en los *scaffolds*, como se observa en la fig. 25.

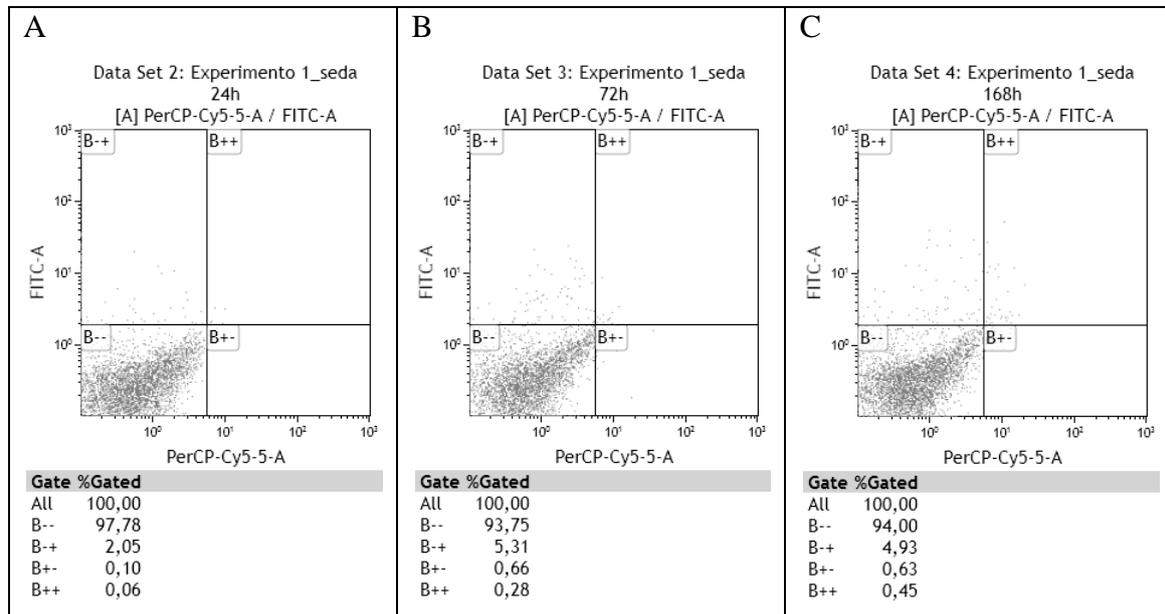


Figura 25. Análisis anexina a las 24h (25A), análisis anexina a las 72h (25B), análisis anexina a las 168h (25C).

A las 24 horas en la figura 25(A) podemos observar como el porcentaje de células vivas es del 97.78%, mientras que a las 72 horas (Fig. 25(B)), hay un pequeño descenso del número total de células vivas situándose en el 93.75%. Sin embargo, a las 168h (Fig. 25(C)) el número total de células vivas remonta ligeramente a un 94%. Estos datos nos ayudan a concluir que la fibroína de seda es un material biocompatible para las células madre procedentes de dientes deciduos.





DISCUSIÓN





5. DISCUSIÓN

La necesidad en Odontología de conseguir una preservación y reparación/regeneración pulpar implica la búsqueda de tratamientos lo más conservadores posibles. De esta forma se consigue que los dientes sean capaces de completar la formación radicular aun cuando se hayan visto afectados por necrosis o pulpitis irreversible, manteniendo el diente en boca y consiguiendo que éste siga realizando su función (190-192).

5.1 CÉLULAS MADRE EN ODONTOLOGÍA REGENERATIVA

En nuestro caso se decidió utilizar el modelo celular SHEDs ya que son las células más indiferenciadas en el ámbito oral y, por tanto, poseen una mayor capacidad proliferativa. Tienen casi el doble de potencial de duplicación celular y poseen mayor capacidad de reparación que las DPSCs (22, 193, 194). Además las SHEDs muestran una actividad de fosfatasa alcalina (ALP) superior a las DPSCs, así como una mayor diferenciación condrogénica y adipogénica (193). A su vez, las SHEDs presentan mayor plasticidad y son capaces *in vivo* de generar espontáneamente cantidades de hueso moderadas (194, 195). Hoy en día las SHEDs se consideran células madre excepcionales y son una importante, accesible y no invasiva fuente de células madre (194, 196).

En la tabla 6 se describen diversos estudios realizados con CMMs de origen dental cuyo objetivo es la regeneración y/o reparación pulpar. Entre estos estudios aparecen las SHEDs, lo que avala la elección de este modelo celular.



Tabla 6. Resumen de estudios con células madre dentales cuyo objetivo fue la reparación/regeneración dental.

Autor y año	Título	Línea Celular	Resultados	Conclusiones
Huang GT-J (2010) ⁽¹⁶⁷⁾	Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model.	DPSCs	Junto con fragmentos de raíces de dientes humanos y <i>scaffold</i> de PLG las DPSCs son capaces de inducir regeneración dentinopulpar.	Las DPSCs presentan potencial para regeneración pulpar <i>in vitro</i> .
Lee JH (2011) ⁽¹⁹⁷⁾	Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast derived factors.	DPSCs	Mediante la acción medio de cultivo preameloblástico en ratones inmunodeprimidos, DPSCs fueron capaces de diferenciarse a células similares a odontoblastos.	Las DPSCs presentan potencial para regeneración pulpar <i>in vivo</i> .
Huang GT-J (2009) ⁽⁴²⁾	The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering.	SCAPs	Se obtuvo tejido similar a la pulpa con una vascularización bien establecida y en ratones inmunodeprimidos se creó una capa continua de tejido similar a la dentina.	Las SCAPs pueden ser usadas para ingeniería de tejidos y regeneración pulpar <i>in vivo</i> .
Shi S (2005) ⁽¹⁹⁸⁾	The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental	SHEDs	Trasplantes xenogénicos con HA y SHEDS generaron tejidos parecidos a la dentina, con capas de	Las SHEDs presentan potencial para



	structures.		odontoblastos recubriendo la matriz dentinaria remineralizada	regenerar tejidos dentales humanos <i>in vivo</i> .
Cordeiro MM (2008) ⁽⁷²⁾	Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduos teeth.	SHEDs	SHEDs sembrados sobre <i>scaffolds</i> biodegradables con fragmentos de dientes humanos se diferenciaron a células similares a odontoblastos	Las SHEDs representan una fuente viable de células para la ingeniería de tejidos dentales.
Gotlieb EL (2008) ⁽¹⁹⁹⁾	An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth.	SHEDs	SHEDs cultivadas sobre <i>scaffold</i> de ácido poliláctico se implantaron en premolares humanos extraídos y endodonciados, y se comprobó que existía adherencia celular.	En endodoncia regenerativa es necesario el tratamiento de los conductos y su limpieza para que las células madre puedan adherirse y favorecen la regeneración pulpar.
Vanacker J (2014) ⁽²⁰⁰⁾	Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla.	SCAPs	SCAPs expuestas a condiciones de hipoxia (1% O ₂) son capaces de diferenciarse de forma espontánea.	Se comprueba el potencial de las SCAPs para producir regeneración dentino-pulpar incluso en situación de hipoxia.



5.2 TIPOS DE SCAFFOLDS

Los *scaffolds* son armazones tridimensionales para el crecimiento celular y se consideran necesarios para la correcta proliferación de las células madre. La búsqueda de *scaffolds* “ideales” para la regeneración tisular resulta imprescindible para el avance de la Odontología Regenerativa. En nuestro caso utilizamos un *scaffold* de fibroína de seda, debido a que se trata de un biomaterial natural que no presenta citotoxicidad y es biocompatible, con propiedades cicatrizantes y regenerativas (78, 90), que facilita la adhesión y proliferación celular (201).

Se han realizado diversos estudios con diferentes tipos de *scaffolds*. Rui Li y col. (202) en la búsqueda de un *scaffold* natural ideal usó un *scaffold* de “dentina humana” (hTDM) que fue combinado con células madres procedentes del folículo dental (DFSCs) *in vivo* durante 8 semanas, cuyo constructo se implantó en un ratón. El crecimiento, la viabilidad y la citotoxicidad de las DFSCs en la superficie del hTDM estuvieron por encima del control (fosfato cálcico). *In vivo* el constructo hTDM más células madre procedentes del folículo dental indujo y ayudó a la regeneración de los tejidos pulpares, que expresaron marcadores de dentina DSP y DMP-1. DFSCs y hTDM fueron responsables de la regeneración de los tejidos dentinarios, por lo que concluyeron que el *scaffold* de hTDM resultó ser un biomaterial ideal para la regeneración dentinaria en humanos. Tran H y col. (203) investigaron sobre el uso de *scaffolds* de dentina junto con DPSCs en ratones, dicho estudio evidenció regeneración de tejidos dentinarios, expresando marcadores específicos de dentina las DPSCs, así como matriz de dentina; además los nuevos tejidos formados mostraban anticuerpos mitocondriales humanos, por lo que concluyó que podría utilizarse en el futuro como terapia para endodoncia y traumatismos dentales de tejidos duros.

Mangano C y col. (204) realizaron otro estudio con *scaffolds* de origen natural como es el biocoral sembrado con DPSCs. A las 8, 24 y 48h de cultivo las células no se adhirieron a la superficie externa pero sí se colocaron en las cavidades internas de la estructura de biocoral. Después de 7, 15 y 30 días de cultivo, se observó que las DPSCs se encontraban en los poros del *scaffold* de biocoral, también se evidenció una secreción de matriz extracelular y diferenciación hacia osteoblastos. Se observó la formación de hueso difuso, así como que las células estaban completamente integradas en todas las



cavidades del biocoral y hubo un aumento en la expresión del gen de osteocalcina, osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP). En este estudio se concluyó que la mezcla de *scaffolds* de biocoral sembrados con DPSCs promovía la diferenciación a células similares a osteoblastos.

Zhang y col. (205) en un experimento con un constructo *scaffolds* de seda y células endoteliales, puso a prueba la capacidad de los tejidos para favorecer rápida y extensamente el proceso de vascularización. Se evidenció *in vitro* la promoción de prevascularización en los canales, facilitando así el crecimiento celular endotelial, la secreción de VEGF y la formación de tubos capilares. Cuando se implantó *in vivo*, las redes vasculares en los *scaffolds* se anastomosaron con los vasos del animal, acelerando la infiltración vascular a lo largo de toda la construcción de tejido, lo que proporcionó nutrientes suficientes para garantizar la supervivencia de células madre trasplantadas. Por lo que concluyeron que el uso de *scaffolds* de seda podría usarse de forma efectiva en la regeneración tisular con células madre.

