



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**EFFECTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL, SOBRE  
LA REGENERACIÓN DEL PERIODONTO EN ADULTOS EN PROCESO DE  
ENVEJECIMIENTO CON ENFERMEDAD PERIODONTAL**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**BEATRIZ HERNÁNDEZ MONJARAZ**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
FES ZARAGOZA, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

**DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**  
FES ZARAGOZA, UNAM  
**DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**  
FES ZARAGOZA, UNAM

**CD. MX., MARZO, 2020.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**EFFECTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL, SOBRE  
LA REGENERACIÓN DEL PERIODONTO EN ADULTOS EN PROCESO DE  
ENVEJECIMIENTO CON ENFERMEDAD PERIODONTAL**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**BEATRIZ HERNÁNDEZ MONJARAZ**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
FES ZARAGOZA, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

**DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**  
FES ZARAGOZA, UNAM  
**DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**  
FES ZARAGOZA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MARZO, 2020.**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/273/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** aprobó el siguiente jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** en el campo de conocimiento de **(Biología Experimental)** de la estudiante **HERNÁNDEZ MONJARAZ BEATRIZ** con número de cuenta **98000667** con la tesis titulada **“Efecto de células troncales mesenquimales de pulpa dental, sobre la regeneración del periodonto en adultos en proceso de envejecimiento con enfermedad periodontal”**, realizada bajo la dirección del **DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE  
Vocal: DR. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ  
Secretario: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ  
Suplente: DR. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 02 de marzo de 2020

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



c. c. p. Expediente del alumno

# Agradecimientos

La presente investigación se llevó a cabo gracias al apoyo del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) quien otorgó una beca para cursar el doctorado, en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. **Número de becario/CVU: 412849/262614.**

El apoyo para materiales, reactivos y equipo fue otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto **IN221815** *“Efecto de las células troncales mesenquimales de pulpa dental sobre la enfermedad periodontal en adultos mayores y su relación con marcadores de estrés oxidativo e inflamación.”*

El trabajo se desarrolló en la Unidad de Investigación en Gerontología, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez y la asesoría tutorial del Dr. Edelmiro Santiago Osorio y el Dr. Alberto Monroy García.

# Agradecimientos a título personal

El material biológico fue proporcionado por la bióloga Norma Angélica Sosa Hernández de DentCell. Los ensayos de citometría de flujo se realizaron en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN y los ensayos de diferenciación fueron llevados a cabo por la Dra. Itzen Aguíñiga Sánchez.

Agradecemos el apoyo de la Dra. Mirna Ruiz Ramos y la Mtra. Guadalupe Gómez García, por su asesoría en la medición de marcadores biológicos; y a los maestros Enrique Pérez Guarneros y Andrés Alcauter Zavala por su asesoría en el área clínica.

Asimismo, agradezco al Dr. Edgar Ledesma Martínez, por todo su apoyo técnico, académico y emocional. Así como a los integrantes del Comité Tutor: Doctores Víctor Manuel Mendoza Núñez, Edelmiro Santiago Osorio y Alberto Monroy García, por ser una excelente guía, por su dedicación y ejemplo.

De igual forma, a la Dra. María Isabel Soto Cruz, al Dr. José Miguel Betancourt Rule y al Dr. Jorge Hernández Montes, por sus meticulosos y acertados comentarios; sin duda, me queda una grata imagen de ello que espero replicar con mis alumnos.

Igualmente, le agradezco al Mtro. José Miguel Sánchez Nieto y a la Dra. Mirna Ruiz Ramos por el apoyo brindado antes, durante y al término de este trabajo. A mis amigos: Dulce L., Esteban L., Evelyn L., Jaqueline J., José P., Lucy P., Maira M., Mary L., Mauricio T., Nallely V., Pablo P. y Wendy D. por su apoyo y comprensión durante las largas ausencias.

Finalmente, a mis pacientes y alumnos, cuyas palabras le impregnaron paz, brillo y esperanza a mis días de incertidumbre y agotamiento.

# Dedicatoria

*Para mamá, papá, Ara y Miguel a quienes quiero profundamente.  
Gracias por su amor incondicional.*

*Para mis futuros alumnos.  
Cada paso lo doy pensando en ser una buena guía académica y  
un ejemplo como ser humano.*





# Índice

Abreviaturas y acrónimos.....	1
Resumen (Abstract).....	2
I. Introducción .....	4
II. Objetivos .....	7
III. Antecedentes .....	8
III.1 Enfermedad periodontal.....	8
III.1.1 Fisiopatología de enfermedad periodontal.....	8
III.1.1 Enfermedad periodontal y envejecimiento.....	12
III.1.2 Tratamiento para enfermedad periodontal.....	13
III.2 Células troncales mesenquimales.....	15
III.3 Aplicación de las células troncales en enfermedad periodontal...	20
III.4 Aplicación de las células troncales mesenquimales de pulpa dental en enfermedad periodontal.....	22
IV. Metodología .....	31
IV.1 Población y diseño.....	31
IV.2 Criterios de inclusión y exclusión.....	33
IV.3 Variables.....	33
IV.4 Técnicas.....	34
IV.4.1 Obtención de DPMSC.....	34
IV.4.2 Análisis de DPMSC .....	34
IV.4.3 Fase clínica.. .....	35
IV.4.4 Evaluación de los parámetros clínicos.....	39
IV.4.5 Evaluación de marcadores de EOX y actividad de enzimas antioxidantes.....	41
IV.4.6 Evaluación de marcadores de inflamación crónica.....	45
IV.5 Análisis estadístico.....	46
V. Resultados.....	47

VI.	Discusión.....	55
VII.	Conclusiones .....	62
VIII.	Perspectivas.....	63
IX.	Literatura citada.....	64
X.	Anexos.....	75
	X.1 Consentimiento informado de donación .....	75
	X.2 Consentimiento informado de aceptación de tratamiento.....	79
	X.3 Artículos nacionales e internacionales.....	81
	X.4 Reconocimientos.....	113
	X.5 Formación de recursos humanos.....	115
	X.6 Presentación en congresos nacionales.....	116
	X.7 Presentación en congresos internacionales.....	126

## Índice de cuadros

Cuadro III.3.1. Estudios sobre la aplicación de células troncales en la reparación de tejidos dentales. ....	24
Cuadro IV.4.4.2 Criterios para determinar la movilidad dental.....	40
Cuadro V.1 Características clínicas individuales de la población.....	50
Cuadro V.2. Efecto de las DPMSC sobre los parámetros clínicos por grupo de tratamiento. ....	51
Cuadro V.3 Marcadores de estrés oxidante en saliva previos a la colocación de DPMSC y 6 meses posterior a ello.....	53
Cuadro V.4 Marcadores de estrés oxidante en saliva previos a la colocación de DPMSC y 6 meses posterior a ello.....	54
Cuadro V.5. Concentraciones de citocinas proinflamatorias en muestras de saliva previos a la colocación de DPMSC y 6 meses posterior a ello.....	55

## Índice de figuras

Figura III.1.1.1 La patogenia de la enfermedad periodontal. ....	7
Figura III.2.1.1 Características de las células troncales mesenquimales.....	13
Figura III.2.1.2 Fuente de células troncales en el organismo humano.....	15
Figura III.3.1 Propiedades de las DPMSC que pueden influir en la regeneración periodontal. ....	23
Figura IV.1.1 Esquema general del estudio.....	33
Figura IV.4.2.1 Diferenciación <i>in vitro</i> de linaje múltiple de células troncales mesenquimales de pulpa dental.....	36
Figura V. 1 Tomografía volumétrica tipo <i>cone bean</i> y medición del área radiográfica .....	52

## **Abreviaturas y acrónimos**

ALP	Fosfatasa alcalina
AOx	Antioxidantes
BMP2	Proteína morfogenética ósea 2
clg-PVP	Colágena polivinilpirrolidona
COL 1	Colágena tipo I
DMO	Densidad mineral ósea
DPMSC	Células troncales mesenquimales de pulpa dental
EOx	Estrés oxidante
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EP	Enfermedad periodontal
IC	Inflamación crónica
IL	Interleucina
ISRCTN	International Standars Randomised Controlles Trial Number
IRE	Inflamación relativa al envejecimiento (inflamaaging)
LAC	Límite amelo-cementario
LPO	Lipoperóxidos
LPS	Lipopolisacáridos
MEC	Matriz extracelular
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MSC	Células troncales mesenquimales
PS	Profundidad al sondeo
SOD	Superóxido Dismutasa
TLR	Receptores de tipo toll (Toll like receptor)
TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor)
TVCB	Tomografía Volumétrica Cone-Beam
UH	Unidades Hounsfield

## Resumen

**Antecedentes:** La enfermedad periodontal (EP) es una afectación crónica de los tejidos de soporte de los dientes, generalmente vinculada con el proceso de envejecimiento. Se acompaña de estrés oxidante (EOx) e incremento de marcadores pro-inflamatorios. Una opción terapéutica para regenerar los tejidos perdidos debido a la EP es la colocación de células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental (DPMSC), con posibles efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

**Objetivo:** Determinar el efecto de las DPMSC sobre la regeneración ósea, marcadores de EOx y proceso inflamatorio crónico en personas mayores de 50 años que cursan con EP.

**Método:** Se llevó a cabo un ensayo clínico en una muestra a conveniencia de 60 personas en proceso de envejecimiento de 45 a 64 años, los cuales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos: i) Grupo experimental (GE)=25 a los cuales se les colocó un injerto de DPMSC+colágena y ii) Grupo control (GC)=25 a quienes únicamente se les colocó colágena. A todos los pacientes se les realizó una valoración clínica (profundidad de sondeo (PS) y densidad mineral ósea (DMO)), determinación de marcadores de EOx e interleucinas en saliva antes y después de seis meses del tratamiento. Terminaron el tratamiento y fueron analizados 11 personas del GE y 10 del grupo control.

