



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por:

Sergio Andrés González Itier

“El Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) promueve la diferenciación ósea/Cemento de las Células Troncales/Progenitoras de Ligamento Periodontal Humano”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Constanza Martínez
Directora Seminario de Título

Handwritten signature of Constanza Martínez in blue ink.

Dra. Verónica Palma
Co-Directora Seminario de Título

Handwritten signature of Verónica Palma in blue ink.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Daniela Sauma
Presidente Comisión

Handwritten signature of Daniela Sauma in blue ink.

Dra. Mónica Cáceres
Evaluadora

Handwritten signature of Mónica Cáceres in blue ink.



Santiago de Chile, noviembre de 2014.

BIOGRAFÍA



Nací un 27 de Octubre de 1989 y soy el menor de 4 hermanos (1 hermana y 3 hermanos). Toda mi enseñanza escolar, desde el Pre-Kinder a Cuarto

Medio la realicé en el Colegio Santa Gema Galgani. Desde siempre me gustó investigar y saber el porqué de las cosas, fue así que apenas salí del colegio realicé un curso de verano de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, donde supe que mi camino era la Biotecnología.

En el año 2008 ingresé al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, con el fin de prepararme y llenar vacíos en mi conocimiento, ahí conocí compañeros y amigos que hasta el día de hoy tengo la dicha de compartir con ellos.

En el año 2010 me transferí a Ing. En Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias, carrera que me presentó muchos caminos y posibilidades de investigación que yo no conocía.

Finalmente, en el año 2013 me Licencié de Ingeniero en Biotecnología Molecular dando el primer gran paso en mi carrera como investigador.

*A mi mamá, Cecilia Itier que estuvo apoyándome en todo momento.
A mi polola, Evelyn Yumha, por el apoyo y comprensión.
Y a mi familia.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mis tutoras, Constanza y Verónica por todo lo que me enseñaron durante este Seminario de Título, gracias a ellas crecí como persona, como estudiante y como investigador, y también al Dr. Smith por la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de la Universidad Católica, Ignacio, Carolina y Paulina por la alegría y los consejos durante mi estancia en dicho lugar.

A mis compañeros de VPLAB, en particular a Matías y Cynthia por apoyarme en mis primeros pasos en la Sala de Cultivo y entregarme las bases de un buen trabajo en el laboratorio.

A la Profesora Jennifer por iniciarme en el trabajo de laboratorio y enseñarme la rigurosidad y el orden que me hacían falta para la investigación, y mencionar a Salvador por su apoyo incondicional en mi estancia en el Laboratorio de Genética.

También, quisiera agradecer a mi familia por todo el apoyo durante mi carrera, incluso en los momentos de mayor duda vocacional, destacando a mi mamá, Cecilia Itier, que sin su apoyo durante mi estancia en Bachillerato y luego en Ing. En Biotecnología Molecular quizás no estaría donde estoy y por aguantarme en mis momentos de mayor estrés, y a mi hermano Óscar por tantas impresiones que le solicité durante este Seminario y que siempre estuvo dispuesto a entregarme, aunque estuviera ocupado, y a mi polola, Evelyn Yumha, por la comprensión y el apoyo en innumerables conversaciones de un tema lejano para ella, pero que aun así siempre tuvo la disposición de escucharme, y por aguantarme en mis momentos de mayor estrés.

Gracias a mis amigos de la carrera, a Claudio, Carolina, Javiera, Francisco, Stefanía, por alegrar los días durante la carrera, por las risas, el estrés compartido y por muchas cosas más, y a la Tía Betty, por tantas conversaciones y consejos que me dio durante Bachillerato y luego en Biotecnología.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Tejidos Periodontales.....	1
1.2. Células presentes en el ligamento periodontal	3
1.3. Plasma Sanguíneo Rico en Plaquetas y Plasma Sanguíneo Pobre en Plaquetas.....	4
1.4. Diferenciación Ósea y Angiogénesis	8
1.5. Células Troncales de LPH y PRP y/o PPP.....	12
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo General	14
3.2. Objetivos Específicos.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. MATERIALES	15
4.1.1. Material Plástico y Vidrio.....	15
4.1.2. Materiales utilizados para Cultivo Celular.....	15
4.1.3. Materiales utilizados para Histología.....	15
4.1.4. Materiales utilizados para Inmuno-fluorescencia.....	16
4.1.5. Materiales utilizados para Western Blot.....	16
4.1.6. Cultivos Celulares.....	16
4.1.7. Materiales para la obtención y manipulación del Plasma Pobre en Plaquetas.....	17
4.1.8. Cuantificación de Calcio.....	17
4.1.9. Anticuerpos	17
4.2. MÉTODOS.....	18
4.2.1. Cultivos primarios de Ligamento Periodontal Humano	18
4.2.2. Caracterización Celular	18

4.2.2.1. Citometría de Flujo.....	18
4.2.2.2. Inmuno-fluorescencia.....	19
4.2.2.3. Diferenciación Ósea/cemento	19
4.2.2.4. Diferenciación Adipogénica	20
4.2.2.5. Diferenciación Condrogénica	21
4.2.3. Obtención de Plasma Pobre en Plaquetas (PPP).....	22
4.2.4. Análisis de la Composición de PPP	22
4.2.5. Efecto del PPP durante la diferenciación ósea/cemento	24
4.2.6. Western Blot.....	25
4.2.6.1. Análisis del efecto de PPP en la diferenciación óseo/cemento mediante expresión de proteínas por Western Blot.....	25
4.2.7. Análisis Estadístico	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Caracterización de los cultivos primarios obtenidos a partir de LPH.....	27
5.2. Caracterización de los PPP obtenidos	29
5.3. Efecto del tratamiento del PPP durante el proceso de diferenciación ósea	30
5.4. Niveles de expresión de proteínas durante el proceso de diferenciación ósea en células de LPH tratadas con PPP	35
5.4.1. Niveles de expresión de FAL y OSX en células al Día 0 de Cultivo.....	36
5.4.2. Niveles de expresión de FAL en células tratadas con PPP	37
5.4.3. Niveles de expresión de OSX en células tratadas con PPP	39
5.4.4. Niveles de expresión de OCN en células tratadas con PPP	42
6. DISCUSIÓN.....	44
6.1. Células de LPH cumplen con los criterios mínimos de MSC dadas por la ISCT	44
6.2. Composición del PPP y su efecto durante el proceso de diferenciación ósea de las células de LPH	45
6.3. Efecto del PPP sobre la expresión de proteínas involucradas en el proceso de diferenciación ósea de las células de LPH.....	53
6.4. El PPP acelera el proceso de diferenciación ósea	55
6.5. Perspectivas.....	56
7. CONCLUSIONES.....	58
8. BIBLIOGRAFÍA.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo de componentes y estructura de los Tejidos Periodontales en mamíferos.....	2
Figura 2. Esquema de los marcadores para MSC's, pre-osteoblastos, osteoblasto maduro y osteocito, durante la diferenciación a osteoblasto y osteocito.....	9
Figura 3. Los cultivos primarios obtenidos a partir de LPH poseen los marcadores característicos de MSC.	27
Figura 4. Potencial de diferenciación de las células de LPH.....	28
Figura 5. Análisis proteómico de los PPPs obtenidos.....	29
Figura 6. Cuantificación de Citoquinas presentes en el PPP mediante análisis de Citometría de Flujo.	30
Figura 7. Calcio depositado en los cultivos celulares obtenidos después de 21 días de tratamiento con PPP.....	32
Figura 8. Concentración de Calcio depositado en los cultivos celulares obtenidos después de 21 días de tratamiento con PPP de 4 donantes diferentes.....	33
Figura 9. Cuantificación de la concentración de Calcio obtenida con el estímulo de PPP al Día 14 y 21 de cultivo.	34
Figura 10. Western Blot y análisis densitométrico del Día 0 de cultivo.....	36
Figura 11. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión de FAL en el tiempo.....	37
Figura 12. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión de FAL en Controles.....	38
Figura 13. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión de OSX.....	40
Figura 14. Western Blot y análisis densitométrico de la Expresión de OSX en Controles.....	41
Figura 15. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión de OCN.	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Función asociada a Factores de Crecimiento y citoquinas analizadas.....	51
---	----

ABREVIATURAS

ACT	: Actina Beta
AR	: Amfiregulina
bFGF	: Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico
BMP	: Proteína Morfogenética Ósea
b-NGF	: Factor de Crecimiento Nervioso Beta
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	: Dithiothreitol
EGF	: Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR	: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
FAL	: Fosfatasa Alcalina
FGF	: Factor de Crecimiento Fibroblástico
G-CSF	: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
GDNF	: Factor Neurotrófico Glial
GM-CSF	: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos Granulocitos
HB-EGF	: Factor de Crecimiento Tipo EGF con unión a Heparina
HGF	: Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HLA	: Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad.
IGFBP	: Proteína de Unión al Factor de Crecimiento similar a la insulina
IGF	: Factor de Crecimiento similar a la insulina
IGF-1 sR	: Receptor Soluble del Factor de Crecimiento similar a la insulina 1
IL	: Interleucina
ISCT	: Sociedad Internacional de Terapia Celular
kDa	: Kilodalton
LPH	: Ligamento Periodontal Humano
M-CSF	: Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos
M-CSF R	: Receptor del Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos
NT-3	: Neurotrofina 3
NT-4	: Neurotrofina 4
OCN	: Osteocalcina
OSX	: Osterix
PBS	: Búfer fosfato salino
PDGF Ra	: Receptor α del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PDGF Rb	: Receptor β del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PDGF-AA	: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas $\alpha\alpha$
PDGF-AB	: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas $\alpha\beta$
PDGF-BB	: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas $\beta\beta$
PVDF	: Polifluoruro de vinilideno
PFA	: Paraformaldehído
PLGF	: Factor de Crecimiento Placentario
PPP	: Plasma Pobre en Plaquetas

PRP	: Plasma Rico en Plaquetas
RIPA	: Búfer de Ensayo de Radio Inmuno Precipitación
RUNX2	: Factor de Transcripción Relacionado a Runt 2
SAOS-2	: Células de Osteosarcoma Humano
SCF	: Factor de Crecimiento de Células Troncales
SCF R	: Receptor del Factor de Crecimiento de Células Troncales
SDS	: Dodecilsulfato sódico
SFB	: Suero Fetal Bovino
Shh-N	: N-Terminal de Sonic Hedgehog
TGFα	: Factor de Crecimiento Transformante Alfa
TGFβ	: Factor de Crecimiento Transformante Beta
TNF	: Factor de Necrosis Tumoral
TUB	: Tubulina Beta
TBS	: Búfer Tris Salino
VEGF	: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VEGFR2	: Receptor 2 del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VEGFR3	: Receptor 3 del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial 3

RESUMEN

La regeneración de los tejidos periodontales constituye un gran desafío médico debido a su potencial reparativo limitado. El uso de células troncales aisladas del Ligamento Periodontal Humano (LPH) surge como una opción para la regeneración de estos tejidos. Sin embargo, es necesario conocer los factores tróficos que modulan la proliferación y diferenciación del LPH, junto con identificar una fuente de dichos factores que no genere rechazo inmune. Diversas formulaciones sanguíneas, derivadas desde el mismo paciente, se han utilizado para medicina regenerativa ya sea de manera autónoma, asociado a células o asociado a matrices tridimensionales. El uso de plaquetas autólogas concentradas en plasma sanguíneo (Plasma Rico en Plaquetas: PRP) surge como una alternativa para estimular la reparación tisular a través de la liberación de grandes cantidades de factores de crecimiento presentes en las plaquetas activas. Al preparar PRP se obtiene una segunda fracción denominada Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) que también posee factores de crecimiento, pero en menor medida que el PRP. Estudios clínicos e investigaciones con modelos *in vivo* han reportado el uso de PPP y su potencial osteoinductivo en los tejidos periodontales.

Considerando la presencia de células troncales en el LPH y la capacidad que tiene el PPP como material osteoinductivo, es que el propósito de este trabajo fue evaluar la diferenciación ósea/cemento de las células de LPH en cultivos *in vitro* y el efecto estimulador del PPP sobre esta diferenciación dado por los factores de crecimiento presentes en este plasma. En esta tesis se logró evidenciar en el PPP la presencia de factores de crecimiento involucrados en procesos como la osteogénesis y angiogénesis, los cuales son esenciales para la regeneración de tejidos. Igualmente, se logró demostrar la capacidad del PPP para promover y acelerar el proceso de diferenciación ósea/cemento de las células obtenidas de LPH.

ABSTRACT

Periodontal tissue regeneration constitutes a substantial medical challenge due to its limited reparative potential. The use of stem cells obtained from Human Periodontal Ligament (HPL) emerges as an option for the regeneration of this tissue. However, it is necessary to know the factors that regulate its proliferation and differentiation, along with identifying a source of these factors that does not generate an immune reaction.

Abundant blood formulations, derived from the patients themselves, have been used for regenerative medicine autonomously, associated with cells or with three dimensional scaffolds. Uses of autologous concentrated platelets in blood plasma (Platelet Rich Plasma) rise as a new alternative to stimulate tissue repair through the release of vast amounts of growth factors that are present in active platelets. During PRP preparation, a second fraction is obtained named Platelet Poor Plasma (PPP), which would also possess growth factors, but in a small amount compared to PRP. Clinical studies and research conducted with *in vivo* models have reported the use of PPP and demonstrated its osteoinductive potential in periodontal tissues.

Considering the presence of HPL stem cells and PPP capacity of being an osteoinductive material, the purpose of this work was to evaluate the bone/cementum differentiation of *in vitro* cultures of HPL cells and the stimulatory effect of using PPP due to the growth factors present in this plasma.

In this study, it was possible to demonstrate the presence of growth factors involved in the processes of osteogenesis and angiogenesis in PPP which are essential for tissue regeneration. Likewise, the ability of PPP to promote and accelerate the bone/cementum differentiation process in cells obtained from HPL was proven.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una enfermedad de alta prevalencia a nivel mundial y nacional, que se caracteriza por la destrucción de los tejidos que dan soporte a los dientes, incluso en sus estadios más avanzados conlleva a la pérdida de los dientes (MINSAL 2010; OMS 2012). La regeneración o la capacidad de reemplazar los tejidos perdidos como consecuencia de esta enfermedad es un desafío debido a la interacción de al menos tres tejidos diferentes que componen el soporte periodontal: ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento (Pihlstrom y col., 2005; Lindhe y col., 2008). El potencial reparativo del periodonto particularmente en dientes adultos es extremadamente limitado, por lo que varios esfuerzos se han hecho para acelerar y potenciar la regeneración con el propósito de mejorar la estabilidad mecánica y fisiológica de los dientes afectados (Lin y col., 2009; Pejic y col., 2013).

1.1. Tejidos Periodontales

Los tejidos de soporte o tejidos periodontales están compuestos por el cemento radicular, el hueso alveolar y el ligamento periodontal (Figura 1). Su principal función, es mantener la integridad masticatoria de la cavidad oral, dando sostén a los dientes dentro de los maxilares (Nanci & Bosshard 2006; Lindhe y col., 2008).

El cemento radicular es un tejido mineralizado especializado que cubre la superficie de la raíz dental. Este tejido está formado en un 65% de su peso por matriz inorgánica y un 35% de matriz orgánica. No contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos ni células nerviosas y es depositado durante toda la vida. Una de sus funciones es permitir la inserción del ligamento periodontal a través de fibras de colágeno embebidas en su matriz orgánica (Nanci & Bosshard 2006; Lindhe y col., 2008).

El hueso alveolar está compuesto de una matriz orgánica que es fortalecida por depósitos de calcio. El 95% del hueso está constituido por Colágeno de Tipo I, en cambio el 5% restante está formado por proteoglicanos y proteínas no-colágenas. Los cristales de sales depositados en la matriz orgánica están compuestos principalmente por calcio y fosfato en forma de hidroxapatita y son depositados bajo un estricto control celular (Marks & Odgren 2002). Este tejido permite la inserción de fibras de colágeno desde el Ligamento Periodontal, permitiendo el sostén de los dientes en el alveolo (Lindhe y col., 2008).

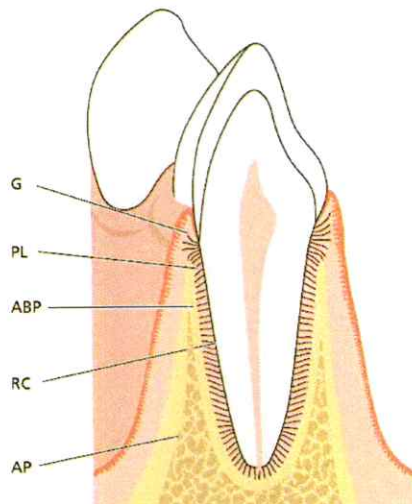


Figura 1. Esquema ilustrativo de componentes y estructura de los Tejidos Periodontales en mamíferos.
G: Gingiva (Encía), PL: Ligamento Periodontal, AP: Proceso Alveolar, ABP: Hueso Alveolar Propio, RC: Cemento Radicular. Imagen tomada de Lindhe y col., 2008.

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado, altamente vascularizado, que se ubica en el espacio entre el cemento radicular (rodeando la raíz) y el hueso alveolar. Este tejido conectivo une el cemento radicular con el hueso alveolar mediante fibras de colágeno. Posee un grosor que varía entre los 0,2mm y los 0,4mm (disminuyendo con la edad). Permite censar y absorber las fuerzas generadas en el proceso masticatorio y otros contactos dentales, distribuyéndolas en el hueso alveolar,

siendo esencial en el sostén de los dientes dentro de los maxilares (Lindhe y col., 2008).

1.2. Células presentes en el ligamento periodontal

Existe una amplia variedad de tipos celulares presentes en el Ligamento Periodontal, principalmente fibroblastos, monocitos, macrófagos, cementoblastos, células endoteliales, células nerviosas, osteoblastos, osteoclastos y los restos epiteliales de Malassez (Nanci & Bosshard 2006; Lindhe y col., 2008). La capacidad de mantener la homeostasis en este tejido, sugiere la existencia de un ancestro común que permitiría mantener los tejidos periodontales y facilitar su regeneración ante posibles injurias o patologías. En línea con este planteamiento, desde el año 2004 se encontraron células troncales mesenquimáticas en el Ligamento Periodontal Humano (LPH) (Seo y col., 2004; Seo y col., 2005; Bartold y col., 2006, Martínez y col., 2011). Las células troncales mesenquimáticas o MSC (del inglés, *Mesenchymal Stem Cells*) son células multipotenciales de origen mesodérmico que se encuentran en el estroma de distintos tejidos del organismo, por ejemplo, médula ósea, grasa, líquido amniótico, endometrio, cordón umbilical, entre otros (Troyer D. L. & Weiss M. L. 2008). Estas células poseen las características descritas para otras poblaciones de células troncales como la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse a distintos linajes celulares (Mrozik y col., 2010; Volponi y col., 2010; Martínez y col., 2011). Las MSC se consideran una población celular heterogénea y actualmente no existe un marcador específico que permita identificarlas, por lo cual la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *International Society of Cellular Therapy*) determinó los caracteres mínimos para ser definir una MSC humana (Dominici y col., 2006).