Sarang y col. (206) realizó una búsqueda bibliográfica sobre los principales *scaffolds* existentes. Con dicha búsqueda determinó que el colágeno ofrecía ventajas respecto a otros en biocompatibilidad y bioactividad, ya que promocionaba la adhesión celular, migración celular y el crecimiento celular (207); en los estudios de DPSCs sobre estos *scaffolds* ha sido capaz de formar una matriz organizada similar al tejido pulpar (208) e incluso en un estudio *in vivo* junto a factores de crecimiento durante tres semanas la pulpa dental se revascularizó y se creó neodentina (128).

Respecto a la fibrina se ha evidenciado ser atractiva para favorecer la angiogénesis (209). En un estudio en el que usaron fibrina con factores ricos en plaquetas (FRP) en un modelo porcino, se obtuvo la formación de un diente completo, con corona, raíces, pulpa, esmalte, dentina, cemento, vasos sanguíneos y ligamento periodontal (210).

Otro de los biomateriales usados en la terapia celular ha sido el alginato. Este biomaterial ofrece una adecuada biocompatibilidad (211); además proporciona una matriz donde la regeneración pulpar y periodontal pueden llevarse a cabo, siendo útil para la liberación de factores de crecimiento (181). No obstante, su baja dureza y degradación *in vivo* incontrolable ha hecho que no se haya usado en exceso como *scaffold* (211).



En el caso del ácido hialurónico se ha descrito que se trata de un excelente y potencial *scaffold* para la regeneración de tejido, es biocompatible y posee un bajo potencial inmunogénico, pero pobres propiedades mecánicas y una degradación *in vivo* rápida, aunque puede ser controlada con la modificación química de polímeros (212); el ácido hialurónico en combinación con esponjas de colágeno ha demostrado inducir y mantener la proliferación pulpar (213).

Otro polímero natural como es el quitosán, ha demostrado ser biocompatible, biodegradable, antimicrobiano y con capacidad de cicatrizar tejidos y tener efectos osteoinductivos; presenta buenas expectativas de regeneración periodontal (214), así como de regeneración de tejido óseo (215).

La fibroína de seda mejora a todos estos materiales citados debido a su facilidad de producción, resistencia mecánica, mayor biocompatibilidad y bioactividad. (78, 90, 201)

En la tabla 7 se exponen los estudios más relevantes en cuanto al uso de *scaffolds* en odontología regenerativa.

Tabla 7. Resumen de estudios de Ingeniería Tisular Odontológica.

Autor y año	Título	Scaffold	Acción	Conclusión
Rui L (2011) ⁽²⁰²⁾	Human treated dentin matrix as a natural <i>scaffold</i> for complete human dentin tissue regeneration	<i>Scaffold</i> de dentina humana (hTDM)	hDTM indujo y ayudó a regeneración de tejidos pulpares, las DFSCs presentaron un aumento por encima del control. Juntas produjeron regeneración de tejidos dentinarios.	Biomaterial ideal para regeneración dentinaria en humanos <i>in vivo</i> .
Carlo M (2011) ⁽²⁰⁴⁾	Human dental pulp stem cells hook into biocoral <i>scaffold</i> forming an engineered biocomplex	<i>Scaffold</i> de biocoral	Diferenciación de las DPSCs hacia osteoblastos, formación de hueso difuso y células integradas en la cavidad del biocoral	Formación de osteoblastos gracias al uso de <i>scaffolds</i> de biocoral junto con DPSCs.



Zang W (2015) ⁽²⁰⁵⁾	Vascularization of hollow channel-modified porous silk <i>scaffolds</i> with endothelial cells for tissue regeneration	<i>Scaffold</i> de seda	Las redes vasculares en los <i>scaffolds</i> y el animal se anastomosaron, lo que proporcionó nutrientes suficientes para garantizar la supervivencia de células madre trasplantadas.	Podrían usarse los <i>scaffolds</i> de seda de forma efectiva en la regeneración tisular con células madre.
Sakai (2007) ⁽²¹¹⁾	S Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically cross-linkable alginate	<i>Scaffold</i> de alginato	Se comprobó que es biocompatible y no tóxico, además de una buena matriz para la liberación de factores de crecimiento	Presenta una degradación <i>in vivo</i> incontrolable, no es un buen <i>scaffold</i> para regeneración endodóntica
Ouasti (2011) ⁽²¹²⁾	S Network connectivity, mechanical properties and cell adhesion for hyaluronic acid/PEG hydrogels	<i>Scaffold</i> de ácido hialurónico	Se compararon diferentes <i>scaffold</i> de ácido hialurónico a diferentes concentraciones y pesos moleculares	Excelente y potencial <i>scaffold</i> para regeneración de tejido, biocompatible y bajo potencial inmunogénico, pobres propiedades mecánica y degradación <i>in vivo</i> rápida que puede ser controlada con polímeros.
Yang JW(2015) ⁽²¹⁶⁾	Dental pulp tissue engineering with bFGF-incorporated silk fibroin <i>scaffolds</i>	<i>Scaffolds</i> de fibroína	Junto con DPSCs, se creó tejido bien vascularizado y se creó una nueva matriz y formación de dentina, al MEB buena adhesión y proliferación de las células	Fuerte potencial terapéutico para su uso en odontología regenerativa.



5.3 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Para el estudio de la viabilidad celular, es decir, evaluar tanto la citotoxicidad como la proliferación celular existen diversos métodos *in vitro*. La prueba ideal debe tener una serie de características principales como: ser en un paso, sensible, segura, no tóxica para las células y fiable (219).

En el caso de nuestro estudio la prueba utilizada fue el ensayo de Alamar Blue (219, 220). Resazurina es el nombre original del Alamar Blue (220), se trata de un colorante que actúa como intermediario aceptando electrones en la cadena de transporte entre la reducción final del oxígeno y la citocromo-oxidasa mediante la sustitución de oxígeno molecular como aceptor de electrones (219-221). Esta reducción enzimática del colorante indica las células viables y sirve como una herramienta eficaz para evaluar la proliferación celular, además de ser una buena técnica de cribado (219). Se puede aplicar en estudios de concentración de células animales, plantas, levaduras y bacterias entre otros (219). Esta reacción produce un cambio de color en el medio de cultivo de azul a rosa, que se puede medir fácilmente. Al ser soluble en medios de cultivo, estable en solución y no destructivo para las células, su monitorización es posible, por esto se considera superior a las pruebas clásicas para la viabilidad celular como el MTT (220, 222).

Otro método es el ensayo colorimétrico de sal de tetrazolio de MTT descrito por Mosmann en 1983 (223) para medir la citotoxicidad y proliferación celular. Este método se basa en la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, un colorante amarillo que es soluble en agua y que es reducido en células viables mediante los componentes de la cadena respiratoria a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células (224, 225). Durante la investigación se intentó realizar el estudio mediante este método, pero se encontró el problema de que era necesario eliminar completamente la sustancia de MTT para no falsear los resultados y al tratarse de esponjillas porosas (*scaffolds* de fibroína) su eliminación completa era prácticamente imposible, debido a que quedaban restos de MTT entre los poros de éstas, es por ello que se decidió cambiar la prueba y se realizó un ensayo de Alamar Blue.



Diferentes autores han usado Alamar Blue para trabajos de viabilidad sobre fibroína de seda. Panda y col. (226) evaluaron tanto las propiedades mecánicas como el potencial osteogénico de un *scaffold* de fibroína de seda mediante el ensayo de Alamar Blue, comprobaron la adhesión y proliferación celular en *scaffolds* de fibroína demostrando que éstas eran mayores en los *scaffolds* que en el caso del control. Por otro lado, Yan y col. (227) evaluaron el rendimiento biológico de los *scaffolds* de seda macro y microporos frente a *scaffolds* de fosfato de calcio y nanocalcio. Gracias al uso del ensayo de Alamar Blue comprobaron que los *scaffolds* no eran citotóxicos y que podían soportar la viabilidad y proliferación de las células mesenquimales. Shi y col. (228) realizaron un estudio en el que usaron partículas de fibroína de seda con un diámetro medio de 980 nm, usando el ensayo de Alamar Blue obtuvieron una adecuada viabilidad celular en presencia de partículas de fibroína de seda. Mauney y col. (229) estudiaron diferentes biomateriales formados por fibroína de seda junto con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y médula ósea humana, usando Alamar Blue, obtuvieron una excelente tasa de viabilidad celular (>80%) en todos los tipos de biomateriales. Mieszawska y col. (230) estudiaron diversos biomateriales compuestos con proteína de seda y arcilla para la formación de tejido óseo, comprobaron la viabilidad celular mediante el ensayo de Alamar Blue dos semanas después del cultivo, concluyendo que estos sistemas pueden ser útiles para promover estudios adicionales sobre regeneración ósea.

5.4 SOBRE LA APOPTOSIS CELULAR.

Para evaluar la citotoxicidad se investigó la apoptosis/necrosis de las SHEDs cultivadas en los *scaffolds* de fibroína mediante la doble tinción celular con Anexina-V y 7-aminoactinomicina D (7-AAD), usando citometría de flujo. La primera, conjugada con un marcaje fluorescente (FITC), se utilizó como indicador de apoptosis temprana, ya que se une a la fosfatidilserina, proteína que se detecta en las membranas de células dañadas o en fases tempranas de apoptosis. Por otro lado, la 7-AAD es una molécula fluorescente con una fuerte afinidad por los ácidos nucleicos, cuya incapacidad para atravesar las membranas celulares no dañadas la hacen ideal en la determinación de mortalidad de las células en cultivo. Este método permite diferenciar tres diferentes estadios de apoptosis, lo que permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular, o bien, en una etapa tardía en la cual ya se encuentra presente la necrosis secundaria. Se diferencian: células viva (Anexina-V-/7-AAD-),



apoptosis temprana (Anexina-V+/7-AAD-) y apoptosis tardía y células necróticas (Anexina-V+/7-AAD+). Esta técnica requiere células íntegras, por lo que su uso se recomienda para estudios *in vitro* (218, 231) como es el caso de nuestro estudio.