**Resultados:** Pacientes con DPMSC mostraron una disminución significativa en PS del GE (basal  $5.66 \pm 0.41$  vs. postratamiento  $2.34 \pm 0.29$  mm,  $p < 0.01$ ) y un incremento en la DMO del hueso alveolar con una significancia estadística limítrofe (basal  $638.82 \pm 181.7$  vs. postratamiento  $781.26 \pm 162.2$  UH,  $p = 0.09$ ). En cuanto a los marcadores de EOx e inflamación, los niveles de SOD salival fueron significativamente más altos en GE (basal  $1.49 \pm 0.96$  vs. postratamiento  $2.14 \pm 1.12$  U/L,  $p < 0.05$ ) mientras que la IL1 $\beta$  tuvo un decremento (basal  $1001.91 \pm 675.5$  vs. postratamiento  $722.3 \pm 349.4$  pg/mL,  $p < 0.05$ ).

**Conclusiones:** Nuestros hallazgos sugieren que el tratamiento con DPMSC tiene un efecto sobre la regeneración ósea vinculado al incremento de SOD y disminución de IL1 $\beta$  en la EP en personas en proceso de envejecimiento.

## Abstract

**Background:** Periodontal disease (PD) is a chronic damage of the supporting tissues of the teeth, linked to the aging process. It is accompanied by oxidative stress (OxS) and increased pro-inflammatory markers. A therapeutic option to regenerate lost tissues due to PD is the placement of mesenchymal stem cells derived from dental pulp (DPMSC), with possible antioxidant and anti-inflammatory effects.

**Objective:** To determine the effect of DPMSC on bone regeneration, OxS markers and chronic inflammatory process in people over 50 years.

**Method:** A clinical trial was carried out in a sample at the convenience of 60 people in the process of aging from 45 to 64 years, who were randomly assigned into two groups: i) Experimental group (EG) = 30 to which they were placed a DPMSC + graft was placed onto a collagen support and ii) Control group (CG) = 30 to whom only collagen was placed. All patients underwent a clinical assessment (probing depth (PD) and bone mineral density (BMD), determination of markers of OEx and interleukins in saliva before and after six months of treatment. They finished the treatment and analyzed 11 people from the GE and 10 from the control group.

**Results:** Treatment with DPMSC showed a significant decrease in PD of the EG (baseline  $5.66 \pm 0.41$  vs. post-treatment  $2.34 \pm 0.29$  mm,  $p < 0.01$ ) and an increase in BMD of the alveolar bone with a borderline statistical significance (baseline  $638.82 \pm 181.7$  vs. post-treatment  $781.26 \pm 162.2$  UH,  $p = 0.09$ ). Regarding the OxS and inflammation markers, salivary SOD levels were significantly higher in EG (baseline  $1.49 \pm 0.96$  vs. post-treatment  $2.14 \pm 1.12$  U / L,  $p < 0.05$ ) while IL1 $\beta$  had a decrease (baseline  $1001.91 \pm 675.5$  vs. post-treatment  $722.3 \pm 349.4$  pg/mL,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Our findings suggest that treatment with DPMSC has an effect on bone regeneration linked to the increase in SOD and decrease in IL1 $\beta$  in PD in people in the aging process.

## **I. Introducción**

La EP es un padecimiento inflamatorio crónico que causa que las estructuras de soporte del diente se pierdan y con ello provocan la pérdida de dientes. Dicho evento puede tener un profundo impacto en dos áreas principalmente: en la salud sistémica y en la calidad de vida del individuo. <sup>1, 2</sup>

En cuanto a la salud sistémica, durante la EP, la estimulación por inflamación crónica sostenida por bacterias anaeróbicas Gram-negativas de la biopelícula, tiene correlación con varias enfermedades sistémicas, como nacimientos prematuros y productos de bajo peso al nacer, aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, dificultades para el control de diabetes, enlentecimiento de la reparación de heridas, neumonía y osteoporosis. Investigaciones recientes encuentran relación entre la enfermedad periodontal y enfermedades renales, obesidad, síndrome metabólico, cáncer de páncreas, Alzheimer y baja calidad de vida. <sup>2, 3</sup>

Actualmente existe una prevalencia alta de enfermedad periodontal en la vejez, cuya relevancia radica en el riesgo potencial de enfermedades sistémicas como las señaladas previamente. Se calcula que, en México, hasta un 70% de personas mayores de 65 años, podría padecer EP, lo cual permite comprender la relevancia de tratar esta enfermedad y sus consecuencias.<sup>2</sup>

Los tratamientos tradicionales para la EP consisten en la eliminación de cálculo supra y subgingival, control de biopelícula y raspado y alisado radicular. Si bien estas acciones detienen el proceso inflamatorio, no recuperan los tejidos que se han perdido.<sup>4, 5</sup>

Ante este escenario, se ha planteado otras alternativas como el uso de injertos óseos autólogos, heterólogos o sintéticos. Dichos tratamientos, consisten en colocar hueso en los defectos intraóseos causados por la EP y esperar que éste injerto se mimetice con los tejidos del paciente. Lamentablemente, en muchas ocasiones, sólo

permanece cerca del 20% del hueso que se había colocado y en otras ocasiones, el tratamiento provoca la anquilosis de la raíz del diente con su alveolo dentario, lo cual, a largo plazo, puede traer como consecuencia la fractura del diente, del alveolo o de ambos.<sup>3</sup>

Por lo anterior, continúa la investigación de otras posibles alternativas que detengan la destrucción de tejidos y que también permitan la regeneración de estos. En este sentido, la investigación en células troncales es una de las áreas con desarrollo más rápido en diversos ámbitos de la medicina, incluyendo la periodoncia y la odontogeriatría, y podría ser una posible solución al problema de la pérdida de tejidos por la EP.

En este sentido, dentro de las diversas fuentes de células troncales, existen las células troncales mesenquimales derivadas de pulpa de dientes deciduos. Como su nombre lo indica, estas células son obtenidas de la pulpa cameral de los dientes ya exfoliados. Desde su descubrimiento, se han realizado diversos estudios donde se ha observado que tienen propiedades similares a las células de médula ósea, pero con la ventaja de que su obtención es mínimamente invasiva y de formar tejidos similares a los tejidos dentales.<sup>3</sup>

De acuerdo con estudios preclínicos, el uso de las DPMSC podría ser una nueva terapia con potencial de regeneración periodontal, ya que dichas células son capaces de diferenciarse hacia fibroblastos del ligamento periodontal y encía, cementoblastos y osteoblastos. Además, se ha observado que las células mesenquimales tienen capacidad inmunoreguladora y regulan el estrés oxidante.<sup>4</sup>

Si bien las DPMSC tienen relativa accesibilidad de obtención y los resultados *in vitro* y en animales son prometedores, las investigaciones clínicas con humanos se encuentran en una etapa incipiente.

Por lo cual nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto del tratamiento con DPMSC sobre la regeneración ósea del periodonto, así como de la actividad



antioxidante y antiinflamatoria en saliva en comparación con el tratamiento convencional en personas en proceso de envejecimiento con EP?

Dado lo anterior, considerando los hallazgos de los estudios preclínicos sobre el efecto del tratamiento de DPMSC sobre la regeneración ósea, efecto antioxidante y antiinflamatorio, suponemos que las personas en proceso de envejecimiento con EP, que reciban el tratamiento con DPMSC, mostrarán una regeneración ósea, actividad antioxidante y antiinflamatoria significativamente mayor que el grupo con tratamiento convencional.

## **II. Objetivos**

### **II.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de las DPMSC, sobre la regeneración ósea del periodonto de adultos en proceso de envejecimiento con EP.

### **II.2 Objetivos específicos**

II.2.1. Identificar el efecto del tratamiento con DPMSC sobre la mejoría clínica y radiológica del periodonto de personas en proceso de envejecimiento con EP.

II.2.2. Evaluar el efecto del tratamiento con DPMSC sobre la concentración de lipoperóxidos, antioxidantes y enzima SOD en saliva de personas en proceso de envejecimiento con EP.

II.2.3. Valorar el efecto del tratamiento con DPMSC sobre la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$  en saliva de personas en proceso de envejecimiento con EP.

### **III. Antecedentes**

#### **III.1 Enfermedad periodontal**

La enfermedad periodontal (EP), también conocida como periodontitis, es un padecimiento inflamatorio crónico caracterizado por la destrucción del tejido conectivo que da soporte a los dientes. De no corregirse, en la mayoría de los casos conduce a la pérdida dentaria con sus respectivas repercusiones en la salud del individuo.<sup>1, 2</sup>

La EP se caracteriza por la aparición de signos clínicos de inflamación en los tejidos de soporte. Sus principales características patológicas son la acumulación de un infiltrado inflamatorio en los tejidos adyacentes, la ruptura de las fibras del tejido conectivo que anclan la raíz del diente al hueso alveolar, la migración apical de la adherencia epitelial o epitelio de unión y la resorción de la porción marginal del hueso alveolar, lo que en conjunto forma la bolsa periodontal.<sup>5</sup>

##### **III.1.1 Fisiopatología de la EP**

En la mayoría de los casos, la enfermedad inicia por la acumulación de biopelícula en la zona marginal. La biopelícula es el conjunto de células epiteliales que se descaman del epitelio de la mucosa oral, de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, y de leucocitos extravasados de los capilares. Todo lo anterior, se encuentra adherido a la superficie del diente y entra en contacto con el epitelio de la encía.<sup>6</sup> Si la biopelícula no es retirada a los 4 días, en el surco gingival aparece una lesión inicial causada por bacterias anaeróbicas, que no es clínicamente visible y que se caracteriza por una respuesta inflamatoria aguda a la acumulación de biopelícula (Figura III.1.1).<sup>7</sup>