Estos criterios son:

- Adherencia al plástico y morfología fibroblastoide.
- Expresión específica de ciertos Antígenos de superficie.
- Potencial de diferenciación (capacidad de diferenciación a linaje óseo, adiposo y condrogénico *in vitro*).

Por lo tanto estas células deben adherirse a la superficie de cultivo y deben presentar expresión de los antígenos de superficie, CD105 (Endoglina), CD73 (Ecto 5' Nucleotidasa) y CD90 (Thy-1). Asimismo, la ausencia de expresión de las proteínas CD45 (Marcador de Pan-leucocitos), CD34 (Marcador de Progenitores hematopoyéticos y endoteliales), CD14 o CD11b (Marcadores de Monocitos y macrófagos), CD79a o CD19 (Marcadores de Células B) y HLA (Moléculas del Complejo de Histocompatibilidad) de clase II. Por último, las MSC deben ser capaces de diferenciarse al menos a tres linajes mesenquimales: óseo, adiposo y cartilaginoso en condiciones estándar de diferenciación (Dominici y col., 2006).

Además de los marcadores indicados por la ISCT, existen otros marcadores para identificar células troncales en el ligamento periodontal, entre estos se encuentra STRO-1 (expresada por MSC de médula ósea humana) y MUC18/CD146 (molécula de adhesión celular) (Seo y col., 2004; Lin y col., 2009; Martínez y col., 2011; Lovelace y col., 2011).

1.3. Plasma Sanguíneo Rico en Plaquetas y Plasma Sanguíneo Pobre en Plaquetas

En la cascada de eventos biológicos que ocurren en la regeneración tisular, incluida la regeneración periodontal, los factores de crecimiento juegan un papel importante ya que modulan la proliferación, diferenciación y migración celular, incluido el

reclutamiento de células troncales y/o progenitoras al sitio receptor (Hynes y col., 2012).

La reparación de heridas requiere de la activación de las plaquetas y por lo tanto la liberación de los factores de crecimiento que se encuentran contenidos en éstas (Murphy y col., 2012). Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos a-nucleados que derivan de los megacariocitos de la médula ósea con un diámetro entre 2 y 3 μm . Contienen gran cantidad de gránulos, denominados gránulos- α , de estructura esférica u oval, formados por una única membrana que almacenan las isoformas del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-AA, PDGF-BB y PDGFAB), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1 y TGF- β 2), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF-2), el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), entre otros. Estos gránulos- α se fusionan con la membrana plaquetaria luego de su activación liberando los factores de crecimiento contenidos en ellos (Gaßling y col., 2009; Anitua y col., 2013a).

A la fecha, diversas formulaciones sanguíneas, derivadas desde el mismo paciente, se han utilizado para medicina regenerativa ya sea de manera autónoma, asociado a células o asociado a matrices tridimensionales (Marx y col., 1998; Andia & Rubio-Azpeitia 2014).

Las primeras descripciones respecto al desarrollo y uso del PRP ocurren en los años 90's. Previo al uso de PRP el enfoque estaba en desarrollar "pegamentos biológicos" denominados "Pegamentos de Fibrina Autóloga" que fueron usados primeramente en cirugías maxilofaciales (Marx y col., 1998). Posterior al uso de estos pegamentos se exploró la opción de secuestrar y concentrar plaquetas autólogas en plasma sanguíneo (Plasmas Ricos en Plaquetas), analizando su composición y utilizándolo para aumentar

la regeneración ósea en mandíbulas mediada por matrices. El uso de PRP asociado a matrices permitió acelerar el proceso de regeneración en comparación al uso de matrices sin plasma, debido en parte a la presencia de PDGF y TGF- β , entre otros factores (Marx y col., 1998). Además, el PRP posee propiedades osteo-regenerativas, anti-inflamatorias y anti-bacterianas, atribuibles a su contenido plaquetario (Lopez-Vidriero y col., 2010).

Por lo tanto, el PRP se define como una fracción sanguínea con un alto contenido de plaquetas (3 a 4 veces más que los niveles basales), que puede ser activado mediante la adición de trombina y calcio, y que ha sido diseñado para estimular la reparación tisular a través de la liberación de grandes cantidades de factores de crecimiento presentes en las plaquetas activas (Gaßling y col., 2009, Hateyama y col., 2014).

Se ha reportado que el PRP constituye un factor mitogénico y migratorio para las MSC de médula ósea, osteoblastos, fibroblastos gingivales y células de ligamento periodontal (Graziani y col., 2006; Creeper y col., 2009; Cáceres y col., 2011; Murphy y col., 2012).

El uso del PRP en medicina regenerativa se ha extendido a diversos campos. Se ha reportado que el PRP puede inducir un aumento de la proliferación de células de la córnea y la regeneración de este tejido luego de heridas por foto-ablación con láser (Anitua y col., 2013b). Además, el PRP tiene efectos positivos sobre la regeneración del nervio ciático, lo que permite recuperar la capacidad motora en ratones (Küçük y col., 2014). También, el PRP se ha utilizado para promover la angiogénesis en células troncales de pulpa dental humana y en células progenitoras endoteliales, en donde los resultados obtenidos con el PRP son mejores que al usar Suero Fetal Bovino (Li y col., 2014).

En el campo de lesiones articulares, el PRP mantiene el fenotipo y el potencial de diferenciación de condrocitos en términos de proliferación, síntesis de proteoglicanos y colágenos de tipo II (Kabiri y col., 2014). Además, el uso intra-articular de PRP en asociación con ácido hialurónico regenera roturas en los meniscos y disminuye la inflamación en pacientes con osteoartritis (Chen y col., 2014). También, el PRP promueve la recuperación a corto y largo plazo en lesiones tales como la tendinopatía patelar (Jeong y col., 2014) y en el ligamento rotor del hombro (Randelli y col., 2014).

Finalmente, también se ha utilizado PRP para promover la regeneración ósea. Sin embargo, no hay evidencias suficientes que validen el uso de PRP como tratamiento de rutina en fracturas (Griffin y col., 2009).

Cabe hacer notar que en la literatura se han reportado resultados contradictorios al utilizar PRP en la regeneración ósea. Estos resultados ocurren mayoritariamente por diferencias en la preparación del PRP y, por ende, en la concentración final de factores de crecimientos. Es por esta razón que no se han logrado definir concentraciones óptimas de PRP para promover la regeneración y cicatrización de heridas (Griffin y col., 2009; Eskan & Greenwell 2011; Kabiri y col., 2014).

Además, estos resultados contradictorios llevan a la búsqueda de nuevas fuentes de factores de crecimiento que puedan ser utilizadas en regeneración. Al separar las fracciones sanguíneas de donde se obtiene el PRP, también se puede obtener una segunda fracción sanguínea que corresponde al plasma pobre en plaquetas (PPP). Este plasma se encuentra reducido en factores de crecimiento, pero igualmente tiene la habilidad de promover la cicatrización de heridas, además de la proliferación y migración de células troncales de médula ósea (Creepers y col., 2009; Cáceres y col., 2011; Murphy y col., 2012).

Reportes en la literatura muestran que tanto el PRP, como el PPP producen efectos similares en la estimulación de la respuesta de reparación tisular en fibroblastos, incluyendo la contracción de tejido de granulación, migración celular, remodelación de actina, diferenciación miofibroblástica y producción de matriz extracelular (Kim y col., 2011; Cáceres y col., 2011).

A diferencia del PRP, pocos estudios han utilizado el PPP como fuente de factores de crecimiento y explorado su uso como biomaterial osteo-inductivo. Dentro de los últimos años, sólo dos estudios *in vivo* se destacan por utilizar PPP y han mostrado que podría promover la regeneración de defectos óseos en la cavidad bucal. Un estudio clínico del año 2010 mostró que el PPP posee la misma eficacia que el PRP en la reparación de defectos periodontales intra-óseos (Yilmaz y col., 2010). Además, un segundo estudio *in vivo*, del año 2014 realizado en perros Beagle, mostró que a pesar de poseer una menor cantidad de factores de crecimiento que el PRP, el PPP es suficiente para recuperar el hueso en los alveolos de extracción de dientes, generando mejores resultados que el PRP (Hateyama y col., 2014).

Por lo tanto, la utilización de plasma sanguíneo rico o pobre en plaquetas, como fuente autóloga de factores de crecimiento, provee una aproximación biológica para la estimulación y aceleración de la regeneración tisular.

1.4. Diferenciación Ósea y Angiogénesis

El desarrollo del sistema esquelético es un proceso complejo, con un control preciso sobre la formación ósea, crecimiento y re-modelamiento del mismo a lo largo de la vida. Durante el desarrollo embrionario el hueso se forma de dos maneras: la osificación intramembranosa (que da origen al cráneo y la pelvis, entre otros) y la osificación endocondral (que da origen a hueso largos, cortos e irregulares) los que

ocurren en proximidad al crecimiento vascular (Kanczler & Oreffo 2008). Para la formación ósea y su mantención a lo largo de la vida, se requiere un balance preciso entre osteoblastos (células que generan la matriz mineralizada) y osteoclastos (células que absorben hueso) (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013).

Para que ocurra la osificación intramembranosa es necesario el compromiso y diferenciación de MSC a linaje óseo, es así que este proceso involucra a progenitores óseos, pre-osteoblastos, osteoblastos, osteoblastos maduros, osteocitos y la mineralización de la matriz extracelular (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013). Asimismo, se ha reportado que este proceso de diferenciación ósea se ve influenciado por un gran número de agentes tales como, factores de crecimiento, factores de transcripción, citoquinas, metabolitos y hormonas, siendo comandado principalmente por el Factor de Transcripción relacionado a Runt (RUNX2), que es considerado el factor de transcripción maestro de la diferenciación de MSC a osteoblastos (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013).

Existe un segundo factor de transcripción llamado Osterix (OSX), el cual es esencial para la diferenciación de osteoblastos, que es inducido por Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs), no obstante se encuentra regulado por RUNX2 (Liu & Lee 2013).

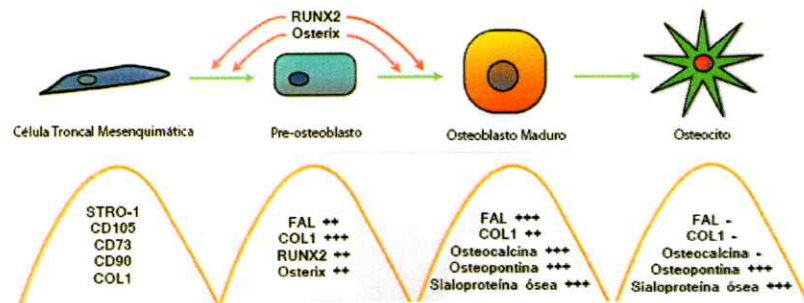


Figura 2. Esquema de los marcadores para MSC's, pre-osteoblastos, osteoblasto maduro y osteocito, durante la diferenciación a osteoblasto y osteocito. Se ilustran los niveles de expresión de los principales marcadores celulares en las diferentes etapas de la diferenciación ósea. Imagen modificada de Miron & Zhang 2012.

En la diferenciación ósea (Figura 2), RUNX2 regula la expresión de la mayor cantidad de proteínas de matriz tales como sialoproteína ósea, osteocalcina y comanda la diferenciación de células troncales hacia osteoblastos (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013).

Los progenitores óseos diferenciados parcialmente a pre-osteoblastos, se caracterizan por una alta expresión de Fosfatasa Alcalina (FAL). Esta enzima participaría activamente en los estadios tempranos de la diferenciación ósea, liberando fosfatos inorgánicos que servirán en la generación de la fase inorgánica del tejido óseo, además de detener la inhibición de la formación de cristales de hidroxiapatita. Es por esta razón que se la considera como un marcador temprano de diferenciación a osteoblastos (Whyte y col., 2002). Además, estas células comienzan con la producción de Colágeno I, proteína que corresponde al componente estructural mayoritario del hueso, dándole estabilidad y resistencia a fuerzas mecánicas (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013).

Posteriormente, cuando el pre-osteoblasto se convierte en un osteoblasto, Runx2 genera un aumento en la producción de sialoproteína ósea y comienza con la producción de osteocalcina. La sialoproteína ósea es una proteína no-colágena que forma parte de la matriz extracelular ósea, ésta se une al Colágeno I y nuclea la formación de cristales de hidroxiapatita (fase inorgánica del hueso) (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013).

Una vez que el osteoblasto madura, esta célula comienza a producir la fase orgánica del hueso denominado osteoide. Asimismo aumenta la expresión de Osteocalcina (OCN), que corresponde a una proteína no-colágena de matriz extracelular que está envuelta en la unión entre el calcio y la hidroxiapatita, y se considera como el marcador específico de osteoblasto maduro más abundante. Finalmente, cuando la matriz

envuelve al osteoblasto maduro, éste se diferencia terminalmente a osteocito, que corresponde a la célula que regula el re-modelamiento óseo y cuya diferenciación terminal es inhibida por RUNX2 (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013).

Como ya señalado, se ha reportado que factores de crecimiento tales como los BMPs pueden influenciar positivamente en la diferenciación de osteoblastos. También los Factores de Crecimiento derivado de las Plaquetas (PDGF) generan un aumento en la proliferación y en la expresión de marcadores osteoblásticos como colágeno y osteocalcina (Miron & Zhang 2012).

El hueso es un tejido altamente vascularizado que depende de la estrecha conexión espacio-temporal entre los vasos sanguíneos y las células óseas para mantener la integridad ósea. Existe una invasión de capilares en la zona mesenquimal durante la osificación intramembranosa, mientras que durante la osificación endocondral, el acoplamiento entre la condrogénesis y la osteogénesis que determinará la tasa de osificación del hueso depende del nivel de vascularización de la placa de crecimiento.

Además, en fracturas es esencial la invasión de capilares a la región lesionada, lo que permite el ingreso de células mesenquimales, para que así una vez regenerada la lesión (formación de Callo) este hueso pueda ser remodelado, acompañado de un proceso de angiogénesis, recuperando el suministro sanguíneo normal.

Por lo tanto, la angiogénesis juega un papel fundamental en el desarrollo del hueso y en la reparación de fracturas óseas. Es así que diversas formulaciones se han empleado en el desarrollo de ingeniería de tejidos óseos. Sin embargo, una red de vasos sanguíneos activos es un pre-requisito esencial para que éstos sobrevivan y se integren con el tejido huésped existente (Kanczler & Oreffo 2008).

1.5. Células Troncales de LPH y PRP y/o PPP.

El uso del PRP ha sido ampliado a diversos tejidos, incluidos los tejidos orales, a pesar de esto, el uso de PRP en células de LPH es poco conocido. Un estudio del año 2014 utilizó una mezcla de PRP y células troncales de LPH para promover la regeneración ósea tanto *in vitro* como *in vivo*, obteniendo como resultado un aumento en la producción de matriz extracelular en estas células tratadas con PRP con respecto a células no tratadas (Xu y col., 2014). Sin embargo, al día de hoy pocos estudios involucran el uso de PPP como fuente de factores de crecimiento y su aplicación sobre células de LPH.

Por lo tanto, debido a la compleja composición de las fracciones plaquetarias y sus diferentes formas de preparación, se hace necesario realizar más estudios para dilucidar su función en la regeneración y cicatrización de heridas, incluyendo su efecto sobre las poblaciones celulares del LPH. Además, se requiere evaluar la composición del PRP y/o PPP, para precisar su posible uso como fuente de factores de crecimiento, en la expansión *in vitro*, en la diferenciación de células troncales/progenitoras de LPH y finalmente en la regeneración periodontal.

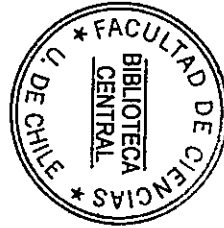
El uso de células troncales y/o progenitoras en la regeneración periodontal implica la necesidad de obtener una gran cantidad de células a partir del tejido donante, por lo que es esencial aumentar el número de células *in vitro* (Martínez y col., 2011).

Una segunda limitante en el uso de células troncales en la regeneración periodontal radica en la necesidad de realizar cultivos *in vitro* para la expansión de dichas células, en donde, se necesita el uso de medios de cultivo que requieren productos xenógenos (que provienen de una especie diferente) o heterólogos, como por ejemplo, el Suero Fetal Bovino. Este tipo de sueros podrían no estar libre de patógenos, además de

generar una respuesta de rechazo inmune al tratamiento en el paciente (Lin y col., 2009; Pejčić y col., 2013; Bieback 2013).

Por lo tanto, para el uso de células troncales de LPH como posible terapia celular se requiere, en primer lugar, identificar los factores que modulan su proliferación y su diferenciación a los linajes de los tejidos periodontales e igualmente, que la fuente de dichos factores no genere un rechazo inmune en el receptor.

Es por esto que, en el presente trabajo se sugiere que el PPP podría favorecer la diferenciación ósea/cemento de células troncales de LPH, emulando al PRP, permitiendo su uso en terapias de reconstrucción periodontal.



2. HIPÓTESIS

El Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) promueve la diferenciación ósea/cemento de las células troncales/progenitoras de Ligamento Periodontal Humano.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) en la diferenciación ósea/cemento de las Células Troncales/Progenitoras del Ligamento Periodontal Humano.

3.2. Objetivos Específicos

1. - Caracterizar los cultivos celulares obtenidos a partir de LPH.
2. - Evaluar la presencia de Factores de Crecimiento y Citoquinas en el PPP.
3. - Evaluar la diferenciación al linaje óseo/cemento de las células de LPH en presencia de PPP.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Material Plástico y Vidrio

- Placas de Cultivo Celular de 100mm de Poliestireno (#TR4002, Trueline®).
- Placas de Cultivo Celular de 6 pozos de Poliestireno (#TR5000, Trueline®).
- Placas de Cultivo Celular de 24 pozos de Poliestireno (#TR5002, Trueline®).
- Cubre-objetos Plásticos para Cultivo Celular de 13 mm (#83.1840.002, Sarstedt).
- Porta-objetos de vidrio 76 x 26 mm (#8200101, Hirschmann®).
- Cubre-objetos de vidrio de 12mm (#01 115 20, Marienfield).

4.1.2. Materiales utilizados para Cultivo Celular

- Medio de Cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (#SH30021.02, HyClone®).
- Medio de Cultivo STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation (#A10071-01, Gibco).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (#04-121-1ª, Biological Industries).
- Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B (#15240-062, Gibco).
- Tampón Fosfato Salino (PBS) (#SH30256.02, Hyclone®).
- Tripsina-EDTA (#25-053-CI, Corning).
- Azul de Tripán (#15250-061, Gibco).

4.1.3. Materiales utilizados para Histología

- Hematoxilina de Mayer (#008011, Invitrogen).
- Azul Alcian (#1016470500, Merck).
- Rojo Aceite (#O625-25G, Sigma-Aldrich).
- Rojo Alizarina (#1062780025, Merk).