Este ensayo ha sido usado en estudios previos como los de Rodríguez Lozano y col. (218), Wang y col. (231), Xu y col. (232). Rodríguez Lozano y col. (233) en un estudio en el que utilizaron fibroína de seda como en nuestro caso, comprobaron que la fibroína de seda y el óxido de grafeno cultivados junto con PDLSCs a tiempo final presentaban una viabilidad mayor que la muestra control además de una gran biocompatibilidad. Vera M y col. (234) realizó un estudio con PDLSCs sobre fibroína de seda y grafeno en el que pudieron concluir que las células a los diez días presentaban una viabilidad de más del 95% y concluyeron que los andamios de fibroína y grafeno podrían ser considerados unos andamios prometedores y biocompatibles que sirvan para la proliferación, viabilidad y función de las PDLSCs.

En nuestro estudio se ha utilizado esta técnica y se ha podido determinar que las SHEDs presentaban una viabilidad del 94% demostrando que la fibroína de seda es un material biocompatible para las células madre procedentes de dientes deciduos

5.5 SOBRE EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar la identificación del tipo celular usado se siguieron los criterios que recomienda la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Las CMMs deben ser plástico adherentes cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar, además de expresar los marcadores celulares CD105, CD73, CD90 y carecer de expresión de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a o CD19 y moléculas de superficie HLA-DR (235). La técnica utilizada para su identificación fue la citometría de flujo, usada de forma cotidiana para la identificación de marcadores celulares (235).

Pecci Lloret y col. (236), Rodríguez Lozano y col. (218, 233) y Vera y col. (234) utilizaron estos criterios para identificar el fenotipo de las células madre procedentes de pulpa dental (DPSCs). Vera y col. (234) para confirmar el fenotipo mesenquimal de las PDLSCs comprobaron que todos los materiales que utilizaron presentaban las moléculas de superficie CD73, CD90 y CD105 con niveles del 99'5%, mientras que la



expresión de los marcadores CD14, CD20, CD34 y CD45 fueron menor del 5%, concluyendo que estos materiales pueden ser buenos para ser utilizados como ductores de la diferenciación osteogénica en PDLSCs. Rodríguez Lozano y col. (233) comprobaron el fenotipo de las PDLSCs, siendo positivo en más del 95% para los marcadores CD73, CD90 y CD105, no alterando el nivel de expresión de éstos en 24h, 48h, 72h, 96h o 168h; siendo negativos para los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45. Pecci Lloret y col. (236) comprobaron el fenotipo de las DPSCs donde los marcadores CD73, CD90 y CD105 fueron positivos en un porcentaje muy alto, mientras que los marcadores hematopoyéticos CD20, CD34 y CD45 fueron negativos. En nuestro estudio se comprobó el fenotipo de las SHEDs donde se presentaron un 95% de resultados positivos de los marcadores mesenquimales, CD73, CD90 y CD105, mientras que sólo un 5% presentaron resultados positivos de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45

5.6 SOBRE EL ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA Y ADHERENCIA CELULAR MEDIANTE MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM por sus siglas en inglés “*Scanning Electron Microscope*”) es aquel que utiliza un haz de electrones para formar una imagen. Aporta una gran profundidad de campo y permite trabajar a altas resoluciones, lo cual conlleva la posibilidad de examinar las muestras a alta magnificación. Se pueden observar por tanto detalles del orden de nanómetros. Éste, a diferencia del microscopio óptico, sustituye la luz por el haz de electrones que barre la muestra y las lentes por electroimanes

Son muchos los autores que han utilizado el microscopio electrónico de barrido para analizar la morfología celular así como la adhesión, Pecci Lloret y col. (236) lo utilizaron para ver la presencia de DPSCs en cultivos sobre fibroína de seda en *scaffolds* y en films y poder realizar una comparativa de ambos. Zhu y col. (237) y Balto y col. (238) observaron mediante microscopía electrónica de barrido, la morfología celular y adhesión de distintas células cultivadas en presencia de MTA. Vera y col. (234) lo utilizaron para analizar la adhesión y morfología celular junto con compuestos de fibroína de seda y óxido de grafeno. A su vez, Collado-González y col. (239, 240) utilizó este método en diversos estudios con células madre derivadas del ligamento periodontal humano y células madre derivadas de dientes deciduos, comprobando tanto



la morfología como la adhesión celular. En nuestro caso hemos podido comprobar la morfología de las SHEDs sobre los *scaffolds* de fibroína de seda, así como la adhesión y proliferación de éstas a diferentes horas.

5.7 SCAFFOLDS DE FIBROÍNA PARA REGENERACIÓN

Las DPSCs junto con *scaffolds* de fibroína han demostrado ser un buen candidato para futuros tratamientos regenerativos endodónticos, así como en ingeniería tisular, ya que las células presentan buena adhesión y proliferación (216, 217). En un estudio realizado por Wen Yan y col. (216) con DPSCs y *scaffolds* de fibroína se pudo comprobar histológicamente que el tejido creado estaba bien vascularizado y a su vez, se consiguió una nueva matriz y formación de dentina. Al igual que en nuestro estudio, al microscopio electrónico de barrido se observó una buena adhesión de las células y proliferación de las mismas (216). Woloszyk y col. (217) realizaron también un estudio con DPSCs y *scaffolds* de fibroína en el cual concluyó que la combinación de ambos cultivados bajo un estímulo mecánico podría ofrecer un nuevo y prometedor enfoque para la ingeniería de tejidos óseos, donde se requiere la regeneración ósea adecuada y rápida en los tejidos estimulados mecánicamente. Rodríguez-Lozano y col. (218) realizaron una investigación en la que utilizó PDLSCs junto con films de fibroína y grafeno donde pudo concluir que la combinación de las células con los films tenía un fuerte potencial terapéutico para su uso en odontología regenerativa. Estos resultados concuerdan con los nuestros obtenidos en cuanto a proliferación y a viabilidad celular con SHEDs.

Los *scaffolds* de fibroína también han sido utilizados en medicina regenerativa, además de en odontología. En un estudio (241) fue utilizado como barrera física para la prevención de la adhesión de las hernias y los resultados fueron positivos, mejorando la curación, minimizando la adhesión, concluyéndose que era seguro y podía mejorar los resultados de la cirugía (241). También fueron óptimos los resultados en estudios realizados con *scaffolds* de fibroína junto con otros materiales como ácido poliláctico y colágeno, para promover la condrogénesis del cartílago demostrándose que era un material prometedor para la ingeniería de tejidos cartilagosos, su reparación y regeneración (242, 243). Incluso en regeneración corneal, existen estudios que demuestran que los *scaffolds* de fibroína ayudaban a la reparación de la superficie



dañada y que sus resultados eran óptimos (244). Todos estos estudios avalan el uso del *scaffold* de fibroína como muy adecuado para su uso en medicina y odontología regenerativa.

La existencia de esta nueva tendencia como es la odontología regenerativa, ha favorecido el uso de *scaffolds* (216). Los resultados obtenidos en estudios de SHEDs junto a un *scaffold* de chitosán y factor de crecimiento transformante B1 (TGFb1) mostraban una unión correcta a la estructura, mejorándose la diferenciación osteogénica. En base a esto, concluyó que era bueno para la regeneración de hueso *in vivo* (245). Otro estudio combinó un innovador periostio artificial formado por dexametasona (DEX) con alcohol de polivinilo (PVA), obtenido a partir de nanofibras de un *scaffold* poroso junto con SHEDs. El MTT demostró que era compatible y no tóxico para las SHEDS, pudiendo concluir que este *scaffold* proporciona un medio osteoinductivo a las SHEDS para su diferenciación (191).

Varios estudios *in vivo* en los que fueron utilizados *scaffolds* de plasma rico en plaquetas, el tejido pulpar pudo ser regenerado en un diente humano, por lo que se concluyó que era un *scaffold* ideal para procesos endodónticos regenerativos (192, 246).

Todos los estudios anteriormente expuestos demuestran que la regeneración pulpar es posible, por lo que nosotros con este estudio, hemos querido comprobar la biocompatibilidad de un *scaffold* de fibroína de seda junto con SHEDs, al ser esta una sustancia que se caracteriza por sus propiedades regenerativas y su eficacia ha sido demostrada en medicina regenerativa, pero en odontología no existen estudios en la actualidad, que hayan comprobado su utilidad en este tipo de tratamientos.





CONCLUSIONES





6 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. Es posible establecer un cultivo primario a partir de células madre de dientes deciduos.
2. La obtención de un *scaffold* a partir de fibroína de seda es un proceso relativamente sencillo y reproducible.
3. Las SHEDs mantienen su morfología y se adhieren al *scaffold* con facilidad.
4. Las SHEDs son capaces de proliferar sobre un *scaffold* de fibroína de seda con resultados de proliferación similares a las células sin *scaffold* aunque puedan requerir más tiempo.
5. La citometría de flujo demuestra la viabilidad celular de las SHEDs.
6. El *scaffold* de fibroína no cambia los marcadores de membrana estudiados de las SHEDs cuando proliferan sobre él.
7. El *scaffold* tampoco induce la apoptosis de las SHEDs que son incubadas en él.
8. Como conclusión final, el *scaffold* de fibroína resulta biocompatible para las SHEDs.





BIBLIOGRAFÍA





7 BIBLIOGRAFÍA

1. García-Barbero J. Patología y Terapéutica Dental. 2^a. Madrid: Síntesis; 2005. 42-58 p.
2. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;(100):157-68.
3. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Ruiz F, Bonilla S et al. Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transpl Immunol*. 2006;(17):74-7.
4. Blanquer M, Moraleda JM, Iniesta F, Gómez-Espuch J, Meca-Lallana J, Villaverde R et al. Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study. *Stem Cells*. 2012;(30):1277-85.
5. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2001;19(3):180-92.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
7. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 2003;(21):759-806.
8. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(4):1209-21.
9. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. SHEDS: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-12.
10. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
11. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
12. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS One*. 2006;1:e79.
13. Yamaza T, Ren G, Akiyama K, Chen C, Shi Y, Shi S. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2011;90(3):317-24.



14. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2009;183(12):7787-98.
15. Zavan B, Bressan E, editores. *Dental Stem Cells: Regenerative Potential* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 9 de octubre de 2016]. (Stem Cell Biology and Regenerative Medicine). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-33299-4>
16. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000. 2000;24:253-69.
17. Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, Ma ZF, Xu L, Wu JJ et al. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J Periodontal Res.* 2009;44(2):199-210.
18. Ripamonti U, Petit JC, Teare J. Cementogenesis and the induction of periodontal tissue regeneration by the osteogenic proteins of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Periodontal Res.* 2009;44(2):141-52.
19. McGuire MK, Scheyer ET, Nunn ME, Lavin PT. A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J Periodontol.* 2008;79(10):1847-56.
20. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10(3):149-60.
21. Huang C-YC, Pelaez D, Dominguez-Bendala J, Bendala JD, Garcia-Godoy F, Cheung HS. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regen Med.* 2009;4(6):809-21.
22. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, et al. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2015;33(3):627-38.
23. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18(3):487-96.
24. Morszeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005;24(2):155-65.
25. Morszeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int.* 2005;29(7):267-75.



26. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol.* 2002;13(4):323-34.
27. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.* 2008;12(2):113-8.
28. Morsczeck C, Petersen J, Völlner F, Driemel O, Reichert T, Beck HC. Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells. *Electrophoresis.* 2009;30(7):1175-84.
29. Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev.* 2006;15(4):595-608.
30. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008;87(8):767-71.
31. Morsczeck C, Ernst W, Florian C, Reichert TE, Proff P, Bauer R et al. Gene expression of nestin, collagen type I and type III in human dental follicle cells after cultivation in serum-free medium. *Oral Maxillofac Surg.* 2008;12(2):89-92.
32. Wu J, Jin F, Tang L, Yu J, Xu L et al. Dentin non-collagenous proteins (dNCPs) can stimulate dental follicle cells to differentiate into cementoblast lineages. *Biol Cell.* 2008;100(5):291-302.
33. Tsuchiya S, Honda MJ, Shinohara Y, Saito M, Ueda M. Collagen type I matrix affects molecular and cellular behavior of purified porcine dental follicle cells. *Cell Tissue Res.* 2008;331(2):447-59.
34. Kémoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007;329(2):283-94.
35. Morsczeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2006;78(2):98-102.
36. Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(2):329-35.
37. Yagyuu T, Ikeda E, Ohgushi H, Tadokoro M, Hirose M, Maeda M, et al. Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla. *Arch Oral Biol.* 2010;55(1):68-76.
38. Morsczeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDS) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 2010;14(4):433-40.



39. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.
40. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol.* 2010;223(2):415-22.
41. Abe S, Yamaguchi S, Watanabe A, Hamada K, Amagasa T. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;371(1):90-3.
42. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6):645-51.
43. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806.
44. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 2010;20(12):715-22.
45. Mayo V, Sawatari Y, Huang C-YC, Garcia-Godoy F. Neural crest-derived dental stem cells--where we are and where we are going. *J Dent.* 2014;42(9):1043-51.
46. Palmer RM, Lubbock MJ. The soft connective tissues of the gingiva and periodontal ligament: are they unique? *Oral Dis.* 1995;1(4):230-7.
47. Irwin CR, Picardo M, Ellis I, Sloan P, Grey A, McGurk M, et al. Inter- and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-like phenotypic characteristics by gingival fibroblasts: potential significance for wound healing. *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 5):1333-46.
48. Gao Y, Zhao G, Li D, Chen X, Pang J, Ke J. Isolation and multiple differentiation potential assessment of human gingival mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):20982-96.
49. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393(3):377-83.
50. Jin SH, Lee JE, Yun J-H, Kim I, Ko Y, Park JB. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue. *J Periodontal Res.* 2015;50(4):461-7.
51. Ge S, Mrozik KM, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. *Regen Med.* 2012;7(6):819-32.



52. Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierro FS, et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J Periodontol*. 2010;81(6):917-25.
53. Xu X, Chen C, Akiyama K, Chai Y, Le AD, Wang Z, et al. Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2013;92(9):825-32.
54. Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol*. 2011;226(3):832-42.
55. Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, et al. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells Dev*. 2011;20(12):2093-102.
56. Dokić J, Tomić S, Cerović S, Todorović V, Rudolf R, Colić M. Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *J Clin Periodontol*. 2012;39(9):807-16.
57. Dokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Colić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2013;43(7):1862-72.
58. Davies LC, Locke M, Webb RDJ, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, et al. A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem Cells Dev*. 2010;19(6):819-30.
59. Davies LC, Lönnies H, Locke M, Sundberg B, Rosendahl K, Götherström C, et al. Oral mucosal progenitor cells are potently immunosuppressive in a dose-independent manner. *Stem Cells Dev*. 2012;21(9):1478-87.
60. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*. 2005;20(8):1394-402.
61. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2006;206(3):693-701.
62. Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, De Francesco F, Giordano A, Laino G et al. *Scaffold's* surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2008;214(1):166-72.
63. Okamoto Y, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K et al. Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *J Endod*. 2009;35(3):367-72.
64. Carinci F, Papaccio G, Laino G, Palmieri A, Brunelli G, D'Aquino R et al. Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells. *J Craniofac Surg*. 2008;19(3):616-25.



65. Armiñán A, Gandia C, Bartual C, Garcia-Verdugo JM, Lledó E, Mirabet V et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18(6):907-18.
66. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem.* 2007;282(19):14243-52.
67. Gandia C, Armiñán A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells.* 2008;26(3):638-45.
68. Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T, et al. Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor. *Eur J Neurosci.* 2008;27(3):538-48.
69. Rosenbaum AJ, Grande DA, Dines JS. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. *Organogenesis.* 2008;4(1):23-7.
70. Pivoriūnas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzevicius D, Treigyte G, Savickiene J, et al. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev.* 2010;19(7):1081-93.
71. Suchánek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancaková R, Mokřý J, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2010;53(2):93-9.
72. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 2008;34(8):962-9.
73. Seo B.M, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K et al. SHEDS repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.* 2008;14(5):428-34.
74. Zheng Y, Wang XY, Wang YM, Liu XY, Zhang CM, Hou BX, et al. Dentin regeneration using deciduous pulp stem/progenitor cells. *J Dent Res.* 2012;91(7):676-82.
75. Y Z, Liu Y, Zhang C, Zhang H, Li W, Shi S et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *J Dent Res.* 2009;88(3):249-54.
76. Fu X, Jin L, Ma P, Fan Z, Wang S. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. *J Periodontol.* 2014;85(6):845-51.
77. Chiarini A, Petrini P, Bozzini S, Dal Pra I, Armato U. Silk fibroin/poly(carbonate)-urethane as a substrate for cell growth: in vitro interactions with human cells. *Biomaterials.* 2003;24(5):789-99.



78. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24(3):401-16.
79. Kaplan DL, Adams WW, Farmer B, Viney C. Silk-biology, structure, properties, and genetics. *Acs Symp Ser*. 1994;544:2-16.
80. María de los Ángeles García Pérez. Elaboración de mallas electrohiladas de fibroína de seda con óxido de grafeno y evaluación de su biocompatibilidad con la línea celular L929. Estudio preliminar. Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria. Murcia.; 2014.
81. Sprague KU. The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry (Mosc)*. 1975;14(5):925-31.
82. Hofmann S, Foo CTWP, Rossetti F, Textor M, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, et al. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2006;111(1-2):219-27.
83. Min BM, Jeong L, Lee KY, Park WH. Regenerated silk fibroin nanofibers: water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells. *Macromol Biosci*. 2006;6(4):285-92.
84. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):457-70.
85. Rajkhowa R, Gupta VB, Kothari VK. Tensile stress–strain and recovery behavior of Indian silk fibers and their structural dependence. *J Appl Polym Sci*. 2000;77(11):2418-29.
86. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mater Sci Mater Med*. 1992;3(6):432-46.
87. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim H-J, Kim HS, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin *scaffolds*. *Biomaterials*. septiembre de 2008;29(24-25):3415-28.
88. Murphy AR, Kaplan DL. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J Mater Chem*. 2009;19(36):6443-50.
89. Tsubouchi K, Nakao H, Igarashi I, Takasu Y, Yamada H. *Bombyx mori* fibroin enhanced the proliferation of cultured human skin fibroblasts. *J Insect Biotechnol*. 2003;72:65-9.
90. Kimura T, Yamada H, Tsubochi K, Doi K. Accelerating Effects of Silk Fibroin on Wound Healing in Hairless Descendants of Mexican Hairless Dogs. *J Appl Sci*. 2007;3(11):1306-14.
91. Fini M, Motta A, Torricelli P, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Tschon M, et al. The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. *Biomaterials*. 2005;26(17):3527-36.



92. Roh DH, Kang SY, Kim JY, Kwon YB, Young Kweon H, Lee KG, et al. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(6):547-52.
93. Sugihara A, Sugiura K, Morita H, Ninagawa T, Tubouchi K, Tobe R, et al. Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 2000;225(1):58-64.
94. Schneider A, Wang XY, Kaplan DL, Garlick JA, Egles C. Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomater*. 2009;5(7):2570-8.
95. Yamada H, Igarashi Y, Takasu Y, Saito H, Tsubouchi K. Identification of fibroin-derived peptides enhancing the proliferation of cultured human skin fibroblasts. *Biomaterials*. 2004;25(3):467-72.
96. Martínez-Mora C, Mrowiec A, García-Vizcaíno EM, Alcaraz A, Cenis JL, Nicolás FJ. Fibroin and sericin from *Bombyx mori* silk stimulate cell migration through upregulation and phosphorylation of c-Jun. *PloS One*. 2012;7(7):e42271.
97. Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B, et al. Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J Orofac Pain*. 2010;24(4):335-49.
98. Staquet M-J, Carrouel F, Keller J-F, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Pattern-recognition receptors in pulp defense. *Adv Dent Res*. 2011;23(3):296-301.
99. Bjørndal L. The caries process and its effect on the pulp: the science is changing and so is our understanding. *Pediatr Dent*. 2008;30(3):192-6.
100. Fouad AF, Verma P. Healing after regenerative procedures with and without pulpal infection. *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S58-64.
101. Mohammadi Z. Strategies to manage permanent non-vital teeth with open apices: a clinical update. *Int Dent J*. 2011;61(1):25-30.
102. Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endod J*. 2006;39(6):429-42.
103. Cox CF, Tarim B, Kopel H, Gürel G, Hafez A. Technique sensitivity: biological factors contributing to clinical success with various restorative materials. *Adv Dent Res*. 2001;15:85-90.
104. Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S41-45.
105. Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J*. 2013;46(1):3-19.
106. Stéphane RJ, Phillip L, Ariane B. Regenerative Endodontics: Regeneration or Repair? *JOE*. 2014;40(4):70-5.