Esta reacción clínica es causada por el aumento en la permeabilidad vascular y la estimulación de las terminaciones nerviosas dolorosas, lo cual, a su vez, es desencadenado por los lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos presentes en la membrana celular de estas bacterias. Además, tanto las proteasas como las toxinas que secretan las bacterias anaeróbicas, estimulan a los receptores de tipo toll (TLR) de los linfocitos y macrófagos locales.<sup>1, 8</sup>

La primera zona de afectación es el epitelio de unión y la parte más coronal del tejido conectivo.<sup>1</sup> Si esto se sostiene en el tiempo, las arteriolas, capilares y vénulas del plexo dento-gingival se dilatan y se evidencian histopatológicamente. Además, se produce un aumento en la permeabilidad del lecho microvascular y se observa un aumento del fluido crevicular y la migración de neutrófilos a la zona de afectación, desde el plexo vascular por debajo del epitelio de unión y del surco gingival.<sup>6</sup>

El infiltrado de las proteínas del suero, fluido y células inflamatorias, causa la pérdida de colágena y la formación de un espacio que ocupa de 5% a 10% del tejido conjuntivo gingival por debajo del epitelio enfermo.<sup>6</sup>

Después de 7 días de la acumulación de la primera capa de biopelícula, el infiltrado inflamatorio aumenta en el sitio de la lesión inicial.<sup>5</sup> Los vasos por debajo del epitelio de unión permanecen dilatados, y su número aumenta debido a la apertura de los lechos capilares previamente inactivos. Se observan abundantes linfocitos y macrófagos en la periferia de la lesión y un escaso número de células plasmáticas. En esta etapa, el infiltrado ocupa aproximadamente el 15% del tejido conjuntivo gingival, con la destrucción del colágena en el área infiltrada de 60 a 70%. Las células infiltrantes ocupan el espacio creado por la destrucción del colágena. Clínicamente los cambios inflamatorios son visibles y se presentan como edema y eritema.<sup>9</sup>

Después de 2 a 3 semanas de la primera acumulación de biopelícula, la lesión temprana evoluciona a lesión establecida. Ésta se caracteriza por un aumento adicional en el tamaño de la zona afectada y un predominio de células plasmáticas y linfocitos en la periferia de la lesión. Los macrófagos y los linfocitos son detectables

en la lámina propia de la bolsa gingival. Adicionalmente, existe un infiltrado creciente de neutrófilos en el surco epitelial.<sup>10</sup>

El epitelio de unión y del surco pueden proliferar y migrar más profundamente en el tejido conectivo, lo cual constituye, clínicamente, la formación de una bolsa periodontal. El epitelio de la bolsa no está unido a la superficie del diente y contiene un infiltrado de leucocitos, que en su mayoría son neutrófilos que migran a través del epitelio, en el surco gingival o en la bolsa.<sup>3</sup>

Finalmente, se forma una lesión avanzada donde es evidente la bolsa periodontal, que puede tener una superficie ulcerada y supurativa. Además, la destrucción del hueso alveolar y el ligamento periodontal se acentúan y la migración apical del epitelio de inserción permanece.<sup>1</sup> Si la EP no es tratada en este momento, la destrucción ósea continua a lo largo de la cresta del tabique interdental y alrededor de los vasos sanguíneos comunicantes. El epitelio prolifera apicalmente a lo largo de las superficies radiculares, dejándolas expuestas al medio bucal. En este punto, la destrucción de tejidos es de tal magnitud que causa que el diente tenga movilidad excesiva, lo cual conduce, en cuestión de semanas, a la pérdida de éste con sus lógicas repercusiones en la calidad de vida del individuo.<sup>11</sup>

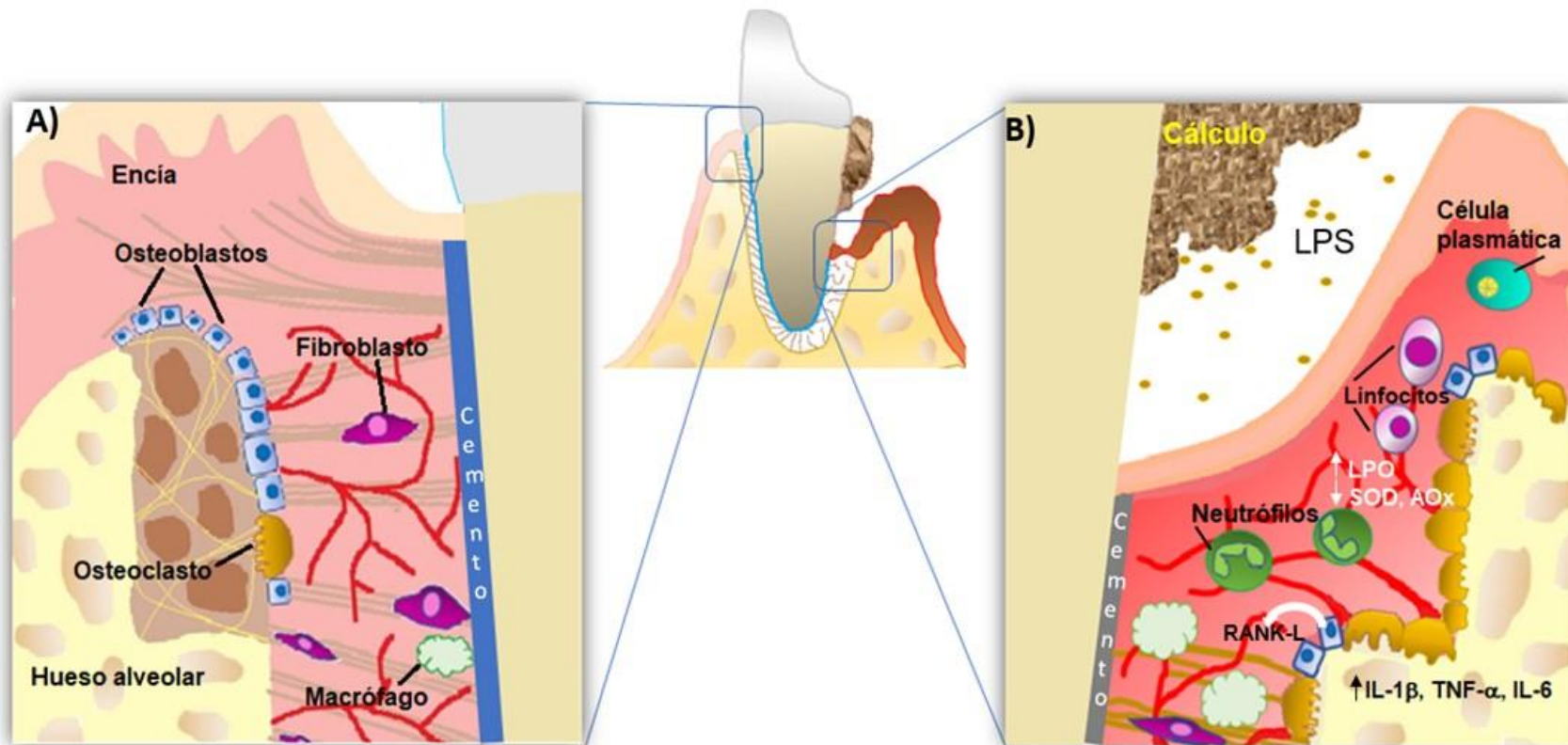


Figura III.1.1 La patogenia de la enfermedad periodontal. A) Se observa el tejido periodontal sano. B) Cuando el microbioma localizado en la superficie del esmalte del diente, debajo del margen gingival, se vuelve disbiótico, inicia la inmunidad innata estimulando las células residentes (células epiteliales, células dendríticas, fibroblastos de ligamento periodontal y fibroblastos gingivales) para producir mediadores de la inflamación en respuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS). Las células residentes ubicadas en el tejido conectivo y el hueso alveolar producen citocinas y quimiocinas proinflamatorias, que incluyen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Los microorganismos ubicados en la biopelícula pueden llegar al tejido conectivo y se dirigen hacia el hueso alveolar, lo que lleva a la expresión de RANK-L por los osteoblastos. Si la infección no se resuelve, la liberación de mediadores proinflamatorios continuará y la activación de las células B y T iniciará la inmunidad adaptativa. Las células T producirán TNF- $\alpha$ , RANK-L e IL-17, lo que conducirá a un aumento de la osteoclastogénesis y la resorción ósea. Esto dará como resultado los signos clínicos de la enfermedad caracterizada por aumento de la pérdida de inserción clínica.