- Sustrato para Fosfatasa Alcalina BCIP/NBT (#B1911, Calbiochem).
- Medio de Montaje Acuoso Aquatex (#1.08562.0050, Merck).
- Paraformaldehído (#A3813.0250, AppliChem®)
- Formaldehído 37% (#1.04003.1000, Merck)

4.1.4. Materiales utilizados para Inmuno-fluorescencia

- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (#D3571, Invitrogen).
- Medio de Montaje Fluoromont (#17984-25, Electron Microscopy).
- Albúmina de Suero Bovino (#BSA-50, Rockland).

4.1.5. Materiales utilizados para Western Blot

- Ortovanadato (#S6508, Sigma).
- Inhibidor de Proteasas Cocktail 1 (#539131, Calbiochem).
- Membrana de PDVF (#88518, Thermo-Scientific).
- Lumiglo (#54-61-00, KPL).
- Sustrato SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (#34095, Pierce).
- Películas radiográficas (#EVYAU, Agfa).
- 10X Tampón TG-SDS (#US19015, Calbiochem).

4.1.6. Cultivos Celulares

Se utilizaron los siguientes cultivos celulares:

- Cultivos Primarios de Células de Ligamento Periodontal Humano (LPH).
- Línea Celular de Osteosarcoma Humano, SaOs-2.

4.1.7. Materiales para la obtención y manipulación del Plasma Pobre en Plaquetas

- Se usó el Kit GPS® III Platelet Concentration System (#800-100 4A, Biomet Biologics) para la obtención de Plasma rico y Pobre en plaquetas.
- Kit Custom C-Series Human Antibody Array (#AAH-CUST-M, RayBiotech) para determinar los factores de crecimiento presentes en el Plasma.
- Kit Human Inflammatory Cytokine Kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) (#551811, BD®) para determinar citoquinas inflamatorias presentes en el Plasma.

4.1.8. Cuantificación de Calcio

- Se usó el Kit el Calcium Colorimetric Assay Kit (#K380-250, Biovision) para la medición de la concentración de calcio ($\mu\text{g/mL}$) en los cultivos.

4.1.9. Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

- Anti-STRO-1 (ab102969), Anti-CD146 (ab75769), Anti-Osteocalcina (OCN) (ab133612), Anti-Osterix (OSX) (ab94744), Anti-Fosfatasa Alcalina (FAL) (ab108337) y Anti-Actina Beta (ACT) (ab8226) todos de Abcam (San Francisco, California, USA).
- Anti-Tubulina Beta (TUB) (PA5-16863) de ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, USA).
- Anti-CD146 FITC (#130-092-851), Anti-CD45 PE (#130-080-201), Anti-CD11b-PE (#130-091-240), Anti-CD34-PE (#130-081-002), Anti-CD14- PE (#130-091-242) y CD79a PE (#130-098-657) de MiltenyiBiotecs (Cologne, Alemania).
- Anti-CD105 PerCP-Cy5.5 (#560819), Anti-CD73 V450 (#561255) y Anti-CD90 PE-Cy7 (#561558) de BD® (Franklin Lakes, NJ, USA).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios:

- Anti-Mouse IgM AlexaFluor® 488 (ab150121), Anti-Rabbit IgG (H&L) HRP (ab97051) y Anti-Mouse IgG (H&L) HRP (97023) de Abcam (San Francisco, California, USA).
- Anti-Rabbit IgG Cy3 (H+L) (#111-165-003) de Jackson (Lansing, Michigan, USA).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Cultivos primarios de Ligamento Periodontal Humano

Se obtuvieron Terceros Molares de donantes sistémicamente sanos, entre 18 y 24 años, previa firma de un consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se tomaron fragmentos de tejido de Ligamento Periodontal Humano (LPH) del tercio medio radicular, denominados explantes, de los cuales se cultivaron células en medio DMEM, suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) 10%, Penicilina 100U/mL, Estreptomina 100µg/mL y Anfotericina B 0,25g/mL (Martínez y col., 2011). Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂. La viabilidad celular fue evaluada con Azul de Tripán (Freshney 1987).

Los sub-cultivos de los cultivos primarios de LPH se hicieron utilizando tripsina-EDTA 0,25% que fue inactivada con DMEM suplementado con SFB al 10%. Todos los experimentos se realizaron con células entre los sub-cultivos 2 y 6.

4.2.2. Caracterización Celular

4.2.2.1. Citometría de Flujo

Las células de LPH obtenidas fueron caracterizadas mediante citometría de flujo según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para

determinar la presencia de MSC, los que incluyeron la expresión de CD73, CD105 y CD90 y la ausencia de expresión de las proteínas CD34, CD45, CD79, CD11b y CD14 (Dominici y col., 2006). La citometría de flujo se llevó a cabo según Martínez y col., 2011; Xu y col., 2009.

4.2.2.2. Inmuno-fluorescencia

Las células de LPH obtenidas fueron caracterizadas mediante inmuno-fluorescencia evaluando la expresión de los marcadores de MSC STRO-1 y CD146. Las células fueron fijadas durante 10 minutos a 4°C con PFA al 4%. Luego fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con PBS, se trataron con solución de bloqueo (PBS suplementado con Albúmina de Suero Bovino al 1%) y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios Anti-STRO-1 (1:30) y Anti-CD146 (1:50) en solución de bloqueo. Luego de tres lavados con PBS las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes Anti-Mouse IgM AlexaFluor® 488 y Anti-Rabbit IgG Cy3. Finalmente, se realizó la tinción nuclear con DAPI y fueron montadas en portaobjetos de vidrio con el medio de montaje Fluoromount (Martínez y col., 2011).

4.2.2.3. Diferenciación Ósea/cemento

Las células de LPH fueron sembradas a una densidad de 15.000 células en una superficie de 1,3cm² (cubre-objetos plásticos tratados para cultivo celular), las cuales fueron incubadas durante 21 días con medio osteogénico (DMEM suplementado con SFB al 10%, Dexametasona 0,1uM, β-glicerolfosfato 10mM y Ácido L-Ascórbico 2P 50ug/mL, Penicilina 100U/mL, Estreptomicina 100μg/mL y Anfotericina B 0,25g/mL). El medio de cultivo fue cambiado cada dos días. Como control negativo se usó medio

DMEM suplementado con SFB al 10% y Penicilina 100U/mL, Estreptomicina 100µg/mL y Anfotericina B 0,25g/mL).

Para evaluar la diferenciación ósea, las células fueron fijadas con formalina buffer y se tiñeron con Rojo Alizarina para visualizar los depósitos de calcio, simultáneamente se evaluó la actividad de Fosfatasa Alcalina mediante la tinción BCIP/NBT. Brevemente, las células fueron lavadas con agua bidestilada e incubadas con BCIP/NBT durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente fueron lavadas con agua e incubadas con Rojo Alizarina a pH 4,2 (se disolvieron 2gr de Rojo Alizarina en 100mL de agua bidestilada y se ajustó el pH a 4,2 con amoniacó 0,1%, se filtró con un filtro de nitrocelulosa de 0,2µm y se almacenó a temperatura ambiente en oscuridad) durante 1hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego fueron lavadas 3 veces con agua bidestilada y dos veces PBS durante 5 minutos. Finalmente, se montaron en porta-objetos de vidrio con el medio de montaje Aquatex. (Crisan y col., 2008; Martínez y col., 2011).

4.2.2.4. Diferenciación Adipogénica

Las células de LPH fueron sembradas a una densidad de 15.000 células en una superficie de 1,3cm² (cubre-objetos plásticos tratados para cultivo celular), las cuales fueron incubadas durante 21 días con medio adipogénico (DMEM suplementado con SFB10%, Dexametasona 1µM, Indometacina 100µM, Isobutilmetilxantina 0,5mM, Insulina 10ug/mL y Penicilina 100U/mL, Estreptomicina 100µg/mL y Anfotericina B 0,25g/mL). El medio fue cambiado cada dos días y como control negativo se usó medio DMEM suplementado con SFB al 10%

Para evaluar la diferenciación al tejido adiposo, las células fueron fijadas con Formalina Buffer y teñidas con una solución de trabajo de Rojo Aceite. Brevemente, se preparó

una solución stock a una concentración de 8,6mM (se disolvieron 350mg de Rojo Aceite disueltos en 100mL de Isopropanol la solución se agitó durante toda la noche y se filtró con un filtro de nitrocelulosa de 0,2µm). La solución de trabajo fue obtenida mezclando 6mL de la solución stock con 4mL de Agua Bidestilada, la mezcla se mantuvo 20 minutos a temperatura ambiente y se filtró nuevamente con un filtro de nitrocelulosa de 0,2µm. Las células fueron incubadas con la solución de trabajo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS, contra-coloreadas con Hematoxilina de Mayer durante 4 minutos, lavadas con PBS y montadas sobre porta-objetos de vidrio con el medio de montaje Aquatex. (Crisan y col., 2008; Xu y col., 2009; Martínez y col., 2011).

4.2.2.5. Diferenciación Condrogénica

Las células de LPH fueron sembradas a una densidad de 50.000 células en una superficie de 1,3cm² (cubre-objetos plásticos tratados para cultivo celular), las cuales fueron incubadas durante 21 días con medio condrogénico STEMPRO®, que fue cambiado cada dos días. Como control negativo se usó medio DMEM suplementado con SFB al 10% con Penicilina 100U/mL, Estreptomicina 100µg/mL y Anfotericina B 0,25g/mL.

Para evaluar la diferenciación condrogénica, las células fueron fijadas con Formalina Buffer y teñidas con Azul Alcian. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con 400µL de Azul Alcian durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, fueron lavadas y montadas en porta-objetos de vidrio con el medio de montaje Aquatex (Crisan y col., 2008; Martínez y col., 2011).

4.2.3. Obtención de Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)

Se obtuvo sangre venosa de donantes sistémicamente sanos (20 a 25 años) previa firma de un consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Se utilizó el Kit GPS® III Platelet Concentration System para separar las fracciones de PRP y PPP. Una vez separadas las fracciones de PRP y PPP con el kit, se indujo la activación de las plaquetas con cloruro de calcio (CaCl_2) al 10% y 1,5mL de Trombina Autóloga. Posteriormente se incubó durante 1 hora a 37°C, las fracciones fueron agitadas en vortex durante 1 minuto y centrifugadas durante 10 minutos a 3200 rpm. Finalmente, los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados con filtros de nitrocelulosa de 0,2 μm y almacenados a -80 °C en alícuotas de 1mL (Cáceres y col., 2011). En este trabajo fueron analizados PPP de 4 donantes diferentes.

4.2.4. Análisis de la Composición de PPP

Los sobrenadantes de PPP obtenidos fueron evaluados mediante un análisis proteómico para establecer la presencia de 44 citoquinas y factores de crecimiento, utilizando el Kit Custom C-Series Human Antibody Array que incluyó anticuerpos para las siguientes proteínas: Amfíregulina (AR), Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (bFGF), Factor de Crecimiento Nervioso Beta (b-NGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), Factor de Crecimiento Fibroblástico 4 (FGF-4), Factor de Crecimiento Fibroblástico 6 (FGF-6), Factor de Crecimiento Fibroblástico 7 (FGF-7), Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), Factor Neurotrófico Glial (GDNF), Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos Granulocitos (GM-CSF), Factor de Crecimiento Tipo EGF con unión a Heparina (HB-EGF), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), Proteína de

Unión 1 al Factor de Crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1), Proteína de Unión 2 a Factor de Crecimiento similar a la insulina (IGFBP-2), Proteína de Unión 3 a Factor de Crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3), Proteína de Unión 4 a Factor de Crecimiento similar a la insulina (IGFBP-4), Proteína de Unión 6 a Factor de Crecimiento similar a la insulina (IGFBP-6), Factor de Crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), Receptor Soluble del Factor de Crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1 sR), Factor de Crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF), Receptor del Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (M-CSF R), Neurotrofina 3 (NT-3), Neurotrofina 4 (NT-4), Receptor α del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF Ra), Receptor β del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF Rb), Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas $\alpha\alpha$ (PDGF-AA), Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas $\alpha\beta$ (PDGF-AB), Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas $\beta\beta$ (PDGF-BB), Factor de Crecimiento Placentario (PLGF), Factor de Crecimiento de Células Troncales (SCF), Receptor del Factor de Crecimiento de Células Troncales (SCF R), Factor de Crecimiento Transformante Alfa (TGF α), Factor de Crecimiento Transformante Beta 1 (TGF β 1), Factor de Crecimiento Transformante Beta 2 (TGF β 2), Factor de Crecimiento Transformante Beta 3 (TGF β 3), Factor de Crecimiento Vascular Endotelial A (VEGF-A), Receptor 2 del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGFR2), Receptor 3 del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial 3 (VEGFR3), Factor de Crecimiento Vascular Endotelial D (VEGF-D), Proteína Morfogenética Ósea 7 (BMP-7), Proteína Morfogenética Ósea 4 (BMP-4), N-Terminal de Sonic Hedgehog (Shh-N). Para la visualización de estas proteínas se siguieron las instrucciones del fabricante y finalmente, los resultados obtenidos fueron visualizados en películas radiográficas utilizando el sustrato quimioluminiscente del kit usado.

Igualmente se evaluó la presencia de Citoquinas Inflamatorias mediante un arreglo para citometría de flujo utilizando el Kit Human Inflammatory Cytokine Kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) que incluye: Interleucina-8 (IL-8), Interleucina 1 Beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e Interleucina 12p70 (IL-12p70).

4.2.5. Efecto del PPP durante la diferenciación ósea/cemento

Las células de LPH fueron sembradas a una densidad de 15.000 células en una superficie de 1,3cm² (cubre-objetos plásticos tratados para cultivo), las cuales fueron incubadas durante 21 días con medio osteogénico (Dexametasona 0,1 μ M, β -glicerolfosfato 10mM y Ácido L-Ascórbico 2P 50 μ g/mL, Penicilina 100U/mL, Estreptomina 100 μ g/mL y Anfotericina B 0,25g/mL), suplementado con PPP a diferentes concentraciones: 2,5%, 5% y 10%. Como control se usó medio osteogénico suplementado con SFB al 10% o al 2,5%. Posterior al tratamiento con PPP se evaluó el depósito de calcio en los cultivos primarios utilizando el método O-cresolftaleína complexona con un kit comercial para cuantificar calcio (Martínez y col., 2011). Al mismo tiempo se evidenciaron los depósitos de calcio mediante la tinción con Rojo Alizarina utilizando el protocolo mencionado anteriormente, y simultáneamente se evaluó la actividad de Fosfatasa Alcalina mediante la tinción BCIP/NBT (Martínez y col., 2011). Como control positivo de diferenciación ósea, se utilizó la línea celular SaOS-2 la que fue cultivada durante 21 días en presencia de medio osteogénico.

4.2.6. Western Blot

4.2.6.1. Análisis del efecto de PPP en la diferenciación óseo/cemento mediante expresión de proteínas por Western Blot

Se analizaron mediante western blot los niveles de proteínas de Fosfatasa Alcalina (FAL), Osterix (OSX) y Osteocalcina (OCN) en los cultivos primarios de LPH cultivados durante 20 días en medio osteogénico durante los días 5, 10, 15 y 20 durante el proceso de diferenciación. Como controles de carga se utilizaron las proteínas alfa Tubulina (TUB) o Beta Actina (ACT).

Las células de LPH fueron sembradas a una densidad de 200.000 células en una superficie de 9,6cm², las cuales fueron incubadas durante 21 días con medio osteogénico (DMEM, Dexametasona 0,1uM, β -glicerolfosfato 10mM y Ácido L-Ascórbico 2P 50ug/mL, Penicilina 100U/mL, Estreptomina 100 μ g/mL y Anfotericina B 0,25g/mL) suplementado con PPP al 2,5%. Como controles fueron utilizadas células incubadas con medio osteogénico con SFB al 2,5 y 10% y células incubadas con DMEM suplementado con SFB al 2,5 y 10%.

Las células fueron lisadas con el buffer de lisis RIPA (Cloruro de Sodio 150mM, Tritón X-100 al 1%, Deoxicolato de Sodio al 0,5%, SDS al 0,1% y Tris, pH 8,0 50mM) suplementado con el inhibidor de proteasas "Cocktail Inhibitor I" y Ortovanadato 10mM. Posteriormente, los lisados fueron centrifugados a 13.000rpm a 4°C y luego de 15 minutos se obtuvieron los sobrenadantes. La cantidad de proteína obtenida en estos sobrenadantes fue cuantificada con el kit Biorad protein assay DC. Luego, se les adicionó Sample Buffer (SDS al 8%, Glicerol al 40%, Tris 1M pH 6,8 al 24%, Azul de Bromofenol al 0,04% y DTT (1mM)) y fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Posteriormente, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% o al 15% en condiciones denaturantes aplicando un voltaje constante de 80V durante 2 a 3

horas. Luego se hizo la electro-transferencia de proteínas a una membrana de PDVF durante 16 horas a 25V a 4°C. Finalmente, las membranas de PDVF fueron incubadas con solución de bloqueo [leche descremada al 5% disuelta en TBST 1 (NaCl 1,37M, KCl 0,027M, TrisBase pH 8,0 0,25M y Tween al 0,1%)] e incubadas con los anticuerpos correspondientes (Anti-FAL 1:10.000; Anti-OSX 1:2.000; Anti-OCN 1:500; Anti-TUB 1:1.000 y Anti-ACT 1:2.500) durante toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente las membranas fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes (Anti-Rabbit HRP o Anti-Mouse HRP 1:20.000). Finalmente, las membranas fueron expuestas a películas radiográficas previa incubación con el reactivo de quimioluminiscencia LUMIGLO o SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate. Las películas radiográficas obtenidas fueron digitalizadas y analizadas densitométricamente utilizando el programa ImageJ y GraphPadPrism5. Para evaluar las diferentes proteínas (incluidos los controles de carga) luego de cada incubación y obtención de películas radiográficas, las membranas fueron lavadas con el buffer "Mild Stripping" según el protocolo de Abcam, para luego ser incubadas con el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate corroborando la ausencia de anticuerpo primario y secundario.

4.2.7. Análisis Estadístico

Todos los experimentos fueron hechos en triplicado y el análisis de los resultados incluyó PPP de 4 donantes distintos, así como cultivos primarios de LPH de 3 donantes diferentes. Para establecer diferencias entre los controles y tratamientos utilizados, los resultados obtenidos de los experimentos con las distintas técnicas descritas fueron graficados y analizados estadísticamente con un intervalo de confianza del 95% (t-student) con el programa GraphPadPrism5 (Cumming y col., 2007).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de los cultivos primarios obtenidos a partir de LPH

Resultados obtenidos previamente en el laboratorio de fisiología periodontal indicaron que, al analizar por citometría de flujo, el 98% de las células de LPH entre sub-cultivos 2 - 6 expresaron los antígenos de superficie CD73, CD105 y CD90. En tanto, las mismas no presentaron la expresión de CD34, CD45, CD79, CD11b y CD14, cumpliendo con los criterios establecidos para determinar la presencia de células troncales (figura 3.A y 3.C). Igualmente el 2,7% de las células de los cultivos primarios de LPH fue positivo para el marcador de células troncales mesenquimáticas CD146 (Figura 3.B)

Al iniciar este trabajo de tesis de pregrado se confirmó mediante inmuno-fluorescencia que los cultivos primarios de LPH expresan las proteínas CD146 y STRO-1 que han sido reportados previamente como marcadores para MSC (Figura 3.D) (Lin y col., 2009; Martínez y col., 2011).