107. Bjørndal L, Demant S, Dabelsteen S. Depth and activity of carious lesions as indicators for the regenerative potential of dental pulp after intervention. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S76-81.
108. Schmalz G, Smith AJ. Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S2-5.
109. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol.* 2012;28(2):88-96.
110. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol.* 1995;11(2):59-68.
111. Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, et al. [International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 1. Fractures and luxations of permanent teeth. Hebrew edition]. *Refuat Ha-Peh Veba-Shinayim* 1993. 2014;31(2):42-55, 89.
112. Paulsen HU, Andreasen JO, Schwartz O. Pulp and periodontal healing, root development and root resorption subsequent to transplantation and orthodontic rotation: a long-term study of autotransplanted premolars. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod.* 1995;108(6):630-40.
113. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand.* 1961;19:324-53.
114. Trope M. Letters to editor: reply. *J Endod.* 2008;34:511.
115. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *J Endod.* 2008;34(7 Suppl):S13-17.
116. Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV. In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J Biol Buccale.* 1990;18(2):123-9.
117. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol.* 1992;36(4):491-503.
118. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res.* 2010;89(6):603-8.
119. Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in



- vivo implantation of dentine matrix components. Arch Oral Biol. 1995;40(10):883-93.
120. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. J Endod. 2014;40(4 Suppl):S52-57.
 121. Peters OA. Translational opportunities in stem cell-based endodontic therapy: where are we and what are we missing? J Endod. 2014;40(4 Suppl):S82-85.
 122. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. J Endod. 2012;38(10):1372-5.
 123. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. Biomaterials. 2006;27(14):2865-73.
 124. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. J Dent. 2007;35(8):636-42.
 125. Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. Adv Dent Res. 2001;15:51-4.
 126. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. Arch Oral Biol. 2012;57(2):109-21.
 127. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. Arch Oral Biol. 2000;45(11):1013-6.
 128. Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. Tissue Eng Part A. 2010;16(10):3023-31.
 129. Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR. Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components. Exp Cell Res. 2012;318(18):2397-406.
 130. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. Histochem J. 2000;32(8):489-94.
 131. Farges J-C, Romeas A, Melin M, Pin J-J, Lebecque S, Lucchini M, et al. TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. J Dent Res. 2003;82(8):652-6.
 132. Baker SM, Sugars RV, Wendel M, Smith AJ, Waddington RJ, Cooper PR, et al. TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity. Calcif Tissue Int. 2009;85(1):66-74.



133. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012;45(5):439-48.
134. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Dentin matrix component solubilization by solutions of pH relevant to self-etching dental adhesives. *J Adhes Dent*. 2013;15(5):407-12.
135. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after «one-visit» endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(2):231-52.
136. Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod*. 2005;31(6):439-43.
137. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*. 2007;29(1):47-50.
138. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol*. 2001;17(4):185-7.
139. Nosrat A, Li KL, Vir K, Hicks ML, Fouad AF. Is pulp regeneration necessary for root maturation? *J Endod*. 2013;39(10):1291-5.
140. Jungermann GB, Burns K, Nandakumar R, Tolba M, Venezia RA, Fouad AF. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. *J Endod*. 2011;37(10):1337-44.
141. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod*. 2003;29(1):44-7.
142. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod*. 2011;37(2):133-8.
143. Paryani K, Kim SG. Regenerative endodontic treatment of permanent teeth after completion of root development: a report of 2 cases. *J Endod*. 2013;39(7):929-34.
144. Verma P, Fouad AF. What is the public health need for regenerative endodontics? *J Endod*. 2012;38:e47.
145. Piva E, Silva AF, Nör JE. Functionalized *scaffolds* to control dental pulp stem cell fate. *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S33-40.
146. Lavik E, Langer R. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;65(1):1-8.
147. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.



148. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of *scaffolds* for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* 2001;7(6):679-89.
149. Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. Bioabsorbable polymer *scaffolds* for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2000;64(1-3):91-102.
150. Golub JS, Kim Y, Duvall CL, Bellamkonda RV, Gupta D, Lin AS, et al. Sustained VEGF delivery via PLGA nanoparticles promotes vascular growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(6):H1959-1965.
151. Fujiwara S, Kumabe S, Iwai Y. Isolated rat dental pulp cell culture and transplantation with an alginate *scaffold*. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2006;83(1):15-24.
152. Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998;9(7):749-64.
153. Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Ansari S, Xu X, Chee WW, et al. Alginate hydrogel as a promising *scaffold* for dental-derived stem cells: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(12):3041-51.
154. Moshaverinia A, Ansari S, Chen C, Xu X, Akiyama K, Snead ML, et al. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2013;34(28):6572-9.
155. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol.* 2001;12(5):425-37.
156. Keller L-V, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Restoring physiological cell heterogeneity in the mesenchyme during tooth engineering. *Int J Dev Biol.* 2012;56(9):737-46.
157. Nait Lechguer A, Couble ML, Labert N, Kuchler-Bopp S, Keller L, Magloire H, et al. Cell differentiation and matrix organization in engineered teeth. *J Dent Res.* 2011;90(5):583-9.
158. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997;67(2):111-23.
159. Chai Y, Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. *Microsc Res Tech.* 2003;60(5):469-79.
160. Sharpe PT, Young CS. Test-tube teeth. *Sci Am.* 2005;293(2):34-41.
161. Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(1-2):176-84.



162. Zieris A, Prokoph S, Levental KR, Welzel PB, Grimmer M, Freudenberg U, et al. FGF-2 and VEGF functionalization of starPEG-heparin hydrogels to modulate biomolecular and physical cues of angiogenesis. *Biomaterials*. 2010;31(31):7985-94.
163. Gebhardt M, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Cell survival within pulp and periodontal constructs. *J Endod*. 2009;35(1):63-6.
164. Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog*. 1996;12(6):865-8.
165. El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid *scaffold* construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J J Aust Soc Endodontology Inc*. 2008;34(2):52-67.
166. Moioli EK, Clark PA, Xin X, Lal S, Mao JJ. Matrices and *scaffolds* for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4-5):308-24.
167. Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):605-15.
168. Cantón I, Mckean R, Charnley M, Blackwood KA, Fiorica C, Ryan AJ, et al. Development of an Ibuprofen-releasing biodegradable PLA/PGA electrospun *scaffold* for tissue regeneration. *Biotechnol Bioeng*. 2010;105(2):396-408.
169. Murua A, Herran E, Orive G, Igartua M, Blanco FJ, Pedraz JL, et al. Design of a composite drug delivery system to prolong functionality of cell-based *scaffolds*. *Int J Pharm*. 2011;407(1-2):142-50.
170. Bae SE, Son JS, Park K, Han DK. Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2009;133(1):37-43.
171. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schäfer U, Takeuchi H, Maincent P, et al. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(2):775-81.
172. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2012;161(2):505-22.
173. Colombo JS, Moore AN, Hartgerink JD, D'Souza RN. *Scaffolds* to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S6-12.



174. Huang GT-J, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res.* 2006;324(2):225-36.
175. Nakao K, Itoh M, Tomita Y, Tomooka Y, Tsuji T. FGF-2 potently induces both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of adult incisor immature pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(3):1052-9.
176. Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, et al. A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(7):521-33.
177. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev.* 2001;101(7):1869-79.
178. Yuan Z, Nie H, Wang S, Lee CH, Li A, Fu SY, et al. Biomaterial selection for tooth regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011;17(5):373-88.
179. Park K-H, Kim H, Moon S, Na K. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 2009;108(6):530-7.
180. Galler KM, Cavender AC, Koeklue U, Suggs LJ, Schmalz G, D'Souza RN. Bioengineering of dental stem cells in a PEGylated fibrin gel. *Regen Med.* 2011;6(2):191-200.
181. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):387-90.
182. Chung HJ, Kim HK, Yoon JJ, Park TG. Heparin immobilized porous PLGA microspheres for angiogenic growth factor delivery. *Pharm Res.* 2006;23(8):1835-41.
183. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012;37(1):106-26.
184. Tønnesen HH, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28(6):621-30.
185. Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A, et al. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16(6):491-501.
186. Jeong SI, Krebs MD, Bonino CA, Khan SA, Alsberg E. Electrospun alginate nanofibers with controlled cell adhesion for tissue engineering. *Macromol Biosci.* 2010;10(8):934-43.



187. Holladay CA, Duffy AM, Chen X, Sefton MV, O'Brien TD, Pandit AS. Recovery of cardiac function mediated by MSC and interleukin-10 plasmid functionalised *scaffold*. *Biomaterials*. 2012;33(5):1303-14.
188. Lakshmi TSR, Shanmugasundaram N, Shanmuganathan S, Babu M. Efficacy of desulfated heparin mitigating inflammation in rat burn wound model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;97(2):215-23.
189. Johnson PJ, Tatara A, Shiu A, Sakiyama-Elbert SE. Controlled release of neurotrophin-3 and platelet-derived growth factor from fibrin *scaffolds* containing neural progenitor cells enhances survival and differentiation into neurons in a subacute model of SCI. *Cell Transplant*. 2010;19(1):89-101.
190. Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AAR, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocol. *J Endod*. 2014;40(2):192-8.
191. Su W-T, Chiou W-L, Yu H-H, Huang T-Y. Differentiation potential of SHEDs using biomimetic periosteum containing dexamethasone. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;58:1036-45.
192. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod*. 2011;37(2):265-8.
193. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016;45(1):124-31.
194. Daltoé FP, Mendonça PP, Mantesso A, Deboni MCZ. Can SHEDS or DPSCs be used to repair/regenerate non-dental tissues? A systematic review of in vivo studies. *Braz Oral Res*. 2014;28.
195. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning Adv Appl*. 2014;7:89-99.
196. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDS): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent*. 2009;33(4):289-94.
197. Lee J-H, Lee D-S, Choung H-W, Shon W-J, Seo B-M, Lee E-H, et al. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors. *Biomaterials*. 2011;32(36):9696-706.
198. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(3):191-9.