### **III.1.2 Enfermedad periodontal y envejecimiento**

La edad es el mayor factor de riesgo para muchas enfermedades, incluidas las enfermedades orales como la periodontitis.<sup>12</sup>

Durante el proceso de envejecimiento, se dan numerosos cambios en la cavidad oral, entre los que se incluyen el adelgazamiento generalizado de las mucosas, disminución de producción de saliva, atricción dental y disminución o pérdida de la pulpa dental. Específicamente hablando del periodonto, se sabe que con el paso de los años la encía se adelgaza y se vuelve friable, el cemento radicular se acumula en la parte apical y, quizá lo más notorio, el hueso alveolar se adelgaza y se pierde, lo cual se denomina defectos óseos horizontales.<sup>13</sup>

Las condiciones antes mencionadas, son modificaciones adaptativas y no son patológicas; sin embargo, la disminución tanto en cantidad, como en calidad de la encía y del hueso, es un factor de riesgo para padecer EP.<sup>12</sup>

Es por ello, que el aumento de la prevalencia y la gravedad de la EP se ha asociado durante mucho tiempo con el envejecimiento, de modo que esta afección oral afecta a la mayoría de la población adulta mayor de 50 años. Aunque el sistema inmune es un componente crítico para mantener la salud, el envejecimiento puede caracterizarse por modificaciones cuantitativas y cualitativas del sistema inmune. Este proceso, denominado "inmunosenescencia", es una modificación progresiva del sistema inmune que conduce a una mayor susceptibilidad a infecciones, neoplasia y autoinmunidad.<sup>13</sup>

Además, la reducción global en la capacidad del hospedero para responder eficazmente a estos desafíos se combina con un aumento progresivo en el estado proinflamatorio general, denominado inflamación relativa al envejecimiento (IRE).<sup>14</sup>

De acuerdo con la definición de inmunosenescencia, se ha sugerido que el efecto acumulativo de la exposición prolongada del periodonto al desafío microbiano es, en

parte, un factor que contribuye a los efectos del envejecimiento en estos tejidos. Por lo tanto, también se ha planteado la hipótesis de que las alteraciones en la función de las células inmunes y no inmunes residentes del periodonto contribuyen a la expresión de inflamación en la enfermedad periodontal.<sup>15</sup>

Por otra parte, se sabe que la microbiota oral es altamente compleja en organización y tiene la capacidad de acelerar los cambios fenotípicos en respuesta a presiones ambientales desde el nacimiento hasta la vejez.<sup>16</sup> Esos cambios pueden ser provocados por el entorno local, el sistema inmunitario del huésped y el medio ambiente.<sup>17</sup> El equilibrio entre el huésped y la microbiota asegura la homeostasis que finalmente conduce a la salud oral, en caso de que esto no se suscite, trae como consecuencia enfermedades infecciosas como la caries o la EP.<sup>18</sup>

Tanto el efecto acumulativo de la pérdida periodontal por el paso del tiempo, como alteraciones en el sistema inmune o cambios en la composición de la microbiota subgingival, son las principales teorías que se han propuesto para explicar la mayor prevalencia de la EP en el envejecimiento. En este sentido, los cambios en el estado inflamatorio inmune local o sistémico pueden influir en la microbiota oral y viceversa.<sup>19,</sup>

20

Se ha postulado que el proceso de IRE podría interferir con la población microbiana residente de las áreas infectadas naturalmente del cuerpo humano, como el intestino y la cavidad oral.<sup>21</sup> Además, la inmunosenescencia, también puede contribuir a una mayor susceptibilidad de las personas mayores a las infecciones microbianas, lo que puede aumentar aún más los efectos de la inflamación.<sup>22</sup>

Cada vez hay más pruebas de que el proceso de IRE es un factor de riesgo importante tanto para la morbilidad como para la mortalidad en las personas mayores, y la inflamación puede ser potenciada por productos derivados por las comunidades microbianas existente en el cuerpo, como la microbiota periodontal, que puede alcanzar la circulación.<sup>23</sup> Por lo cual, es importante comprender el inicio y la progresión de la EP para mejorar la salud oral y sistémica de estos individuos.



### **III.1.3 Tratamiento para enfermedad periodontal**

Para corregir el daño causado por las bacterias y la respuesta inmune exacerbada del organismo durante la EP, se aplican diversos tratamientos que apuntan a la eliminación de los factores causales, con resultados positivos al tratarse de lesiones pequeñas e incipientes. Sin embargo, cuando el tratamiento se posterga, las células de respuesta inflamatoria causan destrucción de cemento, fibras del ligamento periodontal e incluso conducen a la activación de osteoclastos generando destrucción de los tejidos periodontales y la recuperación se complica.<sup>24</sup>

Actualmente, los métodos para reconstituir estructuras periodontales perdidas por EP se han basado en estrategias convencionales mecánicas y anti-infecciosas, seguidas de tratamientos quirúrgicos para colocar diversos materiales en sustitución de los tejidos perdidos.<sup>25</sup>

Es por ello, que la regeneración periodontal es particularmente difícil, ya que requiere una regeneración predecible de cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar; además de que es indispensable que los tres mantengan una relación fisiológica estrecha para garantizar la restauración de su estructura compleja.<sup>23, 26</sup>

Por lo cual, en los últimos años se han planteado diversas terapéuticas, entre ellas la aplicación de células troncales de médula ósea o de otros tejidos. Si bien los estudios preclínicos han mostrado evidencia esperanzadora, la aplicación clínica se enfrenta a algunas dificultades como la accesibilidad de células, costo y el tiempo requerido para el cultivo *ex vivo* de un paciente antes de volver a la implantación.<sup>25, 27</sup>

En este sentido, se propone el uso de células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental de dientes deciduos (DPMSC, por sus siglas en inglés) como una alternativa de obtención mínimamente invasiva de células alogénicas que sean útiles en la terapia celular.<sup>28</sup>

## III.2 Células troncales mesenquimales

Una célula troncal (Stem cell, “SC” por sus siglas en inglés) es una célula indiferenciada que tiene capacidad de autoregenerarse (lo que perpetúa la población de células troncales), y se divide asimétricamente, en una troncal y otra con mayor compromiso hacia la proliferación y diferenciación celular.<sup>29, 30</sup>

Las SC son células que *in vitro* son capaces de autorenovarse y de diferenciarse en al menos tres linajes: osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Figura I.2.1). Además, en condiciones de cultivo estándar se adhieren a una caja de plástico. En cuanto a su inmunofenotipo, un 95% de la población de SC expresan los marcadores CD105, CD73, CD90 y no expresan los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, CD11b o HLA-DR.<sup>31-33</sup>

Las SC embrionicas se obtienen de la masa celular interna del blastocisto al quinto día de desarrollo embrionario. Son pluripotentes porque dan origen a las tres capas germinativas del embrión y a las membranas que lo cubren.<sup>34</sup> A pesar de que su capacidad pluripotente les permite dar origen a cualquier célula del organismo, el uso terapéutico de estas células genera conflictos éticos, por lo cual se han preferido de origen postnatal.<sup>35</sup>

Un tipo de SC postnatal son las células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés). Estas células son altamente proliferativas y dan origen a la mayoría de los derivados del mesoderma.<sup>36</sup>

Las MSC fueron inicialmente encontradas en la médula ósea, pero en la actualidad se han encontrado otras fuentes como en tejido adiposo, cordón umbilical, cerebro, fluido menstrual y tejidos dentales.<sup>39-43</sup>

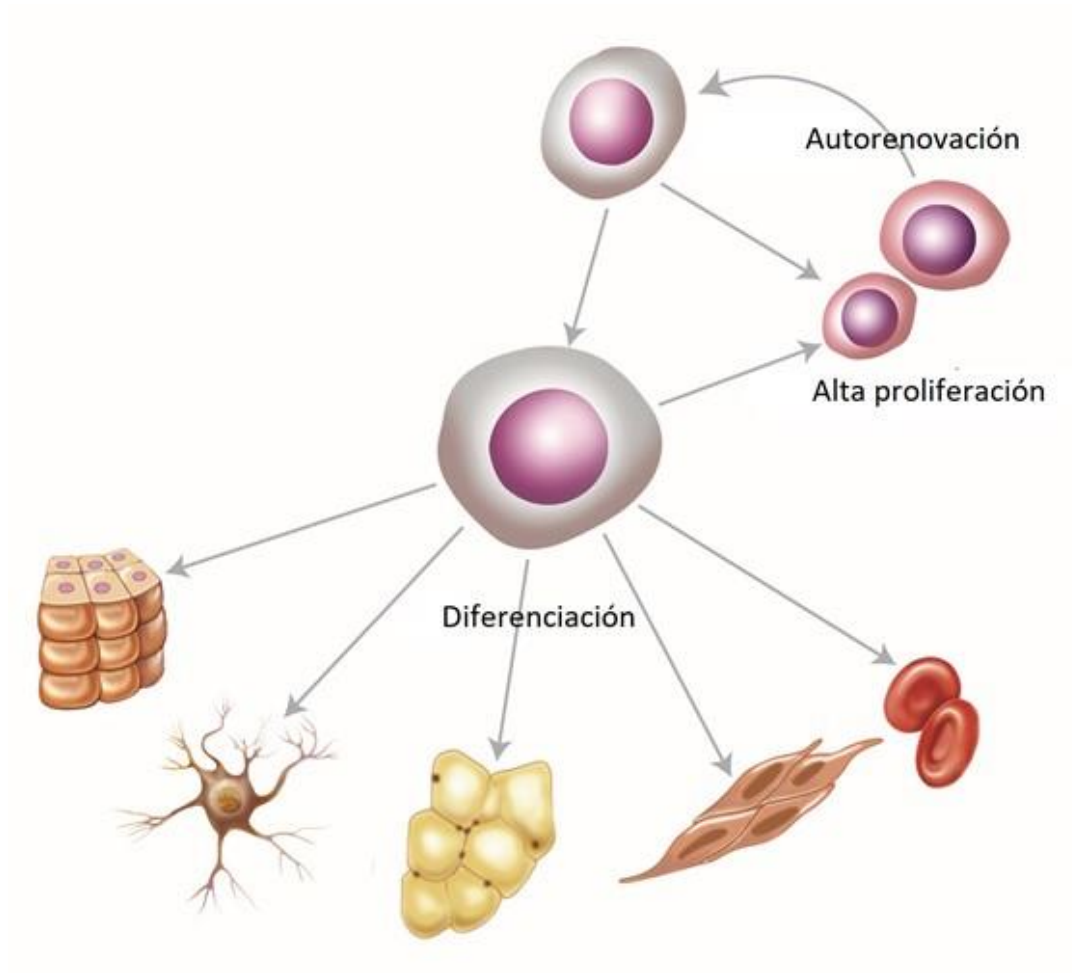


Figura III.2.1 Características de las células mesenquimales troncales. El esquema muestra la capacidad de diferenciación celular, considerando la autoregeneración, replicación y diferenciación en células epiteliales, neuronales, adiposas, musculares y sanguíneas. (Modificado de Hernández-Monjaraz, 2018).<sup>44</sup>