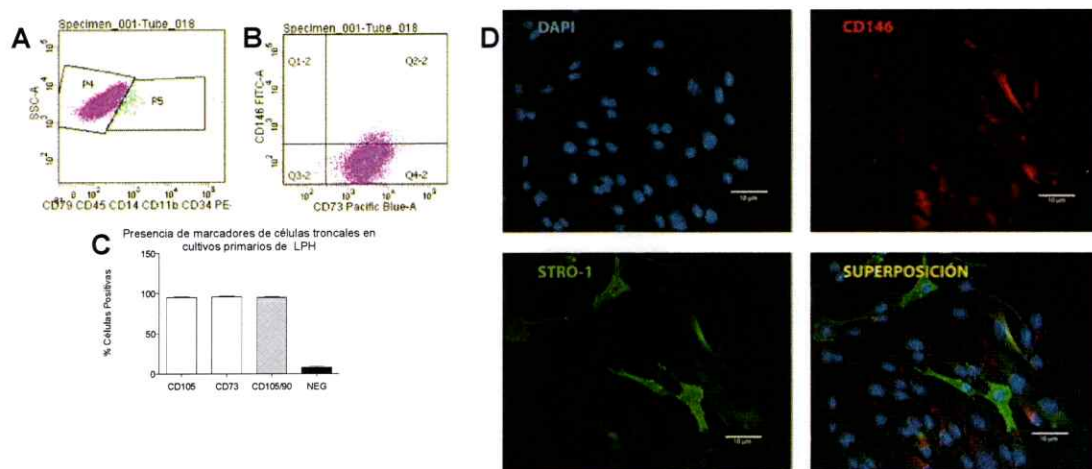


Figura 3. Los cultivos primarios obtenidos a partir de LPH poseen los marcadores característicos de MSC. (A) La población que fue negativa para los marcadores CD34, CD45, CD79, CD11b y CD14 corresponde a P4 = 98%. (B) El 2,7% de la población de células de LPH fueron positivas para CD146. (C) La población positiva para los marcadores CD105, CD73 y CD90 fue cercana a un 100%. N = 13. 10.000 Células de LPH por cada medición. Se graficó Promedio \pm Error Estándar. (D) Imágenes representativas de Inmuno-fluorescencia para los marcadores STRO-1 (Verde) y CD146 (Rojo). El núcleo se marcó con DAPI (Azul). Barra de aumento = 10 μ m. Subcultivos 2 - 6. N = 3.

Igualmente, se evaluó el potencial de diferenciación de las células obtenidas a los linajes óseo/cemento, adiposo y cartilaginoso. Para ello las células de LPH entre subcultivos 2 – 6 fueron incubadas con los medios osteogénico, adipogénico o condrogénico durante 21 días y posteriormente teñidas con tinciones específicas para cada linaje. Las células fueron capaces de diferenciarse a los tres linajes. En presencia de medio condrogénico formaron agregados celulares teñidos con Azul Alcian (Figura 4.D). Igualmente, en presencia de medio adipogénico se evidenciaron células con gotas de lípidos que son teñidas con aceite rojo (Figura 4.E) y finalmente, en presencia de medio osteogénico, se pueden observar nódulos de mineralización teñidos intensamente con la tinción de Rojo Alizarina (Figura 4.F). En ningún caso se observó presencia de células diferenciadas en los cultivos tratados con los medios de control (Figuras 4.A, 4.B y 4.C).

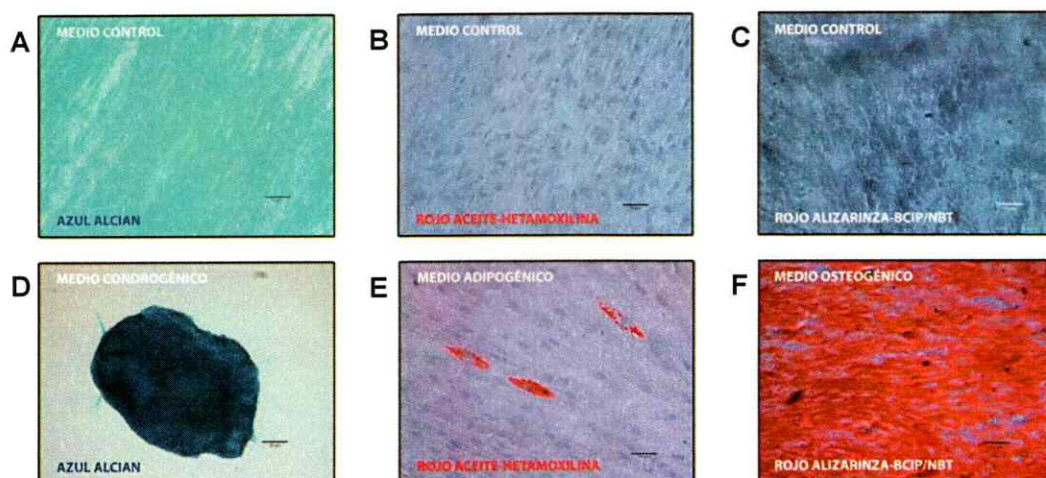


Figura 4. Potencial de diferenciación de las células de LPH
 Imágenes representativas de: (A), (B) y (C) Medios controles (DMEM suplementado con SFB al10%). (D) Formación de agregados celulares positivos para tinción Azul Alcian. (E) Células con gotas de lípidos positivas para la tinción con Rojo Aceite, contra-coloreadas con Hematoxilina de Mayer y (F) Formación de depósitos de calcio contra-coloreados con BCIP/NBT (actividad de fosfatasa alcalina). Barra de aumento, A y D = 20 μ m, B, C, E y F = 10 μ m. Subcultivos 2 – 6. Células de LPH, N = 3.

Por lo tanto, se determinó que existen MSC en los cultivos primarios obtenidos a partir de LPH, que se caracterizan por la expresión de los marcadores CD90, CD105, CD73,

CD146, STRO-1 y la capacidad de diferenciarse a los linajes condrogénico, adipogénico y óseo/cemento, cumpliendo con los criterios mínimos establecidos por la ISCT (Dominici y col., 2006).

5.2. Caracterización de los PPP obtenidos

Una vez separadas las fracciones de PPP a partir de sangre venosa de donantes sanos con el Kit GPS III y realizada la activación plaquetaria con cloruro de calcio y trombina autóloga, los sobrenadantes que fueron almacenados a -80°C . Los sobrenadantes fueron analizados mediante un arreglo proteómico (RayBio® Custom C-Series Human Antibody Array) evaluando la expresión relativa de 44 proteínas relacionadas con reparación tisular.

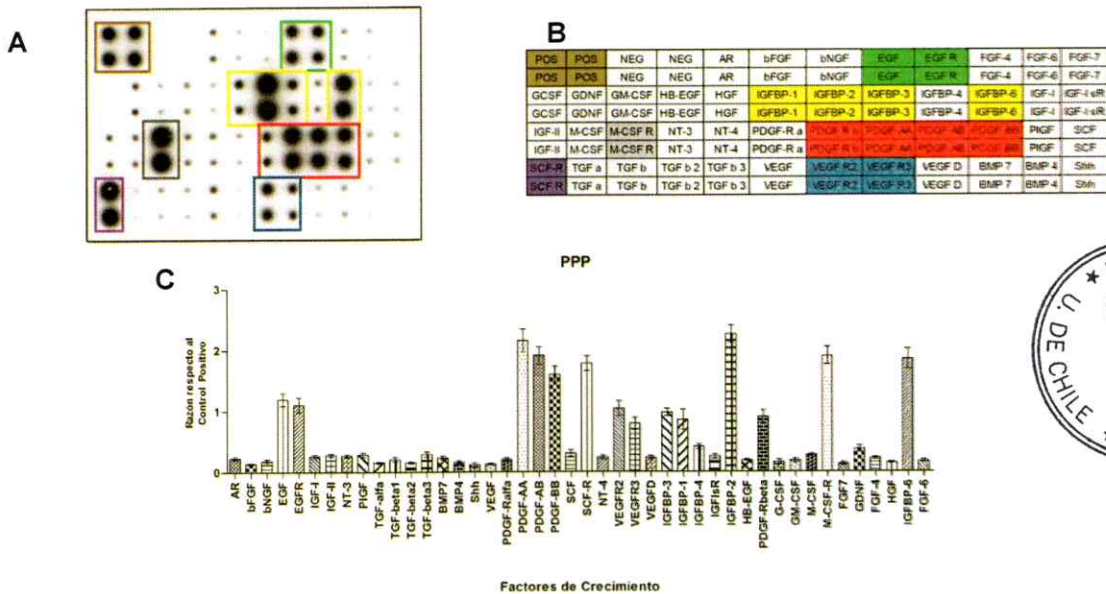


Figura 5. Análisis proteómico de los PPPs obtenidos.

(A) Imagen representativa del arreglo proteómico utilizado (B) Distribución de factores de crecimiento en el arreglo (C) Cuantificación densitométrica de los factores de crecimiento presentes en el PPP. Se graficó el Promedio \pm Error Estándar. N=4

Se observó en 4 PPPs de diferentes donantes, que la expresión relativa de las siguientes proteínas fue destacada: EGF y EGF-R; IGFBP-1, 2, 3 y 6; M-CSF-R; PDGF-AA, BB, AB y Rb; SCF-R, y VEGF-R2 y VEGF-R3 (Figura 5).

Igualmente, se evaluó la presencia de citoquinas Inflammatorias en los sobrenadantes de PPP descongelados (Figura 6) mediante un servicio contratado al Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, donde se analizaron diversas citoquinas (incluidas las presentes en el Kit BD™ Cytometric Bead Array [CBA] utilizado en el servicio), tales como: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF e IFN- γ . Se evidenció una mayor cantidad de las citoquinas: IL-8, IL-12 e IL-17 en los 4 PPPs analizados, siendo particularmente alto los niveles de IL-12.

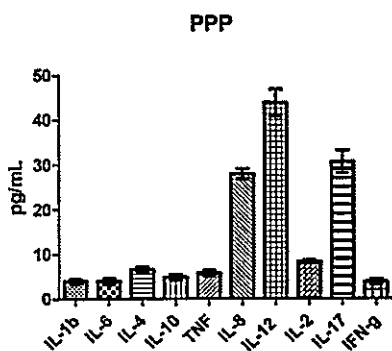


Figura 6. Cuantificación de Citoquinas presentes en el PPP mediante análisis de Citometría de Flujo. Cuantificación de Citoquinas presentes en el PPP (pg/mL). Se destaca la presencia de IL-8, IL-12 e IL-17. Se graficó Promedio \pm Error Estándar. N = 4.

5.3. Efecto del tratamiento del PPP durante el proceso de diferenciación ósea

Las células obtenidas a partir de LPH de un solo donante, fueron incubadas durante 21 días en presencia de medio osteogénico y tratadas con diferentes concentraciones de PPP (2,5%, 5% y 10%) provenientes de dos donantes diferentes. Como controles se usaron medio DMEM suplementado con 3 concentraciones de PPP (2,5%, 5% y 10%) y medio de cultivo (DMEM y osteogénico) suplementado con SFB al 10%. Transcurrido el tiempo indicado, se cuantificó el calcio depositado en las monocapas celulares.

La concentración de calcio ($\mu\text{g/mL}$) depositada por las células de LPH fue mayor en el tratamiento con medio osteogénico suplementado con PPP que en el control positivo (medio osteogénico suplementado con SFB al 10%) (Figura 7.A). Además, se hizo un control negativo para todos los experimentos sin medio osteogénico (DMEM suplementado con PPP), que confirmó la necesidad de la presencia del medio inductor para llevar a cabo el depósito de calcio en presencia de PPP (Figura 7.A).

Posteriormente, células obtenidas a partir de LPH de 3 donantes diferentes fueron incubadas durante 21 días en presencia de medio osteogénico y tratadas con diferentes concentraciones de un solo PPP (2,5%, 5% y 10%). Como controles se usaron medios de cultivo (DMEM y medio osteogénico) suplementados con SFB al 10%. Transcurridos los 21 días de incubación con los medios se cuantificó el calcio depositado en las monocapas celulares.

Interesantemente, la concentración de calcio ($\mu\text{g/mL}$) obtenida fue similar entre los tratamientos con las 3 concentraciones de PPP utilizadas, la cual fue mayor que la obtenida en el medio control (medio osteogénico) suplementado con SFB al 10% (Figura 7.B). Al tratar las células obtenidas a partir de LPH de los 3 donantes utilizados anteriormente con un PPP de un donante diferente al ya utilizado, se observó que la concentración de calcio ($\mu\text{g/mL}$) obtenida desde las células con el estímulo de PPP fue similar entre las 3 concentraciones utilizadas siendo mayor que la obtenida en el medio control (DMEM y medio osteogénico) con SFB al 10% (Figura 7.C).

En la figura 7.D se resumen estas observaciones concluyéndose que la concentración de calcio obtenida con el PPP de ambos donantes, como tratamiento en las células de LPH de los 3 donantes, es similar entre las diferentes concentraciones utilizadas (2,5%, 5% y 10%).

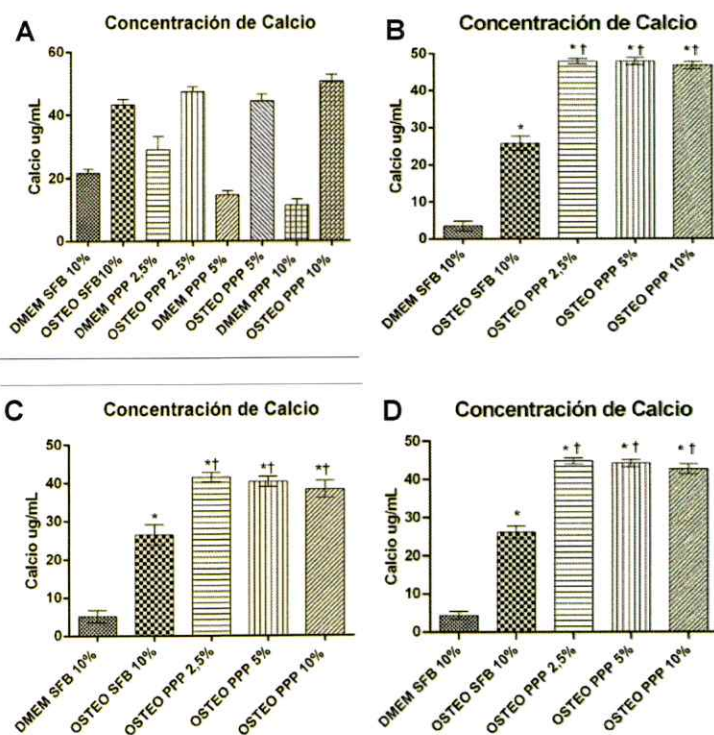


Figura 7. Calcio depositado en los cultivos celulares obtenidos después de 21 días de tratamiento con PPP. Cuantificación de calcio en (A) monocapas celulares tratadas con los medios de control utilizados. Células de LPH, N = 1. PPP, N = 2. (B) tratamiento con PPP de un solo donante sobre células de LPH. Células de LPH, N = 3. PPP, N=1. (C) tratamiento con PPP de un donante diferente sobre células de LPH. Células de LPH, N = 3. PPP, N = 1. (D) Resumen promedio de los datos obtenidos de (B) y (C). Se analizó mediante "ANOVA de 1 Vía", considerando los resultados significativamente diferentes cuando $p < 0,05$, (* Con respecto a DMEM SFB 10%. † Con respecto a OSTEO SFB 10%). Se graficó Promedio \pm Error Estándar.

Posteriormente, células obtenidas a partir de LPH de un solo donante, fueron incubadas durante 21 días en presencia de medio osteogénico y tratadas con diferentes concentraciones de PPP (2,5%, 5% y 10%) de 4 donantes diferentes, como controles se utilizaron medios de cultivo (DMEM o medio osteogénico) suplementados con SFB al 2,5 y 10%. Transcurridos los 21 días de incubación con los medios se cuantificó el calcio depositado en las monocapas celulares.

La concentración de calcio ($\mu\text{g/mL}$) obtenida fue similar entre las 3 concentraciones de PPP utilizadas (2,5%, 5% y 10%) y esta concentración de calcio fue mayor que las obtenidas en los medios controles con SFB al 2,5% y al 10% (Figura 8.A).

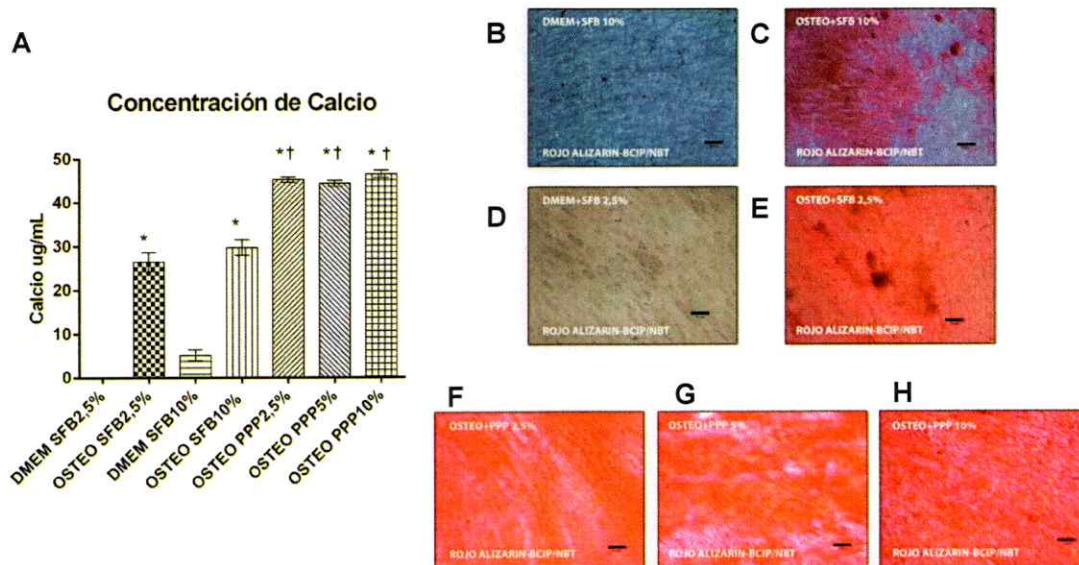


Figura 8. Concentración de Calcio depositado en los cultivos celulares obtenidos después de 21 días de tratamiento con PPP de 4 donantes diferentes.