199. Gotlieb EL, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. *J Am Dent Assoc* 1939. 2008;139(4):457-65.
200. Vanacker J, Viswanath A, De Berdt P, Everard A, Cani PD, Bouzin C, et al. Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. *J Endod*. 2014;40(9):1410-8.
201. Mandal BB, Grinberg A, Gil ES, Panilaitis B, Kaplan DL. High-strength silk protein *scaffolds* for bone repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20):7699-704.
202. Li R, Guo W, Yang B, Guo L, Sheng L, Chen G, et al. Human treated dentin matrix as a natural *scaffold* for complete human dentin tissue regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(20):4525-38.
203. Ha Le Bao, Doan, Vu Nguyen. Human dental pulp stem cells cultured onto dentin derived *scaffold* can regenerate dentin-like tissue in vivo. *Cell Tissue Bank*. 2015;
204. Mangano C, Paino F, d'Aquino R, De Rosa A, Iezzi G, Piattelli A, et al. Human dental pulp stem cells hook into biocoral *scaffold* forming an engineered biocomplex. *PloS One*. 2011;6(4):e18721.
205. Zhang W, Wray LS, Rnjak-Kovacina J, Xu L, Zou D, Wang S, et al. Vascularization of hollow channel-modified porous silk *scaffolds* with endothelial cells for tissue regeneration. *Biomaterials*. 2015;56:68-77.
206. Sharma S, Srivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2014;8(1):309-15.
207. Wu X, Black L, Santacana-Laffitte G, Patrick CW. Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81(1):59-65.
208. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen *scaffold*, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008;34(4):421-6.
209. Ehrbar M, Djonov VG, Schnell C, Tschanz SA, Martiny-Baron G, Schenk U, et al. Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res*. 2004;94(8):1124-32.
210. Yang KC, Wang CH, Chang HH, Chan WP, Chi CH, Kuo TF. Fibrin glue mixed with platelet-rich fibrin as a *scaffold* seeded with dental bud cells for tooth regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012;6(10):777-85.
211. Sakai S, Kawakami K. Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically cross-linkable alginate. *Acta Biomater*. 2007;3(4):495-501.



212. Ouasti S, Donno R, Cellesi F, Sherratt MJ, Terenghi G, Tirelli N. Network connectivity, mechanical properties and cell adhesion for hyaluronic acid/PEG hydrogels. *Biomaterials*. 2011;32(27):6456-70.
213. Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, et al. Effects of hyaluronic acid sponge as a *scaffold* on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92(1):120-8.
214. Boynueğri D, Ozcan G, Senel S, Uç D, Uraz A, Oğuş E, et al. Clinical and radiographic evaluations of chitosan gel in periodontal intraosseous defects: a pilot study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90(1):461-6.
215. Tanase CE, Sartoris A, Popa MI, Verestiuc L, Unger RE, Kirkpatrick CJ. In vitro evaluation of biomimetic chitosan-calcium phosphate *scaffolds* with potential application in bone tissue engineering. *Biomed Mater Bristol Engl*. 2013;8(2):025002.
216. Yang JW, Zhang YF, Sun ZY, Song GT, Chen Z. Dental pulp tissue engineering with bFGF-incorporated silk fibroin *scaffolds*. *J Biomater Appl*. 2015;
217. Woloszyk A, Holsten Dircksen S, Bostanci N, Müller R, Hofmann S, Mitsiadis TA. Influence of the mechanical environment on the engineering of mineralised tissues using human dental pulp stem cells and silk fibroin *scaffolds*. *PloS One*. 2014;9(10):e111010.
218. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Aznar-Cervantes S, Ros-Roca MA, Algueró MC, Atucha NM, et al. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(12):2731-41.
219. Czekanska EM. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;740:27-32.
220. Xiao J, Zhang Y, Wang J, Yu W, Wang W, Ma X. Monitoring of cell viability and proliferation in hydrogel-encapsulated system by resazurin assay. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;162(7):1996-2007.
221. Page B, Page M, Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol*. 1993;3(3):473-6.
222. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2004;18(5):703-10.
223. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
224. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986;94(1-2):57-63.



225. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*. 1990;131(2):165-72.
226. Panda NN, Biswas A, Pramanik K, Jonnalagadda S. Enhanced osteogenic potential of human mesenchymal stem cells on electrospun nanofibrous *scaffolds* prepared from eri-tasar silk fibroin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015;103(5):971-82.
227. Yan L-P, Oliveira JM, Oliveira AL, Reis RL. In vitro evaluation of the biological performance of macro/micro-porous silk fibroin and silk-nano calcium phosphate *scaffolds*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015;103(4):888-98.
228. Shi P, Goh JCH. Release and cellular acceptance of multiple drugs loaded silk fibroin particles. *Int J Pharm*. 2011;420(2):282-9.
229. Mauney JR, Nguyen T, Gillen K, Kirker-Head C, Gimble JM, Kaplan DL. Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D *scaffolds*. *Biomaterials*. 2007;28(35):5280-90.
230. Mieszawska AJ, Llamas JG, Vaiana CA, Kadakia MP, Naik RR, Kaplan DL. Clay enriched silk biomaterials for bone formation. *Acta Biomater*. 2011;7(8):3036-41.
231. Wang X, Qi N, Ma S, Yan Z-L, Wu Q-Y, Wang L, et al. [Effect of BRD4 Inhibitor GSK525762A on Proliferation and Apoptosis of SUP-B15 Cells In Vitro and Its Possible Mechanism]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2016;24(6):1654-8.
232. Xu H, Li J, Zhao Y, Liu D. TNF α -induced downregulation of microRNA-186 contributes to apoptosis in rat primary cardiomyocytes. *Immunobiology*. 2017;
233. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Aznar-Cervantes S, Ros-Roca MA, Algueró MC, Atucha NM, et al. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. diciembre de 2014;25(12):2731-41.
234. Vera-Sánchez M, Aznar-Cervantes S, Jover E, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Hernández-Romero D, et al. Silk-Fibroin and Graphene Oxide Composites Promote Human Periodontal Ligament Stem Cell Spontaneous Differentiation into Osteo/Cementoblast-Like Cells. *Stem Cells Dev*. 2016;25(22):1742-54.
235. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
236. Pecci-Lloret MP, Vera-Sánchez M, Aznar-Cervantes S, García-Bernal D, Sánchez RO, Pecci-Lloret MR, et al. Analysis of the Adherence of Dental Pulp Stem Cells on Two-Dimensional and Three-Dimensional Silk Fibroin-Based Biomaterials: Applications in Regenerative Dentistry. *J Craniofac Surg*. 2017;



237. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod.* 2000;26(7):404-6.
238. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 2004;30(1):25-9.
239. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Álvarez Muro T, Lozano A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *Int Endod J.* 2017;
240. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Lozano A, Forner L, et al. Biocompatibility of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells. *Int Endod J.* 2016;
241. Konar S, Guha R, Kundu B, Nandi S, Ghosh TK, Kundu SC, et al. Silk fibroin hydrogel as physical barrier for prevention of post hernia adhesion. *Hernia J Hernias Abdom Wall Surg.* 2016;
242. Li Z, Liu P, Yang T, Sun Y, You Q, Li J, et al. Composite poly(l-lactic-acid)/silk fibroin *scaffold* prepared by electrospinning promotes chondrogenesis for cartilage tissue engineering. *J Biomater Appl.* 2016;30(10):1552-65.
243. Wang J, Yang Q, Cheng N, Tao X, Zhang Z, Sun X, et al. Collagen/silk fibroin composite *scaffold* incorporated with PLGA microsphere for cartilage repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;61:705-11.
244. Hazra S, Nandi S, Naskar D, Guha R, Chowdhury S, Pradhan N, et al. Non-mulberry Silk Fibroin Biomaterial for Corneal Regeneration. *Sci Rep.* 2016;6:21840.
245. Farea M, Husein A, Halim AS, Abdullah NA, Mokhtar KI, Lim CK, et al. Synergistic effects of chitosan *scaffold* and TGF β 1 on the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. *Arch Oral Biol.* 2014;59(12):1400-11.
246. Torabinejad M, Faras H. A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod.* 2012;38(6):864-8.





ANEXOS





ANEXO 1

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D., y con DNI nº y Doña, con DNI nº..... como tutores de, menor de edad, manifiestan que han sido informados sobre los beneficios que podría suponer la extracción y donación de un diente decíduo para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado “POTENCIALIDAD DE LA FIBROÍNA DE SEDA COMO *SCAFFOLD* PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN PULPAR”, dirigido por D. Francisco Javier Rodríguez Lozano, teléfono de contacto: 609406624 y correo electrónico: fcojavier@um.es, con el fin de mejorar los tratamientos de regeneración o reparación en dientes con la pulpa afectada.

He sido informado/a de las pruebas que van a ser realizadas pretenden determinar la biocompatibilidad de la fibroína de seda con células madre de dientes deciduos

He sido informado de que los datos y la información que se recojan y traten durante la investigación serán dissociados.

He sido también informado de que puedo abandonar en cualquier momento mi participación en el estudio sin dar explicaciones y sin que ello me suponga perjuicio alguno.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a esta extracción y donación y a que sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

XXX, a XX de XXXXX de 20XX.

Fdo. D/Dña.



ANEXO 2

HOJA DE INFORMACIÓN A LA PERSONA PARTICIPANTE

Sobre el proyecto **POTENCIALIDAD DE LA FIBROÍNA DE SEDA COMO *SCAFFOLD* PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN PULPAR**

Estimado Sr. o Sra.:

Le invitamos a participar en un estudio de investigación sobre **POTENCIALIDAD DE LA FIBROÍNA DE SEDA COMO *SCAFFOLD* PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN PULPAR**.

Objetivos

El estudio **POTENCIALIDAD DE LA FIBROÍNA DE SEDA COMO *SCAFFOLD* PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN PULPAR** pretende determinar la biocompatibilidad de la fibroína de seda con células madre de dientes deciduos.

Datos de los investigadores

Ante cualquier duda o renuncia que pueda surgir en relación con su participación en la presente investigación, pueden dirigirse a la persona responsable de la misma, cuyos datos son los siguientes:

- Nombre: María Pilar Pecci Lloret
- Cargo: Doctoranda
- Dirección de contacto: Avenida Victoria, 8, 5B, 30.007 MURCIA
- Correo electrónico: mpilar.pecci@gmail.com
- Teléfono de contacto: 620105033

Uso confidencial de los datos

Los datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que estará sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre de protección de datos personales.