En cuanto a los tejidos dentales, el equipo de Gronthos identificó la presencia de MSC en pulpa dental. Posterior a ello, se realizaron diversas investigaciones y se encontraron MSC en la pulpa de dientes deciduos, en el ligamento periodontal, en la papila apical, en el folículo dental, en la encía y en dientes con enfermedad periodontal (Figura III.2.3).<sup>46-52</sup>

Las células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPMSC) comparten características morfológicas e inmunológicas similares al resto de MSC; sin embargo, no son idénticas y tienen diferencias en la proliferación y diferenciación.<sup>46</sup>

En cuanto a la proliferación, varios estudios sugieren que las DPSC de dientes deciduos son células más inmaduras y con una tasa de proliferación mayor que las de médula ósea y las de dientes permanentes.<sup>53-55</sup>

De igual forma Nakamura *et al.* (2009) compararon los niveles de proliferación de las MSC de pulpa de dientes deciduos, de dientes permanentes y de médula ósea. Se observó que las primeras había un mayor nivel de proliferación y mayor expresión de genes relacionados con la proliferación y la matriz extracelular.<sup>56</sup>

De acuerdo con Huang *et al.* (2009), la población de DPMSC es homogénea.<sup>55</sup> Sin embargo, el equipo de Gronthos observó que cuando se colocan en un medio de cultivo, cada célula clon da origen a una colonia y que estas colonias difieren entre sí en densidad, lo cual podría indicar que tienen diferentes grados de proliferación.<sup>57</sup>

En cuanto a la diferenciación, las DPMSC tienen un potencial de diferenciación restringido en comparación con las obtenidas de médula ósea, lo cual probablemente se deba a las primeras interacciones que tienen estas células con las de la cresta neural.<sup>54</sup>

Las DPMSC se pueden diferenciar en células odontogénicas y comprometerse hacia la diferenciación osteogénica y adipogénica.<sup>46</sup> También expresan varios marcadores neuronales y son capaces de diferenciarse a linajes miogénicos y condrogénicos.<sup>54</sup>

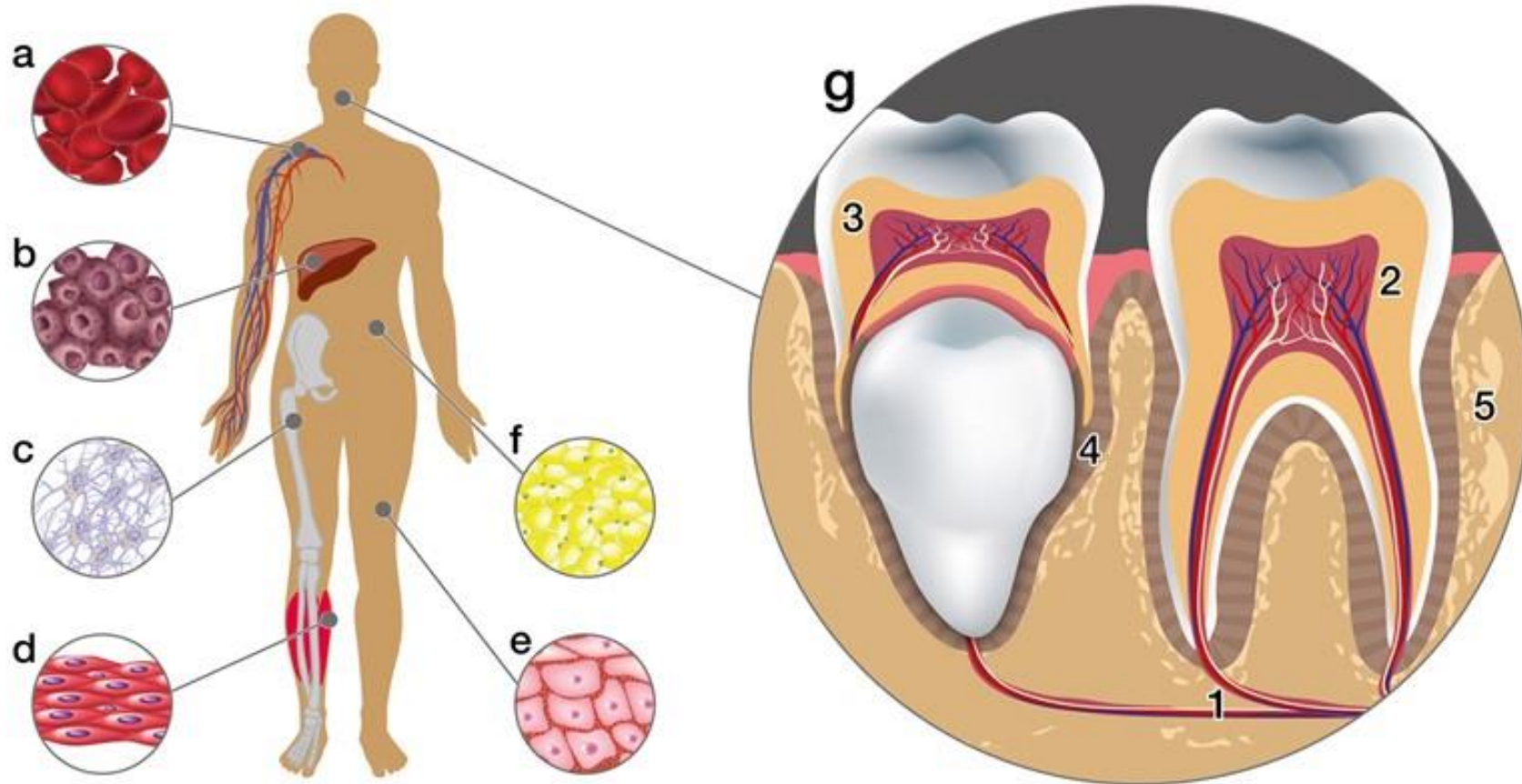


Figura III.2.2 Fuente de células troncales en el organismo humano. A la izquierda: el esquema muestra las principales fuentes tisulares de las células troncales adultas. a. Hígado; b. Médula ósea y sangre periférica c. Músculos; d. Complejo maxilofacial; e. Tejido adiposo y f. Piel. A la derecha: Complejo maxilar. El esquema muestra las estructuras maxilares que son fuente de células troncales. a. Papila dental; b. Pulpa dental; c. Folículo dental; d. Ligamento periodontal; e. Pulpa de terceros molares (Tomado de Hernández-Monjaraz, 2018).<sup>44</sup>

A diferencia de las DPMSC de dientes permanentes, las de dientes deciduos son capaces de diferenciarse a células formadoras de hueso *in vivo*.<sup>57</sup>

La edad del diente del cual se tomen las MSC de pulpa de dientes deciduos modifica su capacidad de diferenciarse. Además, se ha visto que son una población más inmadura y tienen mayor capacidad de proliferar que las de dientes permanentes o de médula ósea.<sup>58</sup>

En comparación, las PDMSC de dientes deciduos y permanentes expresan mayor cantidad de  $\beta$ -tubulina clase III y de proteína asociada a microtúbulos 2 que las MSC de médula ósea, con lo cual se sugiere que tienen mayor potencial para la neurogénesis que estas últimas.<sup>59</sup>

### **III.3 Aplicación de células troncales mesenquimales en EP**

La EP es la inflamación y destrucción de los tejidos de soporte del diente a consecuencia de la respuesta del hospedero ante la colonización bacteriana.<sup>60</sup> Está relacionada con altos niveles de citocinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y activación de metaloproteinasas de matriz que en conjunto causan la pérdida progresiva del tejido.<sup>61</sup>

Si la pérdida de la homeostasis no se trata, se destruye la adherencia epitelial, la adhesión del ligamento periodontal y se pierde la altura de la cresta alveolar. Esto se traduce clínicamente en movilidad dental y formación de bolsas periodontales, lo cual, con el tiempo, puede conducir a la pérdida dentaria.<sup>62</sup>

Con el propósito de evitar la pérdida dental y las complicaciones subsecuentes que ello genera, la periodoncia propone realizar un tratamiento convencional. Éste consiste en enfatizar la higiene, realizar un raspado y alisado radicular, dar antibioticoterapia y, en ocasiones, realizar una cirugía por colgajo. Estas acciones logran detener la enfermedad, sin embargo, no pueden regenerar los tejidos que se han destruido.<sup>63</sup>

Por lo cual, la regeneración de tejido es el segundo objetivo de la terapia periodontal y este se dificulta debido a que es necesario contar tanto con un andamio y células adecuadas. En este sentido, los tratamientos tradicionales para la EP colocan diversos andamios, sin embargo, es conocido que las células del paciente adulto mayor entran en senescencia y por ello es una mejor opción colocar otro tipo de células. Por lo anterior se ha planteado, el injerto alogénico de MSC como una opción para recobrar estos tejidos.<sup>64-67</sup>

En este sentido, estudios reportan que las MSC derivadas de médula ósea promueven la proliferación celular, movilización, angiogénesis y expresión de marcadores osteogénicos como la fosfatasa alcalina, colágena tipo I y el gen RunX2.<sup>68</sup> Además, también pueden reclutar a las células troncales endógenas al sitio

receptor del injerto y mostrar regeneración tanto del hueso como de los tejidos periodontales en defectos de ratas y perros.<sup>69</sup>

Además, las MSC pueden aportar un suministro adecuado de sangre en los tejidos periodontales, lo cual es una condición esencial para que el trasplante de células pueda regenerar el tejido. Se ha observado que las MSC pueden ejercer un efecto de neovascularización, por lo tanto, una de las funciones terapéuticas es la inducción temprana de tejido de granulación. En el caso de la EP, este proceso será seguido por la estabilización de la red neovascular en el nicho periodontal.<sup>70</sup>