(A) Cuantificación de Calcio en $\mu\text{g/mL}$ en células de LPH tratadas con los medios indicados durante 21 días. Imágenes representativas de: (C, E, F, G y H) los depósitos de calcio teñidos con rojo alizarina en las células de LPH, en presencia de medio osteogénico con el tratamiento con PPP (2,5%, 5% y 10%) y SFB al 2,5% y al 10%, (B y D) se observa que las células tratadas con medio control (DMEM suplementado con SFB al 2,5% y 10%) no muestran nódulos de mineralización. Se contra-coloreó con BCIP/NBT para ver la actividad Fosfatasa Alcalina.

"ANOVA de 1 Vía", considerando los resultados significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. (* Con respecto a DMEM SFB 2,5% y 10%. † Con respecto a OSTEO SFB 2,5% y 10%). Se graficó Promedio \pm Error Estándar. PPP; N=4. Células de LPH; N=1. Barra de aumento = $10\mu\text{m}$.

Finalmente, se pudieron observar nódulos de mineralización teñidos intensamente con la tinción de Rojo Alizarina en las células tratadas con medio osteogénico suplementado con PPP (Figura 8.F, 8.G y 8.H). Esta tinción fue menos intensa en las células con los medios (DMEM y medio osteogénico) suplementados con SFB al 2,5% y 10% (Figura 8.C y 8.E). Las células obtenidas de LPH, cultivada sin medio osteogénico (DMEM) suplementados con SFB al 2,5% y 10%, fueron positivas para la tinción contra Fosfatasa Alcalina (Figura 8.B y 8.D).

Estos resultados indican que las células tratadas con PPP se diferencian en mayor medida a linaje óseo/cemento que las células tratadas con SFB, lo que se evidenció en un aumento en las concentraciones de calcio cuantificadas y en la intensidad de la tinción de rojo alizarina.

Para evaluar el efecto del PPP más tempranamente en el proceso de diferenciación, se analizó el depósito de calcio en las monocapas celulares obtenidas después de 14 días de tratamiento con PPP.

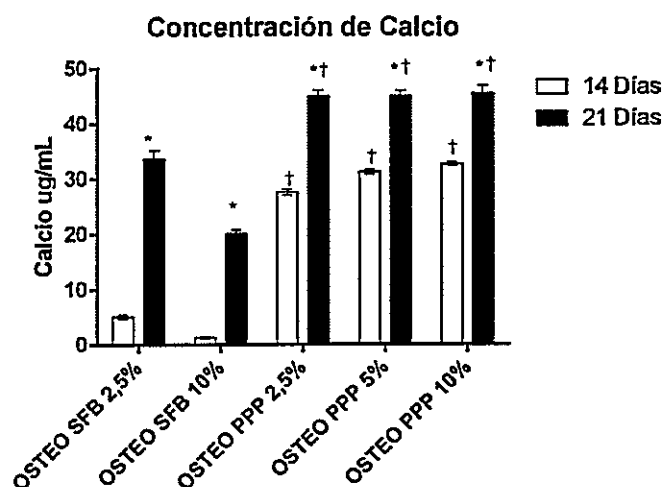


Figura 9. Cuantificación de la concentración de Calcio obtenida con el estímulo de PPP al Día 14 y 21 de cultivo.

Se cultivaron células de LPH durante 14 y 21 días, con medio osteogénico y a tres concentraciones de PPP diferentes (2,5%, 5% y 10%), además se evaluó SFB al 2,5% y 10% con DMEM y medio osteogénico. Se aplicó PPP de 2 donantes diferentes a células de LPH de un solo donante. Anova de 2 Vías*, considerando los resultados diferentes significativamente cuando $p < 0,05$. (* Con respecto a su control interno a los 14 días. † Con respecto a DMEM SFB 2,5% y 10% y OSTEO SFB 2,5% y 10%). Se graficó Promedio \pm Error Estándar. PPP; N=2. Células de LPH; N=1.

Las células obtenidas a partir de LPH de 1 solo donante fueron incubadas durante 14 días en presencia de medio osteogénico y tratadas con diferentes concentraciones de PPP (2,5%, 5% y 10%) de 2 donantes diferentes, como controles se usaron medios de cultivo (DMEM y medio osteogénico) suplementados con SFB al 2,5 y al 10%. Transcurridos los 14 días de incubación con los medios se cuantificó el calcio depositado.

La concentración de calcio ($\mu\text{g/mL}$) obtenida fue similar entre las 3 concentraciones utilizadas de PPP (2,5%, 5% y 10%) y esta concentración fue mayor que las obtenidas en los medios con SFB al 2,5% y al 10% a los 14 días de cultivo (Figura 9). En línea con lo esperado, las concentraciones de calcio obtenidas con el tratamiento con PPP a

los 14 días fue menor que las concentraciones de calcio obtenidas a los 21 días con PPP. Además, la concentración de calcio ($\mu\text{g/mL}$) obtenida con el tratamiento con PPP entre las 3 concentraciones a los 14 días de cultivo fue mayor que el control con medio osteogénico suplementado con SFB al 10% de los cultivos realizados durante 21 días y fue similar a la concentración obtenida con el control con medio osteogénico suplementado con SFB al 2,5% de los cultivos realizados durante 21 días.

Estos datos, en su conjunto, sugieren una aceleración en el proceso de diferenciación de las células de LPH dada por el tratamiento con PPP.

5.4. Niveles de expresión de proteínas durante el proceso de diferenciación ósea en células de LPH tratadas con PPP

Una vez cuantificadas las concentraciones del calcio depositado por las células obtenidas de LPH tratadas con PPP a diferentes concentraciones, se evaluaron mediante Western Blot los niveles de expresión de las proteínas Fosfatasa Alcalina (FAL), Osterix (OSX) y Osteocalcina (OCN) que están involucradas en el proceso de diferenciación ósea.

Según lo reportado en la literatura, durante el proceso de diferenciación ósea hay un aumento en la expresión de FAL en etapas tempranas (paso de progenitores óseos a pre-osteoblastos). Asimismo, cuando avanza el proceso de diferenciación, la expresión de FAL disminuye y aumenta la expresión de OSX quien comanda el paso de pre-osteoblastos a osteoblastos (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013). Posteriormente, cuando el osteoblasto se convierte en un osteoblasto maduro aumenta la producción de la fase orgánica del hueso y aumenta la expresión de OCN. Finalmente, se detiene la expresión de FAL, OSX y OCN, el osteoblasto maduro se ve rodeado de matriz y se diferencia terminalmente a un Osteocito (Miron & Zhang 2012; Liu & Lee 2013).

Las células obtenidas de LPH de un solo donante fueron incubadas durante 20 días en presencia de medio osteogénico y tratadas con PPP de 4 donantes al 2,5%, como controles se utilizaron los medios osteogénicos suplementados con SFB al 2,5% y al 10%. Además, las células de LPH se cultivaron con medio DMEM suplementado con SFB al 2,5% y 10%, los que corresponden a la condición basal del experimento.

Se obtuvieron lisados celulares de células de LPH cultivadas con medio DMEM suplementado con SFB al 10%, lo que se denominó día 0. Una vez comenzado el tratamiento de las células de LPH con PPP, se obtuvieron lisados celulares en los días 5, 10, 15 y 20 de cultivo. Como control se utilizó la línea celular de osteosarcoma humano, SaOS-2. Todos los resultados obtenidos de las densitometrías se normalizaron contra el control de carga y la condición basal correspondiente.

5.4.1. Niveles de expresión de FAL y OSX en células al día 0 de Cultivo

Las células de LPH expresaron niveles basales de las proteínas FAL (Figura 10.A) que se correlacionan con los resultados obtenidos en las tinciones contra Fosfatasa Alcalina realizados previamente (Figura 8.B yD). Sin embargo, la proteína con mayor expresión en estas células correspondió a OSX (Figura 10.C).

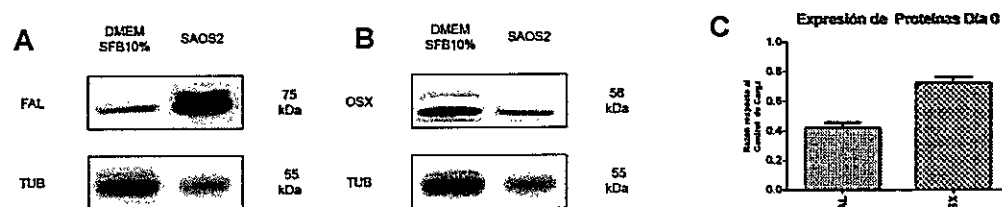


Figura 10. Western Blot y análisis densitométrico del Día 0 de cultivo. Se cultivaron células de LPH con SFB al 10% con DMEM. Imágenes representativas de Western Blot de (A) FAL, (B) OSX y (C) su cuantificación densitométrica. Como control de carga se utilizó Tubulina Beta. Día 0, N=6. Se normalizó contra el control de carga y las células SaOS-2. Se graficó Promedio \pm Error Estándar.

5.4.2. Niveles de expresión de FAL en células tratadas con PPP

Los niveles de expresión relativa de FAL aumentaron entre el día 0 al día 5, siendo similares entre las diferentes condiciones (Figura 11.A y E). Al día 10 de cultivo, hubo un aumento en la expresión relativa de FAL en el tratamiento con medio osteogénico suplementado con SFB al 2,5%, en cambio en el tratamiento con PPP hubo una disminución de la expresión relativa de FAL, ambos en comparación con el día 5 (Figura 11.B y F).

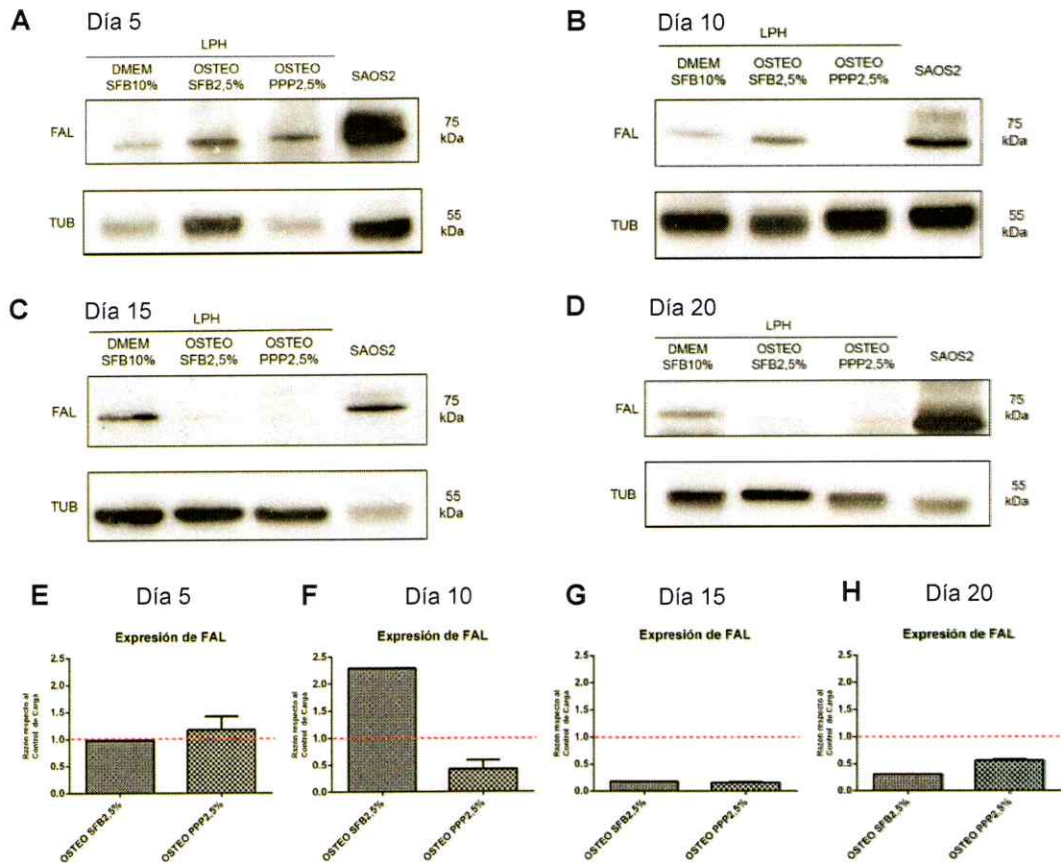


Figura 11. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión de FAL en el tiempo.

Se cultivaron células de LPH con PPP al 2,5% con medio osteogénico, con DMEM con SFB al 10% y con medio osteogénico con SFB al 2,5%. Imágenes representativas de Western Blot y su cuantificación densitométrica de (A) y (E) Día 5, (B) y (F) Día 10, (C) y (G) Día 15 y (D) y (H) Día 20, respectivamente. Como control de carga se utilizó Tubulina Beta. PPP N=4; SFB 10% N=1 y SFB 2,5% N=1. Se normalizó contra el control de carga y el tratamiento con DMEM con SFB al 10% (Condición Basal: Línea Roja Punteada). Se graficó Promedio \pm Error Estándar.

Finalmente, al día 15 y 20 (Figura 11.C y G; Figura 11.D y H, respectivamente) hubo una disminución en la expresión relativa de FAL comparada con los días anteriores (días 5 y 10) y con respecto a la condición basal.

Para validar los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de expresión relativa de FAL de las células tratadas con PPP, incluimos experimentos independientes en donde analizamos en controles adicionales los niveles de expresión de FAL, estos controles corresponden al medio osteogénico suplementado con SFB al 2,5% y al 10% y medio DMEM suplementado con SFB al 2,5% y 10% como condiciones basales.

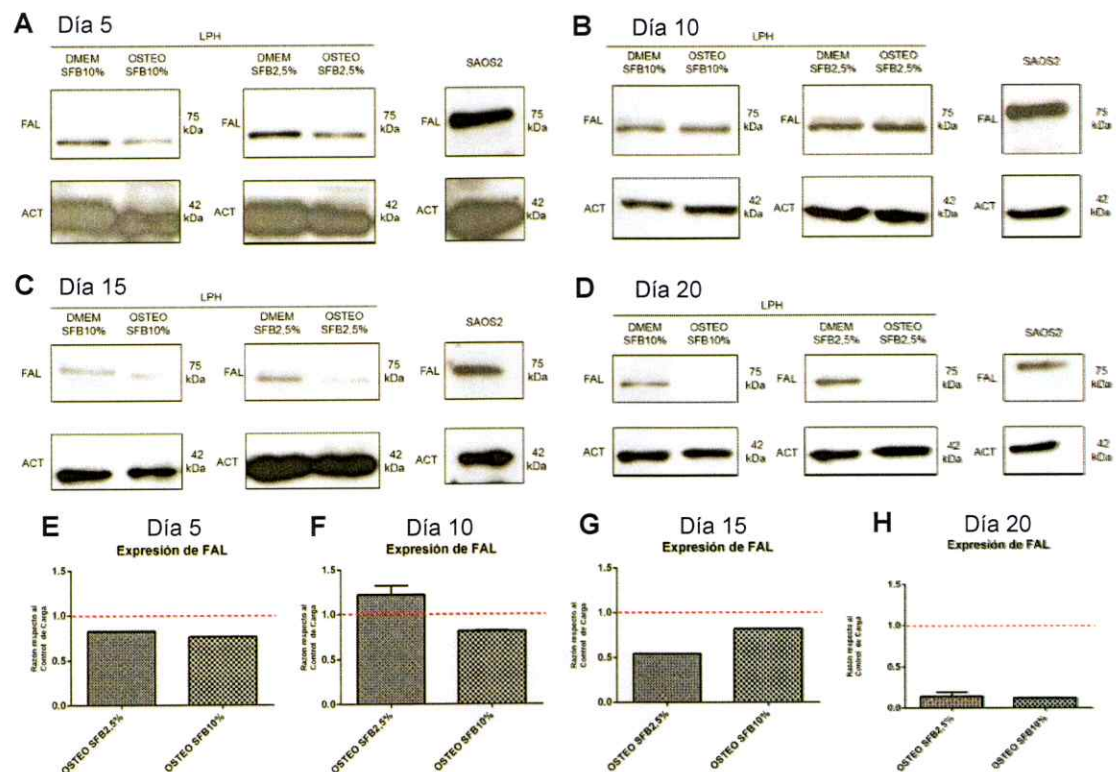


Figura 12. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión de FAL en Controles.

Se cultivaron células de LPH con SFB al 10% y al 2,5% en ausencia y presencia de medio osteogénico. Imágenes representativas de Western Blot y su cuantificación densitométrica de (A) y (E) Día 5, (B) y (F) Día 10, (C) y (G) Día 15, y (D) y (H) Día 20, respectivamente. Como control de carga se utilizó Actina Beta. Día 5 y 15; SFB 10% DMEM y SFB 2,5% DMEM, N=2; SFB 10% OSTEO y SFB 2,5% OSTEO, N=1. Día 10 y 20; SFB 10% DMEM, SFB 10% OSTEO, SFB 2,5% DMEM y SFB 2,5% OSTEO, N=2. Se normalizó contra el control de carga y el tratamiento con DMEM suplementado con SFB al 2,5% y al 10% (Condiciones Basales: Línea Roja Punteada). Se graficó Promedio \pm Error Estándar.

Se observó que las células de LPH al día 5 de cultivo presentaron niveles de expresión de FAL similares entre los diferentes controles (Figura 12.A y E). Además, la expresión de FAL fueron similares entre los días 5, 10 y 15, en el control con SFB al 10% (Figura 12.A y E, Figura 12.B y F, y Figura 12.C y G, respectivamente).

Al día 10 de cultivo, se observa un leve aumento en la expresión relativa de FAL en el control con SFB al 2,5% comparado con el día 5 y con la condición basal (Figura 12.B y F). Al día 15 de cultivo, la expresión relativa de FAL disminuye en control con SFB al 2,5% (Figura 12.C y G) en comparación con los días anteriores (día 5 y 10) y la condición basal.

Finalmente, en el día 20 la expresión relativa de FAL disminuye en ambos controles (SFB con 2,5% y 10%) en comparación a los días anteriores (día 5, 10, 15 y 20) y a la condición basal (Figura 12.D y H).

Por tanto, de esta serie de experimentos concluimos que el aumento de la expresión de FAL se observa más tempranamente en el tiempo en los cultivos con PPP (día 5) con respecto a los cultivos con SFB (día 10), apuntando que el proceso de diferenciación ósea de las células de LPH ocurre de manera anticipada bajo el tratamiento con PPP, lo que indicaría una aceleración de dicho proceso.

5.4.3. Niveles de expresión de OSX en células tratadas con PPP

Las células de LPH al día 5 de cultivo presentaron niveles de expresión relativa de OSX similares entre el estímulo de PPP, el control con SFB al 2,5% y la condición basal, siendo similares a la expresión de OSX vista en el día 0. (Figura 13.A y E).