Derecho de la persona a retirarse del estudio

Puede abandonar en cualquier momento su participación en el estudio sin tener que dar explicaciones y sin que ello suponga perjuicio alguno.

En consecuencia, le solicitamos que firme y entregue la hoja de consentimiento informado que se adjunta.

Firmado: En nombre del equipo investigador, María Pilar Pecci Lloret.



ANEXO 3

INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

UNIVERSIDAD DE MURCIA | Vicerrectorado de Investigación

CEI Comisión de Ética de Investigación

CAMPUS MARE NOSTRUM

INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que D^a. María Pilar Pecci Lloret ha presentado la Tesis Doctoral titulada "Potencialidad de la fibroína de seda como *scaffold* para reparación y regeneración pulpar", dirigida por el Dr. D. Francisco Javier Rodríguez Lozano y el Dr. D. Ricardo Elías Oñate Sánchez a la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día 13 de enero de 2017¹, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión

Vº Bº

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Antonio Juan García Fernández

ID: 1417/2016

¹ A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

Firmante: JAMIE PERIS RIERA. Fecha hora: 2017/01/13 13:38:26. Emisor del certificado: CN=AC FMMT Usuarios,OU=Campus Mare Nostrum,OU=FMMT,OU=ES. Firmante: ANTONIO JUAN GARCIA FERNANDEZ. Fecha hora: 2017/01/13 14:50:33. Emisor del certificado: CN=AC FMMT Usuarios,OU=Campus Mare Nostrum,OU=FMMT,OU=ES.

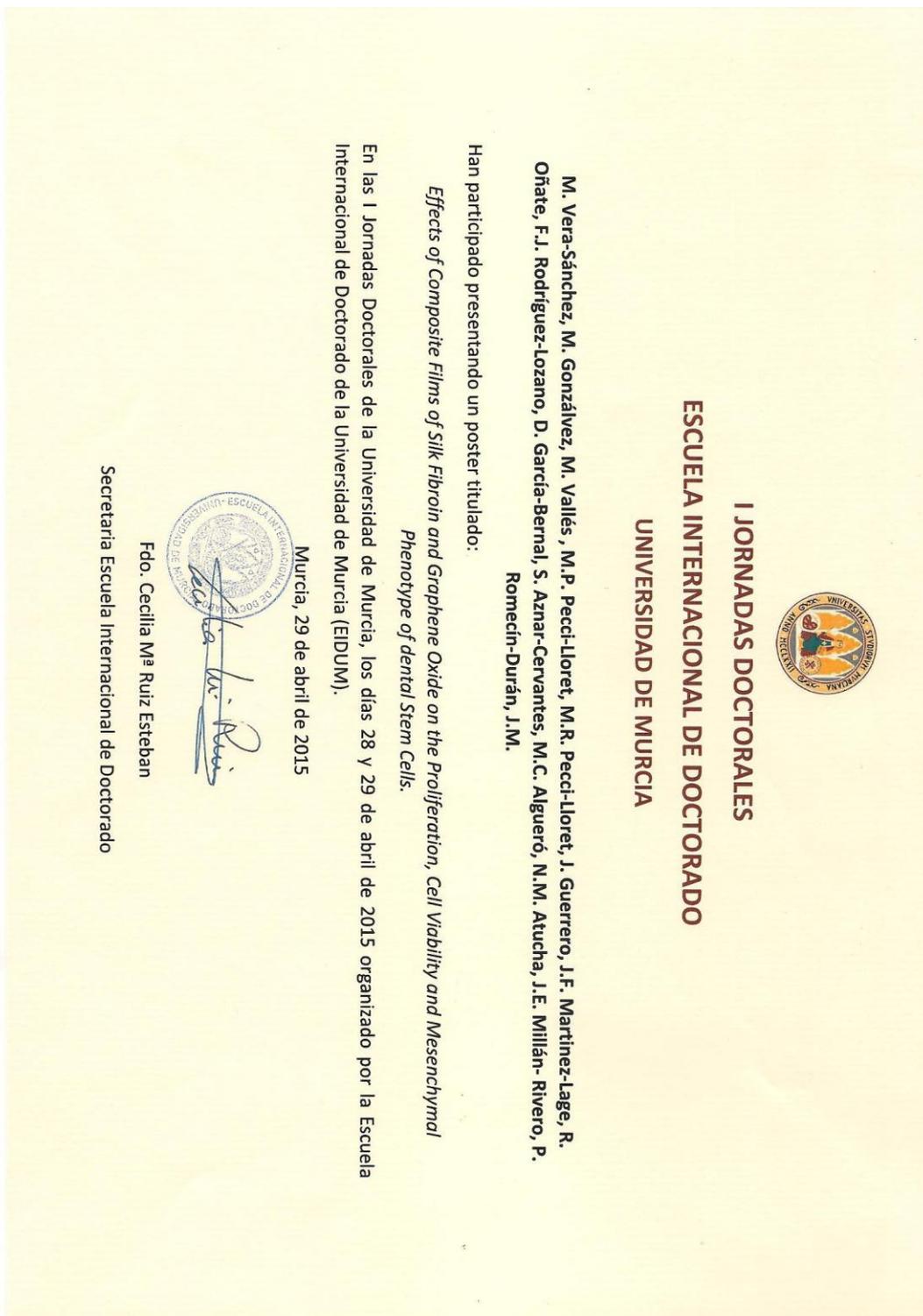


Código seguro de verificación: RUXFmT4o-14iswqIH-0jKGOKX0-TVu30nvL COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

ANEXO 4

PÓSTER I JORNADAS DOCTORALES





ANEXO 5

PÓSTER III JORNADAS DOCTORALES





ANEXO 6

CERTIFICADO COMUNICACIÓN ORAL

CONGRESO SEOP 2016

XXXVIII
REUNIÓN ANUAL DE LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
ODONTOPEDIATRÍA

La Coruña, 26 al 28 de Mayo de
2016



www.seopcoruna2016.com

CERTIFICADO

La comunicación titulada:

ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD DE LA FIBROÍNA DE SEDA EN CÉLULAS MADRE PROCEDENTES DE DIENTES DECIDUOS.

de la que es/son autor/es:

PECCI LLORET M.P., COLLADO GONZALEZ M., GARCÍA BERNAL D., OÑATE SÁNCHEZ R., RODRIGUEZ LOZANO F.J.

ha sido presentada de forma **comunicación oral** durante la **XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Española de Odontopediatría** celebrada en La Coruña los días 26, 27 y 28 de mayo de 2016.

Francisco J. Sánchez González-Dans
Presidente Comité Organizador

Dra. Olga Cortés Lillo
Presidenta SEOP

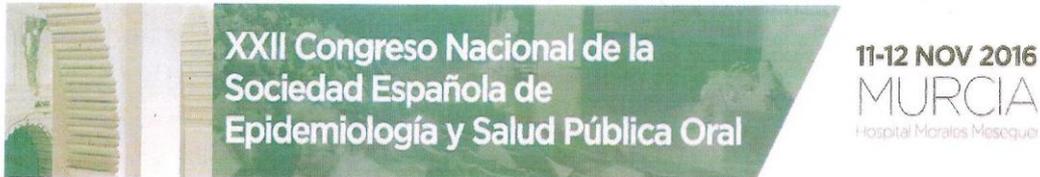
SECRETARÍA TÉCNICA:

océano azul
comunicación



congresos@oceano-azul.es - www.oceano-azul.es
Menéndez Pelayo, 4-6 - 2ºB 15005 La Coruña Tlf.:981 90 90 12

ANEXO 7
CERTIFICADO COMUNICACIÓN ORAL
CONGRESO SESPO 2016



D. Antonio José Ortiz Ruiz, Presidente del Comité Científico y Dña. Yolanda Martínez Beneyto, Presidenta del Comité Organizador del **XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral**, celebradas del **11 a 12 de noviembre de 2016** en el Hospital General Universitario Morales Meseguer.

Certifican que la **Comunicación Oral** con el título:

**POTENCIALIDAD DE LA FIBROINA DE SEDA COMO
SCAFFOLD PARA REGENERACIÓN PULPAR**

Ha sido presentada, en el citado congreso, por los autores:

Pecci Lloret, M.P.; Tomás-Catalá, C.J.; Gonzalvez Collado, M.;
Rodriguez Lozano, F.J.; Elias Oñate, R.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Murcia a doce de noviembre de dos mil dieciséis.

Fdo. Antonio José Ortiz Ruiz
Presidente Comité Científico

Fdo. Yolanda Martínez Beneyto
Presidenta del Comité Organizador

ANEXO 8

CERTIFICADO COMUNICACIÓN ORAL

CONGRESO SEOP 2017



Comité Organizador

Presidenta:

M^a Asunción Mendoza Mendoza

Vicepresidenta:

María Biedma Perea

Vocales:

Carolina Caleza Jiménez
Irene M^a González Aroca
M^a Dolores Huertas López
Rocío Martín Martín
David Ribas Pérez
Fátima Cristina Román Arenas
Beatriz Solano Mendoza

Comité Científico

Presidenta:

Paloma Planells del Pozo

Vocales:

Paola Beltri Orta
Eva M^a Martínez Pérez
Mónica Miegimolle Herrero
Gloria Saavedra Marbán
Eva Santa Eulalia Troisfontaines

Secretaría Técnica

MdV-Organización y Protocolo
C/ Bruc, 28, 2n
08013 Barcelona
Telf. 650 424 355
secretaria@odontologiapediatrica.com

M^a Asunción Mendoza Mendoza, Presidenta del Comité Organizador, y **Paloma Planells del Pozo**, Presidenta del Comité Científico, de la **XXXIX Reunión Anual de la Sociedad Española de Odontopediatría**, celebrada en Sevilla, los días 11, 12 y 13 de mayo de 2017,

CERTIFICAN

Que durante el mencionado Congreso se ha presentado la comunicación oral titulada:

Análisis de la adherencia celular en nuevos biomateriales para regeneración/reparación pulpar

De los autores:

**María Pilar Pecci; Mar Collado; Salvador David Aznar;
Jose Luis Cenís; Francisco Javier Rodríguez**

Y para que conste y a los efectos que correspondan, firman el presente certificado en Sevilla a 13 de Mayo de 2017.