Asimismo, tanto la reparación de heridas y como la angiogénesis se incrementan, cuando las MSC están en un medio condicionado por ciertos factores como el factor de crecimiento insulínico 1, el factor de crecimiento vascular endotelial, el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  y el factor de crecimiento de hepatocitos.<sup>71</sup> Lo cual contribuye a que los signos de inflamación sean menores y a la regeneración de hueso y tejidos periodontales.<sup>72</sup>

De igual forma, varios estudios han mostrado que las MSC derivadas de médula ósea también secretan varios factores como el factor de crecimiento insulínico (IGF-1), el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta 1$ . Estos factores son necesarios para promover tanto la regeneración ósea, la del ligamento periodontal y son progenitores comunes de odontoblastos y osteoblastos por lo cual se les considera útiles para la ingeniería de tejidos.<sup>69,73-76</sup>

Por otra parte, hallazgos histológicos como el de Han *et al.* (2014) en modelos animales, sugieren que la aplicación de MSC puede promover la regeneración de defectos infraóseos 21 días después del tratamiento.<sup>77</sup>

De igual forma Yu *et al.* (2013) en un modelo de rata, observaron que la colocación de células troncales derivadas del ligamento periodontal sobre un andamiaje gelatinoso es efectiva para alcanzar la regeneración de los tejidos periodontales suaves y duros.<sup>78</sup>



Finalmente, en un estudio realizado en ovejas, se demostró la habilidad de las MSC de ligamento periodontal sobre un andamiaje de colágena, para acelerar la reparación de una dehiscencia creada artificialmente para emular la destrucción tisular que presentan los pacientes con EP avanzada. En esta investigación se observó una extensa cobertura de nuevo hueso alveolar con una línea de células similares a osteoblastos a las 4 semanas del tratamiento.<sup>79</sup>

### **III.4 Aplicación de células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental para tratar la EP**

Como se vio anteriormente, la aplicación de SC puede recuperar los tejidos perdidos a causa de la EP. Sin embargo, pensando en que la EP se presenta después de la cuarta década de vida, es probable que las células del paciente hayan entrado en proceso de senescencia y la obtención alogénica de estas células es invasiva y por lo tanto, disminuye las probabilidades de encontrar un donador.

Dado que existen diferentes fuentes de SC que comparten las mismas propiedades que las SC de médula ósea, se ha investigado su posible uso para la EP (Figura I.3.1).

A las DPMSC se les considera como opciones porque los resultados de estudios *in vitro* indican que poseen propiedades inmunosupresivas similares a las que presentan las células derivadas de la médula ósea. Aunado a ésto, estudios en modelos animales mencionan que es seguro utilizarlas en transplantes autólogos o alogénicos.<sup>52, 80, 81</sup>

Las DPMSC también tienen funciones antiinflamatorias, lo cual sugiere que pueden detener el desarrollo de las lesiones y permitir que los procesos regenerativos intrínsecos tengan mayor posibilidad de éxito. En este sentido, la DPMSC podrían tener un efecto directo o indirecto en los procesos de estrés oxidante e inflamación característicos de la EP, puesto que se ha sugerido que estas células tienen un efecto

antioxidante que podría ayudar a reducir los niveles altos de radicales libres que se presentan en la EP.<sup>76, 82-84</sup>

En otro estudio, donde se deseaba conocer el efecto de las células troncales en un modelo preclínico con cerdo miniatura, se demostró que el injerto alogénico de DPMSC puede reparar efectivamente la pérdida de tejido duro y blando provocada por la EP.<sup>85</sup>

En este sentido, las DPMSC demuestran una fuerte capacidad para inducir la formación de hueso *in vivo*. De acuerdo a las investigaciones, las células de pulpa de dientes exfoliados, no pueden diferenciarse directamente en osteoblastos pero pueden inducir la formación de hueso nuevo formando una plantilla osteoinductora para reclutar células osteogénicas del huésped.<sup>86</sup>

Por otra parte, se ha observado que para tener éxito en la construcción de estructuras del cemento, ligamento y hueso para proporcionar una conexión funcional entre un diente y el tejido óseo que rodea, no sólo son necesarias las células, sino también, una serie de señales químicas y un soporte físico llamado andamio. Al respecto, se ha demostrado que las DPMSC son capaces de promover la regeneración en defectos periodontales cuando se colocan combinadas con biomateriales.<sup>87, 88</sup>

Del mismo modo, se ha encontrado que las DPMSC colocadas en un andamiaje de colágena pueden ser utilizadas para reparar defectos óseos en humanos puesto que este aloinjerto produjo una rápida regeneración del hueso tanto en calidad como en cantidad de tejido, comparadas con las técnicas estándar utilizadas donde ocupan hueso de diversos orígenes para la regeneración guiada.<sup>78</sup>

Además, las DPMSC de dientes deciduos son capaces de diferenciarse en vasos sanguíneos funcionales que conectan con los vasos del receptor.<sup>28</sup> Se ha visto que en el trasplante de DPMSC dentro del conducto radicular de un diente previamente despulpado, hay neoformación de capilares.<sup>89</sup>

Por lo cual, para tener éxito en la reconstrucción de estructuras del cemento, ligamento y hueso y para proporcionar una conexión funcional entre un diente y el

tejido óseo que rodea, no sólo son necesarias las células y la formación de vasos sanguíneos, sino también una serie de señales químicas y un andamio.<sup>90</sup>

Al respecto, se ha demostrado que las DPMSC son capaces de promover la regeneración en defectos periodontales cuando se colocan en andamios de diversos biomateriales como la colágena, que puede ser utilizada para reparar defectos óseos en humanos.<sup>91,92</sup> En un estudio con un aloinjerto de DPMSC sobre una esponja de colágena, se observó que se produjo una rápida regeneración del hueso tanto en calidad como en cantidad de tejido, comparado con las técnicas estándar utilizadas donde ocupan hueso de diversos orígenes para la regeneración guiada.<sup>84</sup>

En cuanto a la capacidad de mineralización, un estudio *in vivo* sugiere que las DPMSC de dientes deciduos tienen mayor mineralización que las de dientes permanentes. Los niveles de citocinas inflamatorias, metaloproteinasas 1, inhibidor de metaloproteinasas 1, metaloproteinasas 2, inhibidor de metaloproteinasas 2 e interleucina 6 fueron mayores en las de dientes deciduos que en las de adultos.<sup>53</sup>

Comparado con las MSC de médula ósea y DPMSC de dientes adultos y deciduos, éstas últimas son células más inmaduras. Se ha observado que tiene mayor capacidad de proliferación, formación de grupos celulares, capacidad osteoinductora y alta capacidad de autorenovarse.<sup>46</sup>

Las DPSC son mejores candidatas que las MSC de médula ósea para estudiar la formación ósea porque tienen altas tasas de proliferación y son eficientes para la producción de islotes de hueso.<sup>54, 88</sup> Además, son capaces de diferenciarse en osteoblastos, secretar una gran cantidad de matriz extracelular y de formar hueso vascularizado.<sup>93-95</sup>

Paralelamente, estas células demuestran una fuerte capacidad para inducir la formación de hueso *in vivo*. De acuerdo a las investigaciones, las PDSC de dientes exfoliados, no pueden diferenciarse directamente en osteoblastos pero pueden inducir la formación de hueso nuevo formando una plantilla osteoinductora para reclutar células osteogénicas del huésped.<sup>96</sup>

En un análisis *in vivo* sobre la formación de tejidos ectópicos, se mostró que, entre las MSC de médula ósea, las DPMSC de dientes permanentes y las DPMSC de dientes deciduos, estas últimas son capaces de diferenciarse y formar hueso.<sup>55</sup>

Tanto la osteogénesis y dentinogénesis mediada por las MSC de médula ósea y por las DPSC, son reguladas por diferentes mecanismos. Ésto provoca que exista una organización diferente en los tejidos mineralizados y no mineralizados.<sup>97</sup> Aunque la pulpa dental y la médula ósea son similares en algunos aspectos como que ambos son vascularizados e inervan tejidos que están rodeados por mineral, *in vivo*, las PDSC tienen una diferenciación más restrictiva que las de médula ósea.<sup>98</sup>

Finalmente, a pesar de que las evidencias clínicas y experimentales avalan la potencial eficacia de utilizar DPMSC autólogas en el tratamiento de la EP (Cuadro V.1), los estudios en humanos son escasos. Al respecto, Aimetti *et al.* (2014), describieron un caso clínico de un defecto periodontal en un hombre de 56 años, tratado mediante DPMSC de uno de sus terceros molares, donde tras un año de intervención se observó clínica y radiológicamente que el defecto había sido completamente llenado por un tejido similar al hueso.<sup>99</sup>



Figura III.3.1 Propiedades de las DPSC que pueden influir en la regeneración periodontal.

Cuadro III.3.1. Estudios sobre la aplicación de células troncales en la reparación de tejidos dentales.