Al día 10 de cultivo, se observó que la expresión relativa de OSX en células de LPH tratadas con PPP aumentó con respecto al día 5, al control con SFB al 2,5% y la condición basal (Figura 13.B y F).

Para el día 15 la expresión relativa de OSX en el tratamiento con PPP disminuyó siendo similar al control con SFB al 2,5% y la condición basal (Figura 13.C y G), esta expresión en las diferentes condiciones se mantuvo similar para el día 20 de cultivo (Figura 13.D y H).

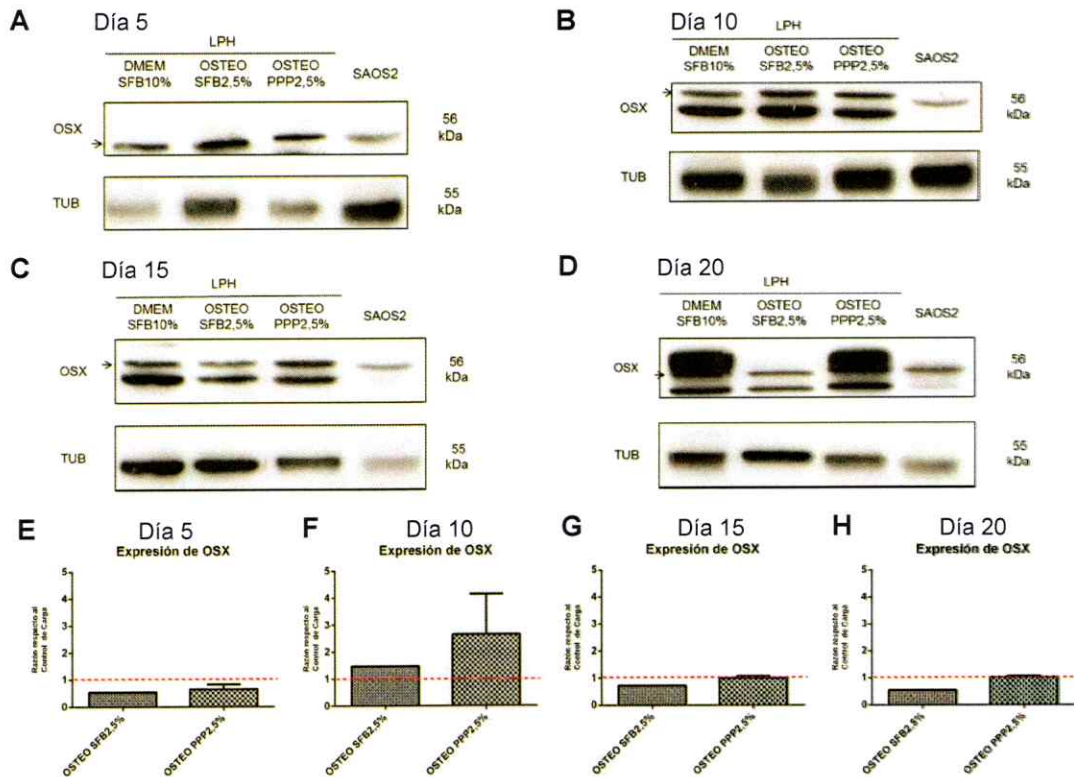


Figura 13. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión de OSX.

Se cultivaron células de LPH con PPP al 2,5% con medio osteogénico, con SFB al 10% con DMEM y SFB al 2,5% con medio osteogénico. Imágenes representativas de Western Blot y su cuantificación densitométrica de (A) y (E) Día 5, (B) y (F) Día 10, (C) y (G) Día 15, y (D) y (H) Día 20, respectivamente. Como control de carga se utilizó Tubulina Beta. PPP N=4; SFB 10% N=1 y SFB 2,5% N=1. Se normalizó contra el control de carga y el tratamiento con DMEM con SFB al 10% (Condición Basal: Línea Roja Punteada). Se graficó Promedio \pm Error Estándar.

Para validar los resultados obtenidos en los niveles de expresión de OSX de las células tratadas con PPP, incluimos experimentos independientes en donde analizamos en los controles faltantes del experimento anterior los niveles de expresión de OSX, estos controles corresponden al medio osteogénico suplementado con SFB al 2,5% y al 10% y medio DMEM suplementado con SFB al 2,5% y 10% como condiciones basales.

Se observó que al día 5 de cultivo hubo una mayor expresión de OSX en las condiciones con medio osteogénico suplementado con SFB al 2,5% y al 10% comparado con las condiciones basales (Figura 14.A y E).

Al día 10 de cultivo, la expresión de OSX fue similar entre las condiciones con medio osteogénico suplementado con SFB al 2,5% y al 10% y las condiciones basales, pero disminuyeron en comparación con el día 5 (Figura 14.B y F).

Al día 15 de cultivo, la expresión de OSX disminuyó en los tratamientos con medio osteogénico con SFB al 2,5% y 10% en comparación con el día 10 (Figura 14.C y F).

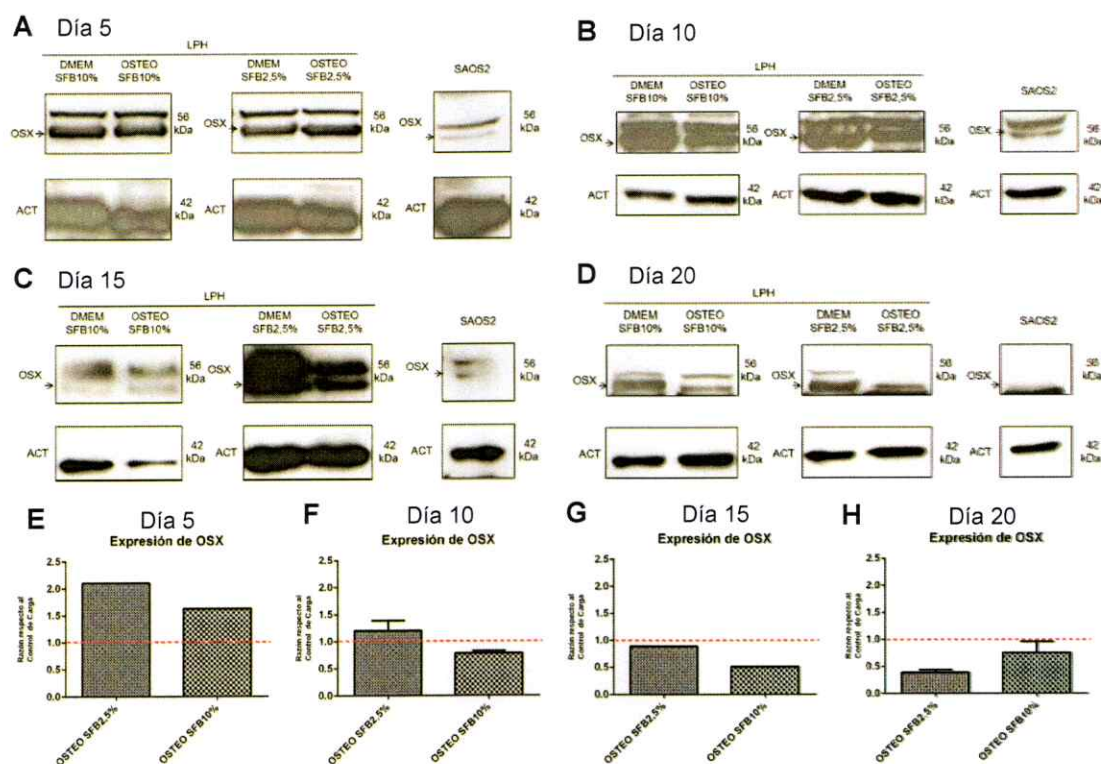


Figura 14. Western Blot y análisis densitométrico de la Expresión de OSX en Controles.

Se cultivaron células de LPH con SFB al 10% y al 2,5% en ausencia y presencia de medio osteogénico. Imágenes representativas de Western Blot y su cuantificación densitométrica de (A) y (E) Día 5, (B) y (F) Día 10, (C) y (G) Día 15 y (D) y (H) Día 20. Como control de carga se utilizó Actina Beta. Día 5 y 15; SFB 10% DMEM y SFB 2,5% DMEM, N=2; SFB 10% OSTEO y SFB 2,5% OSTEO, N=1. Día 10; SFB 10% DMEM, SFB 10% OSTEO y SFB 2,5% OSTEO, N=2. Día 20; SFB 10% DMEM, SFB 10% OSTEO, SFB 2,5% DMEM y SFB 2,5% OSTEO, N=2. Se normalizó contra el control de carga y el tratamiento con DMEM con SFB al 2,5% y al 10% (Condiciones Basales: Línea Roja Punteada). Se graficó Promedio \pm Error Estándar.

Finalmente, al día 20, la expresión de OSX observada en el medio osteogénico con SFB al 2,5% disminuyó comparada con la expresión del día 15, en cambio en el control con SFB al 10% se mantuvo similar a la condición basal (Figura 14.D y H).

Por tanto, el comportamiento en la expresión de OSX en el PPP muestra la tendencia esperada con un alza en la expresión de OSX (día 5) y luego una disminución, lo que no ocurre en los controles con SFB, lo que indicaría que el proceso ocurre de manera anticipada bajo el tratamiento con PPP, apuntando a una aceleración de dicho proceso.

5.4.4. Niveles de expresión de OCN en células tratadas con PPP

A los días 5 y 20 de cultivo no se observó la expresión de OCN en los cultivos de células de LPH, tanto con el tratamiento con PPP como en los controles.

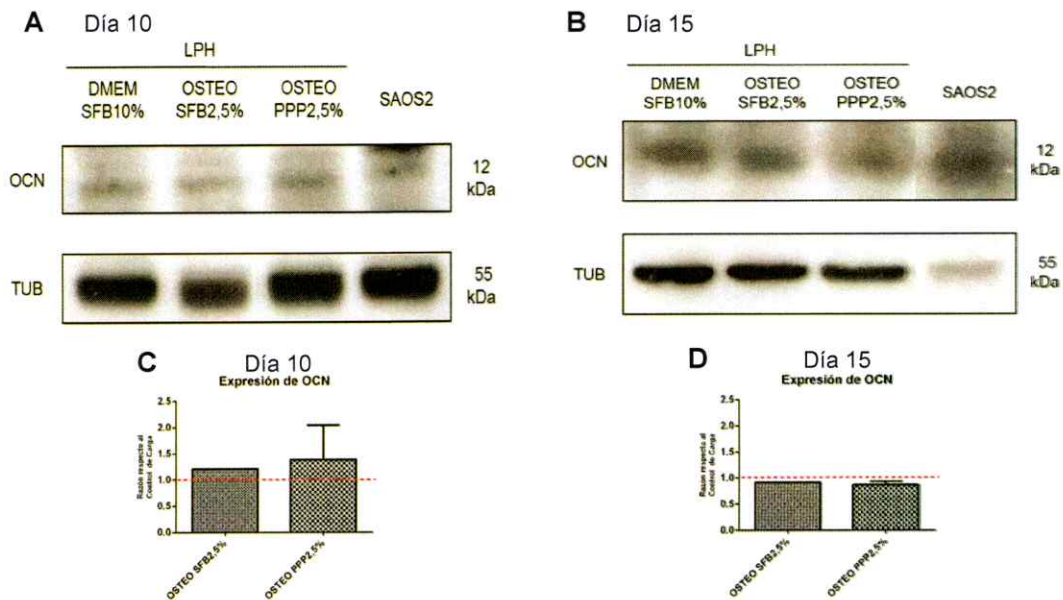


Figura 15. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión de OCN.

Se cultivaron células de LPH con PPP al 2,5% con medio osteogénico, con SFB al 10% con DMEM y SFB al 2,5% con medio osteogénico. Imágenes representativas de Western Blot y su cuantificación densitométrica de (A) Día 10 y (B) Día 15. Como control de carga se utilizó Tubulina Beta. PPP N=4; SFB 10% N=1 y SFB 2,5% N=1. Se normalizó contra el control de carga y el tratamiento con DMEM con SFB al 10%. Se graficó Promedio \pm Error Estándar.

Al día 10 de cultivo, se observó que las células de LPH presentaron niveles de expresión similares entre las células tratadas con PPP al 2,5%, el control SFB al 2,5% en presencia de medio osteogénico y la condición basal (Figura 15.A y C).

Al día 15 de cultivo, se observó que las células de LPH presentaron niveles de expresión de OCN similares entre las células tratadas con PPP al 2,5%, el control con SFB al 2,5% en presencia de medio osteogénico y la condición basal (Figura 15.B y D), los cuales fueron ligeramente menores a los observados en el día 10 de cultivo.

Esto significa que las células de LPH al día 10 estarían diferenciadas a osteoblastos maduros y al día 15 se estarían diferenciando a osteocitos debido a la disminución en los niveles de expresión de OCN.

Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante western blot, donde el aumento de la expresión de FAL y OSX al día 5 y su posterior disminución en el tratamiento con PPP, a diferencia de la expresión de FAL al día 10 y la progresiva disminución de OSX en el tiempo en los controles con SFB, en conjunto con la expresión de OCN al día 10 de cultivo y la disminución en la expresión al día 15, indicarían una aceleración en el proceso de diferenciación ósea en los tratamientos con PPP con respecto a los controles con SFB y, además, la diferenciación terminal de osteoblastos maduros a osteocitos.

6. DISCUSIÓN

Tradicionalmente se han empleado diversas metodologías para lograr la regeneración de los tejidos periodontales, tales como el uso de membranas como barrera, auto-injertos óseos, alo-injertos óseos desmineralizados y liofilizados, xeno-injertos bovinos y combinaciones de estos (Chen y col., 2010). Recientemente se han desarrollado nuevas terapias para la regeneración de tejidos, incluida la regeneración periodontal, las que se denominan comúnmente como ingeniería de tejidos o medicina regenerativa. La ingeniería de tejidos se basa en modificar la capacidad del propio organismo para regenerar los tejidos usando una combinación de matrices, moléculas de señalización y células (Chen y col., 2010), incluyendo el uso de células troncales. Esto último ha permitido generar nuevas alternativas para la regeneración periodontal. Sin embargo, existen dificultades para llevar a cabo su uso en la clínica, entre ellas determinar el número de células a utilizar y las moléculas y/o vías de señalización que permitan aumentar su número y controlar su diferenciación a los linajes periodontales, en particular a los tejidos óseo y cemento (Lin y col., 2009; Estrela y col., 2011; Pejčić y col., 2013). En este seminario de título se analizó el potencial que tiene el PPP para favorecer la diferenciación de las células de LPH.

6.1. Células de LPH cumplen con los criterios mínimos de MSC dadas por la ISCT

En este trabajo se obtuvo cultivos de LPH con morfología fibroblastoide. Un 98% de la población celular expresó los antígenos de superficie CD73, CD105 y CD90, y evidenció ausencia de los marcadores CD34, CD45, CD79, CD11b y CD14. Igualmente estas células, se diferenciaron a los linajes óseo, cartilaginoso y adiposo, cumpliendo con los criterios establecidos por la ISCT para ser consideradas MSC. Sin embargo, estos criterios mínimos para definir la presencia de MSC en una población celular han

sido cuestionados debido a su alta variabilidad de acuerdo a la fuente de las células utilizadas (Keating 2012). Por lo tanto, consideramos importante evaluar a otras dos proteínas como CD146 y STRO-1, cuyo uso como marcadores de MSC ha sido reportado previamente en la literatura (Seo y col., 2004; Seo y col., 2005; Martínez y col., 2011). En los cultivos primarios de LPH obtenidos, hubo un porcentaje mínimo de células que fueron positivas para los marcadores CD146 y STRO-1, lo que se condice con la literatura (Seo y col., 2004; Martínez y col., 2011). Sin embargo, no hay células dobles positivas para los marcadores CD146 y STRO-1, como ha sido reportado previamente (Xu y col., 2009), lo cual podría explicarse debido a que STRO-1 se ha reportado como un marcador endotelial cuya expresión en MSC sería un evento inducido (Ning y col., 2011). Por lo tanto, los medios de cultivos utilizados en esta tesis no estimularían la expresión de STRO-1, siendo uno de los posibles motivos por los cuales no se observan células dobles positivas para STRO-1 y CD146.

En base a lo anterior podemos señalar que, una población de las células aisladas de LPH posee características de MSC y pueden ser utilizadas como tal en terapias regenerativas.

6.2. Composición del PPP y su efecto durante el proceso de diferenciación ósea de las células de LPH

La reparación de heridas requiere de la activación de las plaquetas y por lo tanto la liberación de los factores de crecimiento que se encuentran contenidos en estas (Murphy y col., 2012). Estos factores son muy importantes debido a que juegan un papel crucial en los procesos de regeneración tisular, modulando la proliferación, diferenciación y migración celular, incluido el reclutamiento de células troncales y/o progenitoras al sitio receptor (Hynes y col., 2012). Es por esta razón, que la utilización

de PRP como fuente de factores de crecimiento, se ha utilizado para lograr la regeneración de diversos tejidos (Plachokova y col., 2008; Creeper y col., 2009; Yilmaz y col., 2010; Marukawa y col., 2011; Eskan & Greenwell 2011; Murphy y col. 2012; Anitua & Orive 2012; Anitua y col., 2013b; Kabiri y col., 2014; Li y col., 2014; Hateyama y col., 2014; Chen y col., 2014; Jeong y col., 2014; Küçük y col., 2014; Randelli y col., 2014). Sin embargo, debido a diferencias en su preparación y en su aplicación, se han obtenido resultados contradictorios por lo que a la fecha no se han logrado definir concentraciones óptimas de PRP para promover la regeneración y cicatrización de heridas (Eskan & Greenwell 2011; Kabiri y col., 2014).

En el proceso de obtención de PRP, simultáneamente se obtiene otra fracción de plasma que es pobre en plaquetas (PPP) y que se ha reportado estar reducida en factores de crecimiento. Sin embargo, tiene la habilidad de promover la cicatrización de heridas en modelos *in vitro*, permitiendo la migración de fibroblastos gingivales y su diferenciación a miofibroblastos. Igualmente se ha reportado que influye en la proliferación y migración de MSC de médula ósea (Creeper y col., 2009; Cáceres y col., 2011; Murphy y col., 2012). Recientemente, en un trabajo realizado en el año 2013, se analizó una amplia variedad de factores de crecimiento y citoquinas presentes en el PRP (Amable y col., 2013). Se reportó que el PRP posee factores de crecimiento claves en la reparación tisular tales como PDGF, TGF β , VEGF, HGF, FGF, IGF-1, EGF (Anitua & Orive 2012; Anitua y col., 2013a; Amable y col., 2013).

Sin embargo, nuestro trabajo es el primero que analiza de manera más completa la presencia de 44 factores de crecimiento y 10 citoquinas en el PPP. Realizando un análisis del perfil de factores de crecimiento, se observó una expresión mayoritaria de EGF y EGF-R; IGFBP-1, 2, 3 y 6; M-CSF-R; PDGF-AA, BB, AB y Rb; SCF-R, y VEGF-

R2 y VEGF-R3, en los plasmas utilizados de 4 donantes diferentes. Asimismo, se observó que las citoquinas más representadas en el PPP fueron IL-8, IL-12 e IL-17.