Dra. Asunción Mendoza
Presidenta XXXIX Reunión Anual

Dra. Paloma Planells
Presidenta Comité Científico

ANEXO 9

PRIMER ACCÉSIT PREMIO MARIA LUISA GONZALVO MEJOR COMUNICACIÓN ORAL SEOP 2017



PRIMER ACCÉSIT AL PREMIO M^a LUISA GOZALVO
a la **Mejor Comunicación Oral**, titulada
Análisis de la adherencia celular en nuevos biomateriales para regeneración/repación pulpar
de los autores
**Pecci Lloret M., Collado González M., Aznar Cervantes S.,
Cenis Anadon J., Rodríguez Lozano F.,**

presentada en la XXXIX Reunión Anual de la Sociedad Española de Odontopediatría, celebrada en Sevilla del 11 al 13 de Mayo de 2017.
Sevilla, 13 de Mayo de 2017

XXXIX
REUNIÓN ANUAL DE LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
ODONTOPEDIATRÍA
Sevilla, 11, 12 Y 13 de Mayo del 2017



M^a Asunción Mendoza Mendoza
Presidenta del Comité Organizador

Paloma Planells del Pozo
Presidenta del Comité Científico

Paola Beltri Orta
Presidenta de la SEOP



ANEXO 10

ARTÍCULO EN JOURNAL OF CRANIOFACIAL SURGERY

ORIGINAL ARTICLE

Analysis of the Adherence of Dental Pulp Stem Cells on Two-Dimensional and Three-Dimensional Silk Fibroin-Based Biomaterials: Applications in Regenerative Dentistry

María Pilar Pecci-Lloret, DDS,* Mar Vera-Sánchez, PhD,[†] Salvador Aznar-Cervantes, PhD,[‡] David García-Bernal, PhD,[†] Ricardo Oñate Sánchez, DDS, PhD,* Miguel Ramón Pecci-Lloret DDS,* José María Moraleda,[†] José Luis Cenís, PhD,[‡] and Francisco Javier Rodríguez-Lozano, DDS, PhD*[†]

Abstract: Among various biomaterials used as scaffolds in tissue engineering, silk fibroin is a highly attractive material. A scaffold should be biocompatible and nontoxic, with optimal physical features and mechanical properties. For this reason, tissue-engineering approaches in regenerative medicine have focused on investigating the biocompatibility of possible biomaterials by analyzing cell–scaffold interaction properties. The aim of the present study was to examine the biocompatibility of silk fibroin as a film (two-dimensional [2D]) and a scaffold (three-dimensional [3D]) after being cellularized with human dental pulp stem cells (hDPSCs). Human dental pulp stem cells were isolated from healthy patients aged between 18 and 31 years. Further, silk fibroin-based 2D films and 3D scaffolds were prepared. Human dental pulp stem cells were directly seeded onto the biomaterial surfaces and their proliferation, adherence, and cell morphology were analyzed after 24, 120, and 168 hours. Additionally, the characteristics of the silk fibroin 2D films and 3D scaffolds before and after cell seeding were analyzed by scanning electron microscopy. After the initial 24 hours, silk fibroin-based 3D scaffolds displayed more adhered cells with a suitable fibroblastic morphology than those displayed on the 2D films. After longer culture times, hDPSCs proliferated sufficiently to cover the entire surface of the 3D silk fibroin scaffold, whereas the 2D films were only partially covered. Our results indicate the good *in vitro*

biocompatibility of silk fibroin-based biomaterials, especially when 3D scaffolds rather than 2D films are used.

Key Words: Biomaterials, bone tissue engineering, scanning electron microscopy, silk fibroin

(*J Craniofac Surg* 2017;00: 00–00)

A scaffold is an essential component used in tissue engineering applications. One of the key aspects of this modern strategy involves the use of biodegradable materials as scaffolds for the three-dimensional (3D) growth of cells previously expanded *in vitro*. The suitability of a given scaffold is determined by the inherent properties of the cell–scaffold interaction, which affects cell adherence, proliferation, differentiation, and migration through the scaffold matrix.¹ In fact, scaffolds with large dimensions have major issues related to maintenance of the survival of the seeded cells owing to their low degree of vascularization, which limits the supply of oxygen and nutrients.^{2,3}

Silk fibroin is a protein obtained from the domesticated mulberry silkworm, *Bombyx mori*. It is a natural polymeric protein composed of 3 protein components: heavy chain fibroin (H-chain, 350 kDa), light chain fibroin (L-chain, 25 kDa), and P25 protein.^{4,5} This protein, which is commonly used in the textile industry, represents a highly attractive scaffold material suitable for tissue regeneration.⁶ The main advantages of silk fibroin as a biomaterial are its easy processability, superior mechanical properties, controlled degradability, good oxygen and water permeability, and excellent cell compatibility, making it a favorable material for biological applications.⁷ Moreover, silk fibroin is less immunogenic and inflammatory than other reported biomaterials, such as poly(lactide-co-glycolide) copolymers or collagen-based scaffolds.⁸

Several configurations have been designed using silk fibroin for biomedical applications, including fibers,^{9,10} films,¹¹ sponges,^{6,12,13} and hydrogels.^{14,15}

Multipotent dental pulp stem cells (DPSCs) are mesenchymal stem cells with a capacity to differentiate into neuron-like cells, odontoblast-like cells, osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, and smooth and skeletal muscle cells.^{16–18}

Pulp regeneration, which would extend the longevity of teeth and improve the quality of life of patients, is a promising therapeutic strategy. Recent studies have focused on the use of DPSCs in tissue engineering.¹⁹ In a previous study,²⁰ stromal cell-derived factor-1 incorporated into silk-fibroin scaffolds promoted complete revascularization and regeneration of the dental pulp tissue of mature dog teeth subjected to *in situ*

From the *Faculty of Medicine, School of Dentistry; †Hematopoietic Transplant and Cellular Therapy Unit, Hematology Department, Virgen de la Arrixaca Clinical University Hospital, IMIB, University of Murcia; and ‡Department of Biotechnology, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), Murcia, Spain.

Received April 30, 2016.

Accepted for publication December 19, 2016.

Address correspondence and reprint requests to Francisco Javier Rodríguez-Lozano, DDS, PhD, Special Patients and Gerodontology Unit, School of Dentistry, University of Murcia, IMIB-Arrixaca. Morales Meseguer Hospital, Avda. Marqués de los Vélez s/n, 30007 Murcia, Spain; E-mail: fcojavier@um.es

MPP-L and MV-S equally contributed to this work.

The authors report no conflicts of interest.
Copyright © 2017 by Mutaz B. Habal, MD
ISSN: 1049-2275
DOI: 10.1097/SCS.0000000000003596

The Journal of Craniofacial Surgery • Volume 00, Number 00, Month 2017

1

Copyright © 2017 Mutaz B. Habal, MD. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

ANEXO 11

ARTÍCULO EN REVISTA ODONTOLOGY

Odontology
DOI 10.1007/s10266-017-0310-9



ORIGINAL ARTICLE

Biological effects of silk fibroin 3D scaffolds on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs)

M. Collado-González^{1,2} · M. P. Pecci-Lloret² · D. García-Bernal¹ · S. Aznar-Cervantes³ · R. E. Oñate-Sánchez² · J. M. Moraleda¹ · J. L. Cenis³ · F. J. Rodríguez-Lozano^{1,2,4}

Received: 11 February 2017 / Accepted: 22 May 2017
© The Society of The Nippon Dental University 2017

Abstract The aim is to investigate in vitro biological effects of silk fibroin 3D scaffolds on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) in terms of proliferation, morphological appearance, cell viability, and expression of mesenchymal stem cell markers. Silk fibroin 3D scaffolding materials may represent promising suitable scaffolds for their application in regenerative endodontic therapy approaches. SHEDs were cultured in silk fibroin 3D scaffolds. Then, cell numbers were counted and the Alamar blue colorimetric assay was used to analyse cell proliferation after 24, 48, 72, and 168 h of culture. The morphological features of SHEDs cultured on silk fibroin scaffolds were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Finally, cell viability and the expression of mesenchymal stem cell markers were analysed by flow cytometry. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test was performed ($P < 0.05$). At 24 and 48 h of culture, SHED proliferation on scaffolds was modest compared to the control although still

significant ($p < 0.05$). However, cell proliferation progressively increased from 72 to 168 h compared with the control ($p < 0.001$; $p < 0.01$). In addition, flow cytometry analysis showed that the culture of SHEDs on silk fibroin scaffolds did not significantly alter the level of expression of the mesenchymal markers CD73, CD90, or CD105 up to 168 h; in addition, cell viability in silk fibroin was similar to that obtained in plastic. Moreover, SEM studies revealed a suitable degree of proliferation, cell spreading, and attachment, especially after 168 h of culture. The findings from the current study suggest that silk fibroin 3D scaffolds had a favourable effect on the biological responses of SHEDs. Further in vivo investigations are required to confirm these results.

Keywords Scaffold · Silk fibroin · Cytotoxicity · SHEDs · Human dental stem cells

Introduction

Stem cell-based therapy (SC-BT) in regenerative endodontics is one of the most promising therapeutic strategies, which would extend the longevity of teeth and improve the quality of life of patients [1, 2]. SC-BT includes stem cells and the use of scaffolds and growth factors that are involved in the regeneration of the pulp-dentin complex [3]. In a typical SC-BT approach of dental pulp regeneration, a regenerated pulp graft is prepared by culturing mesenchymal stem cells (MSCs) in a porous scaffold for a given time and then implanting the graft into the damaged region [4]. Several studies have previously demonstrated that MSCs can be isolated from multiple tissues such as bone marrow, peripheral blood, umbilical cord blood, adult connective tissue, placenta, amniotic

✉ F. J. Rodríguez-Lozano
feojavier@um.es

¹ Cellular Therapy and Hematopoietic Transplant Unit, Haematology Department, Virgen de la Arrixaca Clinical University Hospital, IMIB, University of Murcia, Murcia, Spain

² School of Dentistry, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain

³ Biotechnology Department, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), Murcia, Spain

⁴ Special Patients and Gerodontology Unit, School of Dentistry, University of Murcia, IMIB-Arrixaca, Morales Meseguer Hospital, Avda. Marqués de los Vélez s/n, 30007 Murcia, Spain

Published online: 14 June 2017