Autores	Tipo de células	Receptor	Objetivo	Hallazgos
Gronthos <i>et al.</i> (2000) <sup>45</sup>	Células troncales de pulpa dental de terceros molares	Ratones inmuno-comprometidos	Comparar células troncales de pulpa dental con células de médula ósea en la formación del complejo dentino-pulpar.	Se observó que las células trasplantadas generan una estructura de dentina cubierta con odontoblastos que rodeaban un tejido intersticial pulpar. Se formó el complejo dentino-pulpar a partir de células troncales de pulpa dental.
Miura <i>et al.</i> (2003) <sup>46</sup>	Células troncales de dientes deciduos	Ratones inmuno-comprometidos	Identificar las características de las células de la pulpa dental de dientes deciduos y examinar su potencial de desarrollo <i>in vivo</i> .	Se demostró que las células troncales de pulpa de dientes deciduos se pueden diferenciar en odontoblastos e inducir a los osteoblastos a formar hueso <i>in vivo</i> , sin embargo, son incapaces de regenerar el complejo dentino-pulpar.
Shi <i>et al.</i> (2005) <sup>52</sup>	Células del ligamento periodontal de terceros molares	Ratones inmuno-comprometidos	Evaluar la eficacia de células troncales mesenquimales para formar tejidos dentales	Hay poblaciones de células troncales mesenquimales distintas, asociados con estructuras dentales con el potencial de las células troncales para regenerar los tejidos.
Otaki <i>et al.</i> (2007) <sup>82</sup>	Célula de pulpa dental	Ratón	Analizar la capacidad de las células de la pulpa dental para formar hueso.	Las células troncales mesenquimales de la pulpa dental son útiles para la ingeniería de tejidos al ser progenitores

				comunes de odontoblastos y osteoblastos.
Liu <i>et al.</i> (2008) <sup>83</sup>	Células del ligamento periodontal	Cerdo	Probar el efecto de las células troncales del ligamento periodontal en el tratamiento de EP.	Las células troncales periodontales derivadas de ligamento periodontal autólogo para tratar la periodontitis en un modelo preclínico de cerdo miniatura.
D'Aquino <i>et al</i> (2009) <sup>84</sup>	Células troncales mesenquimales de pulpa de 3os molares	Humanos	Demostrar que el biocomplejo de células de pulpa dental, células troncales y esponja de colágena pueden utilizarse para reparar defectos óseos en humanos.	Los autoinjertos produjeron una rápida regeneración del hueso, que era de calidad y cantidad óptima si se compara con las técnicas estándar de uso común para la regeneración guiada y los injertos de hueso de diversos orígenes.
Iwata <i>et al.</i> (2009) <sup>76</sup>	Células troncales del ligamento periodontal	Perro	Examinar las células troncales derivadas de múltiples capas de ligamento para la regeneración periodontal	Se observó una formación de células en las 3 paredes del defecto con células troncales del ligamento periodontal y el ácido poliglicólico. Los defectos también se llenaron con $\beta$ TCP.
Pérez-Borrego <i>et al</i> (2009) <sup>74</sup>	Células mononucleares de sangre periférica	Humanos	Observar el efecto del tratamiento con células troncales en defectos óseos por EP.	Los pacientes tratados evolucionaron favorablemente tras la colocación de las células.
Feng <i>et al.</i> (2010) <sup>75</sup>	Células del ligamento	Humanos	Demostrar la utilidad del injerto de células	El injerto de células progenitoras autólogas de ligamento periodontal

	periodontal		progenitoras autólogas en la reparación de tejidos.	pueden proporcionar un beneficio terapéutico en los defectos periodontales.
Ding <i>et al.</i> (2010) <sup>87</sup>	Células del ligamento periodontal	Cerdo	Demostrar si las células troncales alogénicas del tejido periodontal pueden formar tejido	Las células troncales alogénicas del tejido periodontal pueden reparar defectos óseos en un modelo experimental de periodontitis en cerdos miniatura, sin rechazos inmunológicos.
Carini <i>et al.</i> (2011) <sup>100</sup>	Células troncales de médula ósea	Humanos	Estimular la regeneración del ligamento periodontal cerca de la pared radicular y la formación de hueso nuevo.	Se observó un relleno del área cerca de los defectos periodontales preoperatorios.
Park <i>et al.</i> (2011) <sup>101</sup>	Células del ligamento periodontal de perros	Perro	Analizar el tipo de célula ideal para la aplicación clínica	Las células troncales de ligamento periodontal propician líneas incrementales de neo cemento, con fibras de Sharpey que se insertan y cemento celular en el ápice de la raíz.
Wang <i>et al.</i> (2011) <sup>102</sup>	Células del ligamento periodontal	Ratón	Observar la distribución espacial de las células troncales en el ligamento periodontal	Las células troncales derivadas del ligamento periodontal que se encuentra sobre el hueso alveolar tuvieron mayor potencial de diferenciación multilinaje que las que se encuentran sobre la superficie radicular, tanto en la diferenciación osteogénica como en la adipogénica.



Suaid <i>et al</i> (2012) <sup>103</sup>	Células del ligamento periodontal	Perro	Evaluar histomorfométricamente, el uso de células del ligamento periodontal en el tratamiento de defectos de furcación la clase III.	Las células del ligamento en asociación con la regeneración tisular guiada pueden promover significativamente la regeneración periodontal en defectos de furcación clase III creados quirúrgicamente en perros.
Núñez <i>et al.</i> (2012) <sup>104</sup>	Células troncales de cemento y del ligamento periodontal	Perro	Evaluar el potencial regenerativo de la implantación de células de cemento y células ligamento periodontal caninas en defectos intraóseos periodontales creados experimentalmente en perros beagle.	Hay una mayor dimensión de nuevo tejido conectivo, lo que resulta en un nivel significativamente más coronal de la unión histológica.
Fu <i>et al.</i> (2014) <sup>105</sup>	Células troncales de dientes deciduos	Cerdo	Analizar el efecto del trasplante alogénico en un modelo preclínico con cerdo miniatura	Los trasplantes alogénicos de células troncales de dientes deciduos pueden reparar efectivamente la pérdida de tejido duro y blando provocada por la periodontitis en un modelo porcino.
Ferrarotti <i>et al.</i> (2018) <sup>106</sup>	Células troncales de dientes deciduos	Humanos	Evaluar el efecto de las DPMSC autólogas en defectos intraóseos sobre los parámetros clínicos y radiográficos de la regeneración periodontal.	La aplicación de DPSC autólogas mejoraron significativamente los parámetros clínicos de regeneración periodontal.

## **IV. Metodología**

### **IV.1 Población y diseño**

Estudio cuasi-experimental. Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, acuerdo No. 25/11/SO/3.4.1.

Registro del ensayo clínico. International Standards Randomised Controlles Trial Number (ISRCTN): 32188

Se incluyeron 60 adultos de 45 a 64 años, con defectos óseos verticales mayores a 4mm de profundidad causado por EP. Una vez que firmaron el consentimiento informado, se conformaron aleatoriamente dos grupos. (Figura IV.1.1)

- a. Grupo tratamiento con DPMSC. (n = 30 pacientes) Quienes recibieron las primeras etapas del tratamiento, más la colocación de andamiaje de colágena y de  $5 \times 10^6$  DPMSC.
- b. Grupo tratamiento sin DPMSC. (n = 30 pacientes) Recibieron las primeras etapas del tratamiento, más la colocación de andamiaje de colágena.

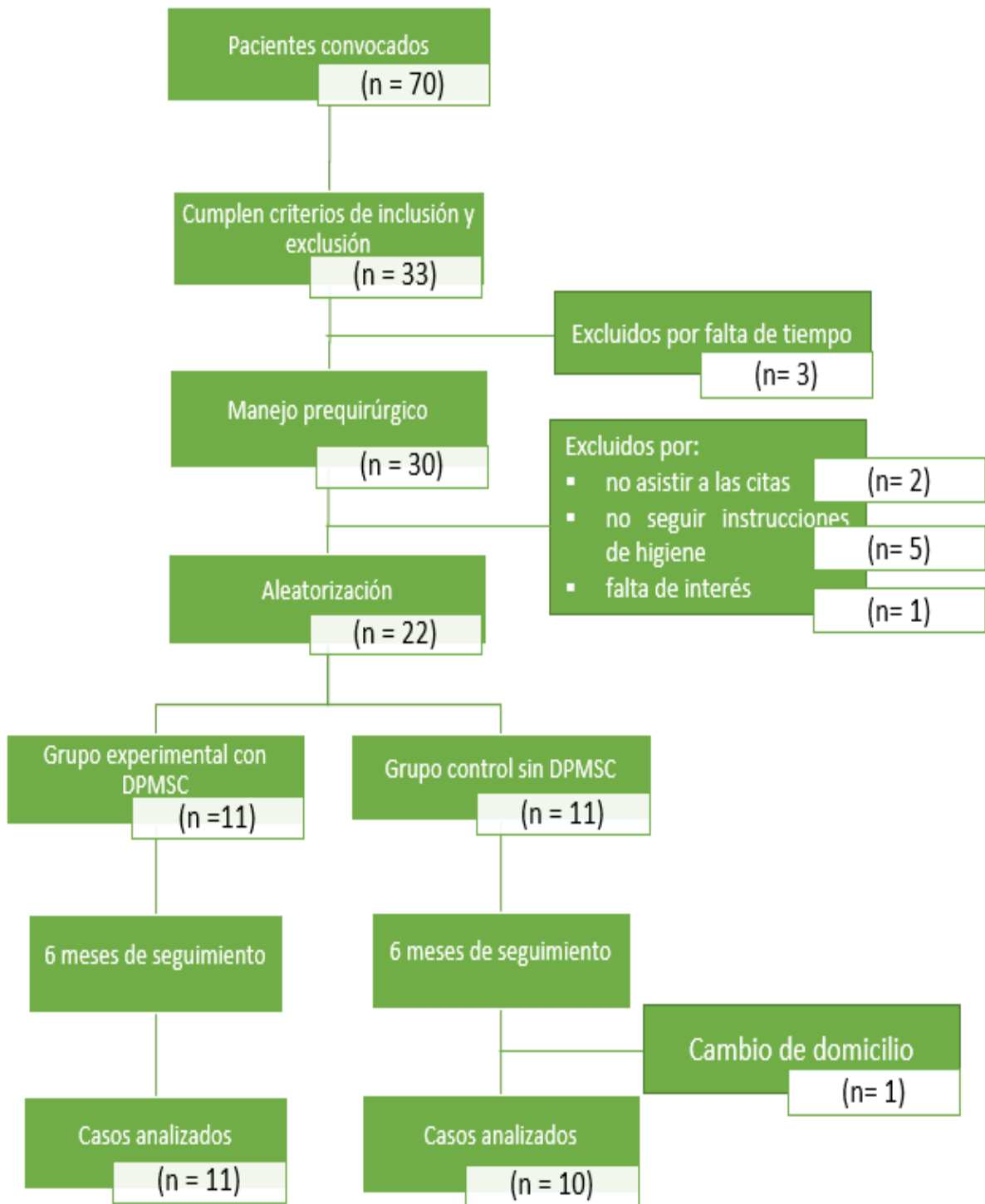


Figura IV.1.1 Esquema general del estudio

## **IV.2 Criterios de inclusión y exclusión.**

Personas sin enfermedades crónicas no trasmisibles descontroladas, sin antecedentes neoplásicos propios o familiares, no fumadores, además de no padecer de trauma de oclusión, tener al menos 12 órganos dentarios presentes en la boca al momento de revisión, ser cooperadores y con capacidad de seguir instrucciones. Además, deberán poseer destreza manual y firmar el consentimiento informado (Anexo).