Por lo tanto, podemos señalar que el PPP también posee una gran variedad de factores de crecimiento, lo que permite suponer que la utilización de este plasma podría presentar resultados similares a los reportados con PRP (Yilmaz y col., 2010).

Uno de los inconvenientes para llevar a cabo terapias de regeneración tisular con células troncales, es que involucran su expansión *in vitro* y por ende la utilización, en general, de suero fetal bovino en su cultivo. Este suero se utiliza como suplemento en los medios de cultivos celular, el cual, al ser un producto xenógeno o heterólogo podría no estar libre de patógenos y/o podría generar una respuesta de rechazo inmune en el paciente (Lin y col., 2009; Pejčić y col., 2013; Bieback 2013). Se postula al PRP y al PPP como posibles reemplazantes de este suplemento en los cultivos *in vitro*, debido a que pueden ser tomados del mismo paciente a tratar (estando libre de patógenos externos, xeno-free) y por el contenido de factores de crecimiento que éstos poseen (Bieback 2013).

Por lo tanto, debido a la presencia de factores de crecimiento analizados previamente, es que en este trabajo se utilizó el PPP como suplemento en los cultivos celulares, siendo éste el primer reporte que involucra la utilización de PPP en la diferenciación ósea/cemento de MSC de LPH. Estas células, en presencia de PPP ensayadas en tres concentraciones diferentes (2,5%, 5% y 10%) depositaron concentraciones de calcio cercanas al doble de las cuantificadas con los controles con SFB al 10% en presencia de medio osteogénico. Notablemente, no así en ausencia de este medio, indicando la necesidad de utilizar siempre este medio inductor para la diferenciación ósea de las MSC.

El resultado obtenido con los depósitos de calcio se mantuvo similar entre células de LPH de 3 donantes diferentes y al usar PPP de 2 donantes diferentes, lo que indica una capacidad estable por parte de este plasma, en promover la diferenciación ósea de estas células.

Con el fin de corroborar la promoción de la diferenciación de células de LPH a linaje óseo con diferentes plasmas, se estimularon células de 1 solo donante con PPPs de 4 donantes diferentes. Se obtuvieron resultados muy similares al anterior, es decir, la concentración de calcio depositada por las células expuestas a PPP fue casi el doble de la concentración obtenida con los controles con SFB al 10% y al 2,5%. Estos mismos resultados se obtuvieron al realizar tinciones con el colorante Rojo Alizarina que tiñe de color rojo los depósitos de calcio, donde se observó una tinción de color rojo más intensa en las células tratadas con PPP que en las células tratadas con SFB. Esto corrobora que los factores de crecimiento presentes en el PPP estimulan de mejor manera el proceso de diferenciación ósea de estas células, en comparación al SFB, lo cual sería muy beneficioso en terapias de regeneración ósea, particularmente de los tejidos periodontales.

La promoción de la diferenciación ósea de las MSC de LPH dada por el PPP no es inesperada. Al realizar una revisión en la literatura de los factores de crecimiento mayormente representados en el PPP, en su mayoría pueden desempeñar funciones relacionadas a osteogénesis y angiogénesis. La osteogénesis es un proceso fundamental en la regeneración periodontal debido a la necesidad de recuperar los tejidos mineralizados como el Cemento Radicular y el Hueso Alveolar. Además, la angiogénesis también es un proceso fundamental en la regeneración de este tejido, debido a que la revascularización permite la llegada de células y factores de crecimiento al sitio en proceso de regeneración (Andía y col., 2012).

La remodelación y/o generación de vasos a partir de la red vascular primitiva ocurre a través de la angiogénesis. Este proceso se mantiene activo hasta la adultez en procesos tales como la cicatrización de heridas, ciclo menstrual, embarazo, entre otros, y puede encontrarse alterado en condiciones patológicas como el cáncer (Carmeliet P. 2005). La angiogénesis requiere la actuación coordinada de factores que estimulen el proceso, a través de la señalización sobre el endotelio y sobre el estroma circundante, siendo éste último un componente fundamental dentro de la regulación del proceso. Asimismo, el proceso también requiere de factores promotores de la maduración y anti-angiogénicos para detener el proceso, el cual en condiciones homeostáticas, es un fenómeno acotado en el tiempo. Angiogénesis y osteogénesis están íntimamente ligados. Dentro de los muchos factores implicados en ambos procesos podemos mencionar: El factor de crecimiento epidérmico y su receptor (EGF y EGF-R) pueden estimular la proliferación de MSC de Médula Ósea Humana (Tamama y col., 2006). Dentro de las Proteínas de Unión al Factor de Crecimiento similar a Insulina, IGFBP-1 induce una menor mineralización ósea en ratones transgénicos que sobre-expresan esta proteína (Ben Lagha y col., 2006), IGFBP-2 induce huesos de menor tamaño y una menor mineralización ósea en ratones transgénicos que sobre-expresan esta proteína (Eckstein y col., 2002), en cambio IGFBP3 tendría una función pro-osteogénica al ser el mayor transportador de IGF-1 en el organismo (Govoni 2012). Finalmente, IGFBP-6 previene la apoptosis y senescencia en fibroblastos humanos (Micutkova y col., 2011).

Dentro de los Factores de Crecimiento Derivado de las Plaquetas, las isoformas AA, AB y BB se las ha identificado como angiogénicas (Roubelakis y col., 2013), además las isoformas AB y BB pueden inducir la proliferación de células de LPH (Izumi y col., 2011; Manoranjan y col., 2012). El receptor beta de PDGF tiene una función dual en

MSC de ratón, puede estimular la proliferación y migración de estas células, pero, por otra parte, puede suprimir fuertemente la diferenciación ósea de las MSCs de ratón (Tokunaga y col., 2008).

Los factores de crecimiento vasculares-endoteliales, incluidos sus receptores de tipo 2 y 3, son reconocidos por estimular la angiogénesis (Dai & Rabie 2007). Además, VEGFR2 estaría involucrado en la estimulación de la osteogénesis dada por la señal del ligando VEGFA (Dai & Rabie 2007). El Receptor del factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y su receptor tendrían una función pro-osteoclastogénica, al estimular la proliferación de los progenitores osteoclastogénicos (Hughes y col., 2006). El Receptor del factor de Células Troncales Hematopoiéticas tendría una función pro-angiogénica, al producir la vascularización de membranas epiretinales en retinopatías proliferativas diabéticas y por inducir la neo-vascularización en modelos *in vivo* de ratones (Dentelli y col., 2007; Abu El-Asrar y col., 2010). La Interleucina 8 cumpliría una función pro-inflamatoria y angiogénica, lo que se ha evidenciado en un modelo *in vivo* de rata, en donde se reducen las concentraciones de IL-8 y tanto el proceso de inflamación como el de angiogénesis se ven reducidos (Li y col., 2003; Qazi y col., 2011; Heo y col., 2011).

La Interleucina 12 tendría una función Pro-inflamatoria y Anti-osteoclastogénica, al inhibir la osteoclastogénesis de macrófagos de médula ósea de ratón (Amcheslavsky & Bar-Shavit 2006, Bar-shavit & Krisher 2014). Finalmente, la Interleucina 17 tendría una función pro-inflamatoria y angiogénica en contexto de cáncer gástrico, colorectal, hepatocelular y pancreático (Yang y col., 2014). Estos factores de crecimiento y sus funciones se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Función asociada a Factores de Crecimiento y citoquinas analizadas.

Factor de Crecimiento	Función Asociada	Referencia
EGF y EGF-R	Proliferación de MSCs de Médula Ósea	<i>Tamama y col., 2006</i>
IGFBP-1	Retraso en la mineralización ósea en ratones transgénicos que sobre-expresan IGFBP-1	<i>Ben Lagha y col., 2006</i>
IGFBP-2	Disminución del tamaño de huesos y retraso en la mineralización ósea en ratones transgénicos que sobre-expresan IGFBP-2	<i>Eckstein y col., 2002</i>
IGFBP-3	Pro-osteogénico	<i>Govoni 2012</i>
IGFBP-6	Previene apoptosis y senescencia de fibroblastos	<i>Micutkova y col., 2011</i>
PDGF-AA	Angiogénico	<i>Roubelakis y col., 2013</i>
PDGF-AB	Angiogénico Mitogénesis de Células de LPH	<i>Roubelakis y col., 2013</i> <i>Manoranjan y col., 2012</i>
PDGF-BB	Angiogénico Mitogénesis de Células de LPH	<i>Roubelakis y col., 2013</i> <i>Izumi y col., 2011</i>
PDGF-Rb	Estimula proliferación y migración de MSCs de ratón, pero inhibe su diferenciación a linaje óseo	<i>Tokunaga y col., 2008</i>
VEGFR2	Angiogénico y Pro-osteogénico	<i>Dai & Rabie 2007</i>
VEGFR3	Angiogénico	<i>Dai & Rabie 2007</i>
MCSF-R	Osteoclastogénico	<i>Hughes y col., 2006</i>
SCF-R	Angiogénico	<i>Abu El-Asrar y col., 2010</i>
IL-8	Pro-inflamatorio y Angiogénico	<i>Li y col., 2003</i> <i>Qazi y col., 2011</i> <i>Heo y col., 2011</i>
IL-12	Pro-inflamatorio y Anti-osteoclastogénico	<i>Amcheslavsky & Bar-Shavit 2006</i> <i>Bar-Shavit & Krisner 2014</i>
IL-17	Pro-inflamatorio y angiogénico en contexto de cáncer	<i>Yang y col., 2014</i>

Estos resultados en su conjunto nos indican que el PPP contendría factores de crecimiento variados, promoviendo la angiogénesis y osteogénesis, ambos procesos relacionados con reparación tisular. Según estos antecedentes, ambos procesos podrían ser estimulados por la presencia de PPP debido a los factores de crecimiento que lo componen, además de la estimulación en la proliferación de las células de LPH por PDGF-AB y BB, permitiendo la regeneración de los tejidos periodontales. Esto se evidencia en la promoción de la diferenciación ósea de las células de LPH (aumento en

los depósitos de calcio) dada por el PPP por sobre el SFB y es por esta razón que el uso de células de LPH suplementadas con PPP se puede constituir como una posible terapia en la regeneración de los tejidos periodontales, aproximándose al proceso regenerativo natural.

Debido a la gran diferencia evidenciada en los depósitos de calcio al comparar entre los cultivos con PPP y con SFB se realizaron cultivos de células de LPH a menores tiempos en el proceso de diferenciación ósea. Se evaluó la producción de calcio a los 14 días y se realizó una comparación con el cultivo realizado durante 21 días.

Las células de 1 solo donante, ensayados con PPP de 2 donantes diferentes utilizado a tres concentraciones diferentes (2,5%, 5% y 10%), depositaron una mayor concentración de calcio que la obtenida con los controles con SFB a los 14 días de cultivo. Igualmente, al comparar los tratamientos con PPP a los 14 días de cultivo y a los 21 días de cultivo, se evidenció una aceleración en el proceso de diferenciación, ya que a los 14 días las células depositan un 67% de la cantidad del calcio depositado por las células a los 21 días de cultivo. Asimismo, a los 14 días de cultivo el tratamiento con PPP generó un mayor depósito de calcio en las células de LPH que los controles con SFB a los 21 días de cultivo. Este resultado indica que a los 14 días las células en el tratamiento con PPP ya se habrían diferenciado terminalmente a osteocitos.

Por lo tanto, en conjunto este set de resultados muestran que el tratamiento de PPP no solo promueve el proceso de diferenciación ósea en las células de LPH aumentando los depósitos de calcio comparado con el tratamiento con SFB, sino que también produce una aceleración en el desarrollo de este proceso, lo cual podría significar menores tiempos en la regeneración de los tejidos periodontales utilizando este plasma en terapias celulares.

6.3. Efecto del PPP sobre la expresión de proteínas involucradas en el proceso de diferenciación ósea de las células de LPH

Con el fin de estudiar cómo ocurre esta aceleración en el proceso de diferenciación ósea con mayor detalle se analizaron algunas proteínas involucradas en este proceso, tales como Osterix (OSX), Fosfatasa Alcalina (FAL) y Osteocalcina (OCN) (Miron & Zhang 2012). Mediante western blot, se evidenció que las células obtenidas de LPH presentan niveles basales de FAL y de OSX lo que se condice con lo reportado en la literatura (Seo y col., 2004; Ozer y col., 2013). Las células obtenidas de LPH al ser un cultivo primario, corresponden a un cultivo celular heterogéneo que incluye una amplia variedad de tipos celulares. Por lo tanto, es natural encontrar niveles basales de proteínas como FAL y OSX, debido a la presencia de células como cementoblastos, y osteoblastos (Nanci & Bosshard 2006; Lindhe y col., 2008).

La primera proteína analizada fue la enzima FAL, que es considerada un marcador temprano de diferenciación ósea (Miron & Zhang 2012), cuya expresión disminuye a medida que los osteoblastos se diferencian terminalmente a osteocitos (Huang y col., 2013). Esto se evidenció en los cultivos de LPH tratados con PPP con medio de diferenciación osteogénico. Al Día 10 de cultivo, los niveles de FAL disminuyeron en las células de LPH tratadas con PPP lo que se mantuvo similar para los Días 15 y 20 de cultivo. Por otra parte, la expresión de FAL en los controles con SFB disminuyó en el Día 15 y 20 de cultivo. Esta disminución de la expresión de FAL a lo largo del cultivo indica la diferenciación ósea de las células de LPH, pasando de osteoblastos a osteocitos, lo que se condice con la literatura (Huang y col., 2013) y con los resultados obtenidos en las cuantificaciones de los depósitos de calcio analizados anteriormente. Sin embargo, la disminución en la expresión de FAL en los tratamientos con PPP ocurrió anticipadamente con respecto a los controles con SFB, lo que sugiere una

aceleración en el proceso de diferenciación dado por el PPP, lo que está en concordancia con lo visto en las cuantificaciones de depósitos de calcio.

La segunda proteína analizada fue OSX, que es un factor de transcripción esencial para la diferenciación de osteoblastos (Nakashima y col., 2002; Liu & Lee 2013; Ozer y col., 2013). Si bien, la banda esperada de OSX debería migrar a un peso de 45kDa según el fabricante y algunos reportes en la literatura (Kaback y col., 2008), en nuestros resultados obtuvimos 2 bandas que corresponden a OSX, las cuales migran a un peso aproximado de 56kDa, lo que también se observa en las células SaOS-2 que fueron usadas como control positivo de la técnica. Esto coincide con los resultados obtenidos en un artículo publicado en el año 2014, en el cual utilizan el anticuerpo contra OSX del mismo fabricante usado en nuestro trabajo y donde obtienen 2 bandas que migran a un peso aproximado de 56kDa (Rashid y col., 2014). Este último reporte valida los resultados obtenidos en nuestra investigación. Las células obtenidas de LPH presentaron un aumento en la expresión de OSX al Día 10 de cultivo en el tratamiento con PPP, dicha expresión disminuye para los Días 15 y 20. Por el contrario, en los controles con SFB la expresión es similar entre los durante los Día 5 y 10 de cultivo la que disminuye al día 15 y 20 de cultivo en el control con SFB al 2,5% en presencia de medio osteogénico con respecto a los otros cultivos. Este aumento en la expresión de OSX en los cultivos con PPP se condice con reportes en la literatura, indicando que las células de LPH al aumentar la expresión de OSX se están diferenciando a linaje óseo (Huang y col., 2013). Asimismo, la disminución en la expresión de OSX que ocurre en los cultivos con PPP es necesaria para la diferenciación terminal a osteocitos como se ha reportado en la literatura (Yoshida y col., 2012). Por lo tanto, las células de LPH con los medios de diferenciación osteogénica se estarían diferenciando terminalmente a osteocitos. Este proceso de diferenciación, evidenciado con la

expresión de OSX, ocurre anticipadamente en las células tratadas con PPP con respecto al SFB, lo cual confirma una aceleración en el proceso de diferenciación.

La última proteína analizada fue OCN, que corresponde a una proteína no-colágena de matriz extracelular relacionada con la unión entre el calcio y la hidroxiapatita. Se la considera como el marcador específico de osteoblasto maduro más abundante (Miron & Zhang 2012). Las células de LPH presentaron una expresión similar de OCN en los cultivos tratados con PPP y los controles con SFB al Día 10 y 15 de cultivo, siendo mayor la expresión de esta proteína al Día 10 de cultivo. La expresión de OCN en los cultivos de LPH indica la presencia de osteoblastos maduros en el proceso de diferenciación de estos cultivos primarios y la disminución en la expresión de OCN indicarían la diferenciación terminal a osteocitos como se ha reportado en la literatura (Huang y col., 2013)

Estos resultados, en su conjunto, ilustran de manera efectiva el proceso de diferenciación ósea, en este caso, ocurrido en MSC's obtenidas de LPH. Lo que se evidencia, al observar en los cultivos tratados con PPP que al Día 10 de cultivo la disminución en la expresión de FAL coincide con el aumento en la expresión de OSX y con la expresión de OCN. Al mismo tiempo, la disminución en la expresión de OSX al Día 15 y la mantención de la expresión de OCN indican la diferenciación a osteoblastos maduros y posiblemente a osteocitos.

6.4. El PPP acelera el proceso de diferenciación ósea

Finalmente, el proceso de diferenciación ósea se vio acelerado en los tratamientos con PPP con respecto a los controles con SFB. Este evento podría estar dado por los diversos factores de crecimiento que favorecen los procesos de diferenciación ósea y angiogénesis presentes en el PPP, postulando a este plasma como una fuente

autóloga de factores de crecimiento con potencial para su uso en terapias de regeneración periodontal.

Nuestros datos se condicen con los resultados de un trabajo realizado en el año 2014, en un modelo *in vivo* correspondiente a perros de raza beagle, donde el PPP indujo un aumento en la regeneración ósea en alveolos de extracción de dientes a las 4 semanas post-tratamiento, a diferencia del PRP que indujo una regeneración a las 8 semanas post-tratamiento que inclusive fue menor que la observada con el PPP (Hateyama y col., 2014).

6.5. Perspectivas

En este trabajo se evaluó el potencial que tiene el PPP para estimular la diferenciación ósea de células de LPH. Sin embargo, aún no se conocen todos los factores de crecimiento presentes en este plasma ni cómo estos factores actúan para modular dicha diferenciación. Además, con la finalidad de utilizar este plasma en terapias de regeneración de los tejidos periodontales, se hace necesario realizar experimentos en modelos *in vivo* que corroboren nuestros resultados y así validen el potencial que tiene el PPP para ser usado como terapia regenerativa.

Por otra parte, es necesario evaluar el comportamiento de otras proteínas partícipes del proceso de diferenciación ósea tales como RUNX2, Colágeno de Tipo I, Osteopontina, entre otras, durante el tratamiento con PPP, lo que permitiría determinar efectivamente cómo es que este plasma estimula la diferenciación ósea de las células de LPH utilizadas, cuáles son las proteínas que modulan este estímulo y corroborar efectivamente si este proceso está siendo acelerado con el estímulo de PPP.

Finalmente, asociado a la diferenciación ósea, inducir la revascularización de los tejidos periodontales es indispensable para el proceso de regeneración de éstos

tejidos. Por lo tanto, se hace necesario analizar si el tratamiento con PPP induce la angiogénesis, para lo cual se requieren tanto experimentos *in vitro* como *in vivo*.

7. CONCLUSIONES

- Se lograron obtener cultivos celulares de ligamento periodontal humano a partir de terceros molares. Estas células cumplieron con los criterios mínimos de MSC establecidos por la ISCT. Además, de ser positivas para los marcadores como STRO-1 y CD146.
- El análisis de la constitución del PPP permitió dilucidar la presencia de factores de crecimiento asociados a funciones tales como la proliferación de células de LPH, osteogénesis y angiogénesis, procesos indispensables para la regeneración de los tejidos periodontales.
- El tratamiento con PPP sobre las células obtenidas de LPH, permitió la diferenciación de estas células al linaje óseo. Además, el PPP generó mayores depósitos de calcio que su control con SFB, evidenciando la capacidad de este plasma para promover dicha diferenciación.
- El proceso de diferenciación ósea de las células de LPH fue acelerado con el tratamiento con PPP, los depósitos de calcio a los 14 días de cultivo fueron mayores en el PPP que en sus controles tanto a los 14 días como a los 21 días de cultivo. Además, proteínas tales como FAL y OSX se expresaron anticipadamente con respecto a los controles tratados con SFB.

- Se logró establecer al PPP como una fuente autóloga de factores de crecimiento, con la capacidad de inducir y al mismo tiempo acelerar la diferenciación ósea/cemento de células de LPH en cultivos *in vitro*, lo que evidencia su potencial uso en terapias de regeneración periodontal.



8. BIBLIOGRAFÍA

- Abu El-Asrar AM., Struyf S., Opendakker G., Van Damme J., Geboes K. 2010. Expression of stem cell factor/c-kit signaling pathway components in diabetic fibrovascular epiretinal membranes. *Molecular Vision*. **16**: 1098 - 1107.
- Amable P., Vieira Carias R., Telles Teixeira M., Cruz Pacheco I., Farias Correa Do Amaral R., Granjeiro J., Borjevic R. 2013. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research & Therapy*. **4**: 67- 79.
- Amcheslavsky A. & Bar-Shavit Z. 2006. Interleukin (IL)-12 mediates the anti-osteoclastogenic activity of CpG-oligodeoxynucleotides. *J Cell Physiol* **207**: 244-250.
- Andia I. & Rubio-Azpeitia E. 2014. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. **4** (1): 52-62.
- Andia I., Sánchez M., Maffulli N. 2012. Basic Science: Molecular and Biological Aspects of Platelet-Rich Plasma Therapies. *Oper. Tech. Orthop*. **22**: 3 - 9.
- Anitua E & Orive G. 2012. Endogenous regenerative technology using plasma- and platelet-derived growth factors. *Journal of Controlled Release*. **157**: 317 - 320.
- Anitua E., Zaldueño M., Alkhraisat M., Orive G. 2013a. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann. Anatomy*. **195** (5): 461 - 466.
- Anitua E., Muruzabal F., Alcalde I., Merayo-Llodes J., Orive G. 2013b. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. *Experimental Eye Research*. **115**: 153 - 161.
- Bar-Shavit Z. & Krisher T. 2014. Regulation of Osteoclastogenesis by Integrated Signals from Toll-Like Receptors. *Journal of Cellular Biochemistry*. **115** (12): 2146 – 2154.
- Bartold M., Shi S., Gronthos S. 2006. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. **40**: 164 - 172.
- Ben Lagha N., Seutin D., Le Bouc Y., Binoux M., Berdal A., Menuelle P., Babajkp S. 2006. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP-1) Involvement in Intrauterine Growth Retardation: Study on IGFBP-1 Overexpressing Transgenic Mice. *Endocrinology*. **147** (10): 4730 – 4737.
- Bieback K. 2013. Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures. *Transfus. Med. Hemother*. **40**: 326-335.
- Cáceres M., Martínez C., Martínez J., Smith P. 2011. Effects of Platelet Rich and Poor Plasma on the reparative response of gingival fibroblasts. *Clinical oral implants research*. **23** (9): 1104–1111.

- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. **438**: 932 – 936.
- Chen FM., Zhang J., Zhang M., An Y., Chen F., Wu ZF. 2010. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*. **31**: 7892 – 7927.
- Chen W., Lo W., Hsu W., Wei H., Liu H., Lee C., Tina Chen S., Shieh Y., Williams D., Deng W. 2014. Synergistic anabolic actions of hyaluronic acid and platelet-rich plasma on cartilage regeneration in osteoarthritis therapy. *Biomaterials*. **35** (36): 599 - 607.
- Creeper F., Lichanska AM., Marshall RI., Seymour GJ., Ivanovski S. 2009. The effect of platelet-rich plasma on osteoblast and periodontal ligament cell migration, proliferation and differentiation. *J. Periodont. Res*. **44**: 258 – 265.
- Crisan M., Yap S., Castella L., Chen C., Corselli M., Park T., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P., Traas J., Schugar R., Deasy B., Badylak S., Büring H., Jacobino J., Lazzari L., Huard J., Péault B. 2008. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. **3**: 301 – 313.
- Cumming G., Fidler F., Vaux D. 2007. Error bars in experimental biology. *Journal of cell biology*. **177** (1): 7 - 11.
- Dai J. & Rabie A.B.M. 2007. VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification. *J Dent Res*. **86** (10): 937 - 950.
- Dentelli P., Rosso A., Balsamo A., Colmenares Benedetto., Zeoli A., Pegoraro M., Camussi G., Pegoraro L., Brizzi MF. 2007. *C-KIT*, by interacting with the membrane-bound ligand, recruits endothelial progenitor cells to inflamed endothelium. *Blood*. **109**: 4264 - 4271.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8** (4): 315-317.
- Eckstein F., Pavicic T., Nedbal S., Schmidt C., Wehr U., Rambeck W., Wolf E., Hoefflich A. 2002. Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice. *Anat Embryol*. **206**: 139 – 148.
- Eskan MA. & Greenwell H. 2011. Theoretical and Clinical Considerations for Autologous Blood Preparations: Platelet-Rich Plasma, Fibrin Sealants, and Plasma-Rich Growth Factors. *Clinical advances in periodontics*. **1** (2): 142 - 153.

- Estrela C., Alencar A., Kitten G., Vencio E., Gava E. 2011. Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz. Dent. J.* **22** (2): 91 - 98.
- Freshney R. 1987. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Alan R.Liss, Inc., New York. Página: 220.
- Gaßling V., Açil Y., Springer I., Hubert N., Wiltfang J. 2009. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **108**: 48 - 55.
- Govoni K. 2012. Insulin-Like Growth Factor-I Molecular Pathways in Osteoblasts: Potential Targets for Pharmacological Manipulation. *Current Molecular Pharmacology.* **5**: 143 - 152.
- Graziani F., Ivanovski S., Ducci F., Tonetti M., Gabriele M. 2006. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin. Oral Impl. Res.* **17**: 212 - 219.
- Griffin X.L., Smith C.M., Costa M.L. 2009. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: A systematic review. *Injury, Int. J. Care Injured.* **40**: 158 - 162.
- Hateyama I., Marukawa E., Takahashi Y., Omura K. 2014. Effects of Platelet-Poor Plasma, Platelet-Rich Plasma, and Platelet-Rich Fibrin on Healing of Extraction Sockets with Buccal Dehiscence in Dogs. *Tissue Engineering: Part A.* **20** (3-4): 874 - 882.
- Heo SC., Jeon ES., Lee H., Kim HS., Kim MB., Kim JH. 2011. Tumor Necrosis Factor- α -Activated Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing through Paracrine Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology.* **131**: 1559 - 1567.
- Huang W., Yang S., Shao J., Li YP. 2013. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci.* **12**: 3068 - 3092.
- Hughes F., Turner W., Belibasakis G., Martuscelli G. 2006. Effects of Growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000.* **41**. 48 - 72.
- Hynes K., Mecanin D., Gronthos S., Bartold M. 2012. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontology 2000.* **59**: 203 - 227.
- Izumi Y., Aoki A., Yamada Y., Kobayashi H., Iwata T., Akizuki T., Suda T., Nakamura S., Wara-Aswapati N., Ueda M., Ishikawa I. 2011. Current and future periodontal tissue engineering. *Periodontology 2000.* **56**: 166-187.
- Jeong D., Lee C., Lee H., Pak J., Kang W., Jeong C., Lee S. 2014. Clinical Applications of Platelet-Rich Plasma in Patellar Tendinopathy. *BioMed. Research International.* 15 páginas. DOI: 10.1155/2014/249498.

- Kaback L., Soung D., Naik A., Smith N., Schwarz E., O'keefe R., Drissi H. 2008. Osterix/Sp7 Regulates Mesenchymal Stem Cell Mediated Endochondral Ossification. *J. Cell. Physiol.* **214**: 173 – 182.
- Kabiri A., Esfandiari E., Esmaeili A., Hashemibeni B., Pourazar., Mardani M. 2014. Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. *Adv Biomed Res.* **3**: 138 - 142.
- Kanczler J. & Oreffo R. 2008. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European Cells and Materials.* **15**: 100 – 114.
- Keating A. 2012. Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. *Cell Stem Cell.* **10**: 709 – 716.
- Kim D., Je Y., Kim C., Lee Y.H., Seo Y., Lee J.H., Lee Y. 2011. Can Platelet-Rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast. *Ann. Dermatol.* **23** (4): 424 - 431.
- Küçük L., Günay H., Erbaş O., Küçük U., Atamaz F., Coşkunol E. 2014. Effects of platelet-rich plasma on nerve regeneration in a rat model. *Acta Orthop Traumatol Turc.* **48** (4):449-54.
- Li A., Dubey S., Varney M., Dave B., Singh R. 2003. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *The Journal of Immunology.* **170**: 3369 – 3376.
- Li X., Hou J., Wu B., Chen T., Luo A. 2014. Effects of Platelet-rich Plasma and Cell Coculture on Angiogenesis in Human Dental Pulp Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells. *American Association of Endodontists.* **40** (11): 1810 – 1814.
- Lin N., Gronthos S., Bartold M. 2009. Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontology 2000.* **51**: 239 - 251.
- Lindhe J., Karring T., Araújo M., Berglund T., Kinane D. 2008. Chapter 1: The Anatomy of Periodontal Tissues. And Chapter 11: Pathogenesis of Periodontitis. .En Lindhe J., Lang N., Karring T. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Páginas: 3-34. & Páginas: 289-293. Blackwell Munksgaard, Oxford.
- Liu T. & Lee E. 2013. Transcriptional Regulatory Cascades in Runx2-Dependent Bone Development. *Tissue Engineering: Part B.* **19** (3): 254-263.
- Lopez-Vidriero E., Goulding K., Simon D., Sanchez M., Johnson D. 2010. The Use of Platelet-Rich Plasma in Arthroscopy and Sports Medicine: Optimizing the Healing Environment. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery.* **26** (2): 269-278.
- Lovelace T., Henry M., Hargreaves K., Diogenes A. 2011. Evaluation of the Delivery of Mesenchymal Stem Cells into the Root Canal Space of Necrotic Immature Teeth after Clinical Regenerative Endodontic Procedure. *JOE.* **37** (2): 133 – 138.

- Manoranjan S.J., Faizuddin M., Hemalatha M., Ranganath V. 2012. The effect of platelet derived growth factor-AB on periodontal ligament fibroblasts: An *in vitro* study. *J Indian Soc. Periodontol.* **16** (1): 49–53.
- Marks S. & Odgren P. 2002. Structure and Development of the Skeleton. En Bilezikian J., Raisz L., Rodan G. *Principles of Bone Biology, Part I.* Página: 3. Academic Press. A division of Harcourt. Inc. London.
- Martínez C., Smith PC., Rodríguez JP., Palma V. 2011. Sonic hedgehog stimulates proliferation of human periodontal ligament stem cells. *J. Dent. Res.* **90** (4): 483 – 488.
- Marukawa E., Oshina H., Iino G., Morita K., Omura K. 2011. Reduction of bone resorption by the application of platelet-rich plasma (PRP) in bone grafting of the alveolar cleft. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* **39**: 278 – 283.
- Marx R., Carlson E., Eichstaedt R., Schimmele S., Strauss J., Georgeff K. 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Radiol. Endod.* **85**: 638 - 646).
- Micutkova L., Diener T., Li C., Rogowska-Wrzesinska A., Mueck C., Huetter E., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B., Roepstorff P., Zeng R., Jansen-Duerr P. 2011. Insulin-like growth factor binding protein-6 delays replicative senescence of human fibroblasts. *Mech Ageing Dev.* **132** (10): 468–479.
- Ministerio de Salud (MINSAL), Gobierno de Chile. 2010. Análisis de Situación Bucal en Chile. www.minsal.gob.cl/portal/url/item/9c81093d17385cafe04001011e017763.pdf [Visitado en Agosto de 2014].
- Miron R., Zhang Y. 2012. Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. *J. Dent. Res.* **91** (8): 736-744.
- Mrozik K., Gronthos S., Shi S., Bartold M. 2010. A Method to Isolate, Purify, and Characterize Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Methods Mol Biol.* **666**: 269 - 284.
- Murphy M., Blashki D., Buchanan R., Yazdi I., Ferrari M., Simmons P., Tasciotti E. 2012. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials.* **33**: 5308-5316.
- Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng JM, Behringer R., Crombrughe B. 2002. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell.* **108**: 17–29.
- Nanci A. & Bosshardt D. 2006. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000.* **40**: 11–28.

- Ning H., Lin G., Lue T., Lin C. 2011. Mesenchymal Stem Cell Marker STRO-1 is a 75kd Endothelial Antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* **413** (2): 353 – 357.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Oral health. Fact sheet N°318. April 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/> [Visitado en Septiembre de 2014].
- Ozer A., Yuan G., Yang G., Wang F., Li W., Yang Y., Guo F., Gao Q., Shoff L., Chen Z., Gay I., Donly K., MacDougall M., Chen S. 2013. Domain of Dentine Sialoprotein Mediates Proliferation and Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Plos One.* **8** (12): e81655. 16páginas. doi:10.1371/journal.pone.0081655.
- Pejčić A., Kojović., Mirković., Minic I. 2013. Stem Cells for Periodontal Regeneration. *Balkan Journal of Medical Genetics.* **16** (1): 7-12.
- Pihlstrom B., Michalowicz B., Johnson N. 2005. Periodontal Diseases. *Lancet.* **366**: 1809 – 1820.
- Plachokova A., Nikolidakis D., Mulder J., Jansen J., Creugers N. 2008. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin. Oral Impl. Res.* **19**: 539 – 545.
- Qazi B., Tang K., Qazi A. 2011. Recent Advances in Underlying Pathologies Provide Insight into Interleukin-8 Expression-Mediated Inflammation and Angiogenesis. *International Journal of Inflammation.* **2011**: 1 – 13.
- Randelli P., Randelli F., Ragone V., Menon A., D'Ambrosi R., Cucchi D., Cabitza P., Banfi G. 2014. Regenerative Medicine in Rotator Cuff Injuries. *BioMed. Research International.* **2014**: 9 páginas. DOI: 10.1155/2014/129515.
- Rashid H., Ma C., Chen H., Wang H., Hassa M., Sinha K., Crombrughe B., Javed A. 2014. Sp7 and Runx2 molecular complex synergistically regulate expression of target genes. *Connect Tissue Res.* **55** (S1): 83 – 87.
- Roubelakis MG., Tsaknakis G., Pappa KI., Anagnou NP., Watt SM. 2013. Spindle Shaped Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells from Amniotic Fluid Promote Neovascularization. *Plos One* **8** (1): e54747. 15 páginas. doi:10.1371/journal.pone.0054747.
- Seo B., Miura M., Gronthos S., Bartold PM., 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet.* **364**: 149–55.
- Seo B., Miura M., Sonoyama W., Coppe C., Stanyon R., Shi S. 2005. Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. *Journal of Dental Research.* **84** (10): 907-912.
- Tamama K., Fan V., Griffith L., Blair H., Wells A. 2006. Epidermal Growth Factor as a Candidate for Ex Vivo Expansion of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *StemCells.* **24**: 686 – 695.

- Tokunaga A., Oya T., Motomura H., Nakamura C., Ishizawa S., Fujimori T., Nabeshima Y., Umezawa A., Kanamori M., Kimura T., Sasahara M. 2008. PDGF Receptor β Is a Potent Regulator of Mesenchymal Stromal Cell Function. *Journal of Bone and Mineral Research*. **23** (9): 1519–1528.
- Troyer D. & Weiss M. 2008. Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. *StemCells*. **26** (3): 591 – 599.
- Volponi A., Pang I., Sharpe P. 2010. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in Cell Biology*. **20** (12): 715- 722.
- Whyte M. 2002. Hypophosphatasia: Nature's Window on Alkaline Phosphatase Function in Man. En Bilezikian J., Raisz L., Rodan G. *Principles of Bone Biology, Part II*. Página: 1230. Academic Press. A division of Harcourt. Inc. London.
- Xu J., Wang W., Kapila Y., Lotz J., Kapila S. 2009. Multiple Differentiation Capacity of STRO-1+/CD146+ PDL Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells Dev*. **18**: 487-496.
- Xu Q., Li B., Yuan L., Dong Z., Zhang H., Wang H., Sun J., Ge S., Jin Y. 2014. Combination of platelet-rich plasma within periodontal ligament stem cell sheets enhances cell differentiation and matrix production. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 10 páginas. doi: 10.1002/term.1953.
- Yang B., Kang H., Fung A., Zhao H., Wang T., Ma D. 2014. The Role of Interleukin 17 in Tumour Proliferation, Angiogenesis, and Metastasis. *Mediators of Inflammation*. **2014**: Article ID 623759. 12 páginas. dx.doi.org/10.1155/2014/623759.
- Yilmaz S., Kabaday C., Dirikan S., Cakar G., Kuru B. 2010. Treatment of Intrabony Periodontal Defects With Platelet Rich Plasma Versus Platelet Poor Plasma Combined With a Bovine Derived Xenograft: A Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology*. **82** (6): 837-844.
- Yoshida C., Komori H., Maruyama Z., Miyasaki T., Kawasaki K., Furuichi T., Fukuyama R., Mori M., Yamana K., Nakamura K., Liu W., Toyosawa S., Moriishi T., Kawaguchi H. , Takada K., Komori T. 2012. SP7 Inhibits Osteoblast Differentiation at a Late Stage in Mice. *Plos One* **7** (3): e32364. 11 páginas. doi:10.1371/journal.pone.0032364.