Todos los participantes serán evaluados por un odontólogo para corroborar el cumplimiento de los criterios de inclusión. Posteriormente se establecerá el tipo de defecto óseo clínicamente mediante radiografías, Tomografía Volumétrica Cone-Beam (TVCB), sondeo de bolsas periodontales y nivel de inserción con sonda periodontal Hu-Friedy.

## **IV.3 Variables**

### **IV.3.1 Variables independiente:**

Tipo de tratamiento: tratamiento con y sin DPMSC.

### **IV.3.2 Variables dependientes:**

Densidad ósea (medida en unidades Hunsfield (UH)).

Reparación tisular: profundidad del surco gingival (medida en milímetros) y movilidad dental (determinada por grados de movilidad).

Marcadores de estrés oxidante (LPO, SOD, AOx).

Marcadores de inflamación (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10)

## **IV.4 Técnicas**

### **IV.4.1 Obtención de DPMSC**

Previo consentimiento informado del padre o tutor del niño que donó el diente, (Anexo II) un odontólogo capacitado realizó la extracción de un diente deciduo libre de procesos infecciosos y próximo a ser exfoliado. El diente se colocó en una solución de transporte (1% de penicilina/estreptomicina en solución de PBS) hasta su procesamiento en el laboratorio del Banco de Cordón Umbilical.

Después de la desinfección de la superficie del diente con un colutorio comercial, la pulpa dental se aisló como se describió previamente.<sup>34</sup>

El tejido de la pulpa se lavó con medio de cultivo IMDM suplementado con 10% de suero fetal bovino, después de lo cual sometió a una digestión enzimática de 3mg/mL de colagenasa tipo I y 4mg/mL de dispasa por 1h a 37°C. Posteriormente las células obtenidas se cultivaron en cajas Petri de 25mL en IMDM suplementado con suero, a 37°C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió cada 2 ó 3 días hasta alcanzar el 70% a 80% de confluencia, momento en que las células se cosecharon usando 0.05% de tripsina/EDTA y se separaron en 2 alicuotas, una para ser analizada y otra para la colocación en el paciente.

### **IV.4.2 Análisis de DPMSC**

El fenotipo celular fue analizado en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) con anticuerpos BD contra antígenos de células humanas y un citómetro de flujo BD FACSCalibur™ con el software BD Pro v.5.1.1 (todos BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.). De acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se encontró que las células eran positivas para el grupo de diferenciación (CD) 105 (85.81%), CD73 (99.81%) y CD90 (99.54%) y negativas para CD45 (0.06%),

CD34 (0.09%), CD31 (0.20% ), CD14 (0.04%), CD11b (0.04%) y relacionado con HLA – D (DR) (1.06%).

Además, se realizaron ensayos de diferenciación (Figura IV.4.2.1) para los linajes osteogénicos, adipogénicos y condrogénicos como se describió anteriormente.<sup>107, 108</sup>. Los hallazgos actuales fueron consistentes con los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular para células troncales mesenquimales.<sup>29</sup>

Posterior a realizar la caracterización de las células en la primer alícuota obtenida, se realizó la expansión de la otra alícuota hasta obtener 5 millones de PDMSC

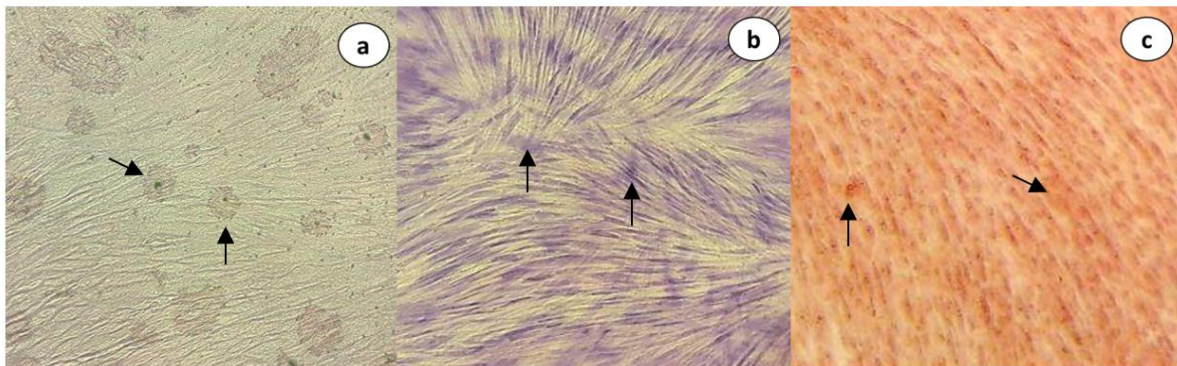


Figura IV.4.2.1 Imágenes representativas que muestran la diferenciación *in vitro* de linaje múltiple de células troncales mesenquimales de pulpa dental obtenidas de un donante de 7 años de edad: (a) tinción con aceite rojo O que muestra depósitos de lípidos (flechas), indicativos de linaje adipogénico; (b) tinción con azul alciano que muestra depósitos de glucosaminoglucanos (flechas), indicativos de linaje condrogénico; y (c) tinción con rojo alizarina que muestra áreas más densamente teñidas con depósitos minerales (flechas), indicativos de linaje osteogénico; (todas las imágenes, ampliación original 40x).

### IV.4.3 Fase clínica

La fase clínica se dividió en 5 etapas: estudios basales, estabilización de la enfermedad, toma de muestras de saliva, fase quirúrgica, seguimiento.

### **Primera etapa**

Se realizaron estudios basales preoperatorios a ambos grupos, los cuales incluyeron: tomografía computarizada, fotografías intra y extraorales. Con estos estudios se observó la intensidad de destrucción ósea y el número de tablas óseas afectadas.

Como parte de los análisis basales y tener la certeza de que el paciente cumple con los criterios de inclusión y exclusión, se realizó química sanguínea, biometría hemática, tiempo de sangrado y coagulación. Una vez realizados todos los análisis, se procedió con las distintas fases del tratamiento.

### **Segunda etapa**

Se estabilizó la enfermedad siguiendo la técnica de “full mouth desinfection” que implica la eliminación de todos los factores asociados que pudieran intervenir en el desarrollo de la EP. Ambos grupos de estudio fueron sometidos a esta fase que consistió en la remoción de cálculo supra e infragingival con ultrasonido Pfizer y la corroboración de su eliminación mediante curetas Gracey Hu-Friedy after 5. Control de biopelícula y antibioticoterapia local y sistémica.

Aunado a lo anterior, se eliminaron todos los posibles focos de infección mediante la elaboración de resinas, endodoncias y extracciones indicadas; además de corregir el trauma de oclusión.

### **Tercera etapa**

Para determinar marcadores de estrés oxidante (lipoperóxidos, SOD, AOX) e inflamación crónica (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10) se tomaron muestras de saliva en ayuno de 8 horas. Esto se realizó previamente a la colocación de DPMSC y 6 meses posterior a ello.

## **Cuarta etapa**

Consistió en el tratamiento quirúrgico para la colocación de PDMSC. Dependiendo del grupo asignado se realizó como a continuación se indica:

### **a) Grupo con injerto de PDMSC**

Previo a la intervención, se obtuvieron los signos vitales del paciente y se realizó un enjuague bucal por 2 minutos con Clorhexidina 0.12%. Tras realizar la asepsia de la zona con solución de cloruro de benzalconio, se colocó anestesia loco-regional, por medio de infiltraciones de lidocaína y adrenalina 1:50000. El acceso quirúrgico en la zona a tratar se realizó mediante técnica de colgajo, con una primera incisión paralela al eje longitudinal de los dientes, y la segunda siguiendo un diseño festoneado.

Posteriormente, se elevó un colgajo mucoperióstico para permitir el acceso a las superficies radiculares y al hueso interproximal. Se alisaron las superficies radiculares con equipo ultrasónico y se irrigó la zona con solución antiséptica o suero fisiológico.

Una vez limpia la superficie, se colocaron fragmentos de 0.5 cm<sup>2</sup> de esponja liofilizada de colágena tipo 1 (polivinilpirrolidona, clg-PVP. Fibroquel®) en el defecto óseo con la ayuda de pinza Adson lisa empapada en gel de clorhexidina. Sobre este andamio, se colocó por goteo 5 x 10<sup>6</sup> PDMSC suspendidas en 200mL de PBS.

Finalmente, se colocó una membrana absorbible de colágena (Zimmer-extend®), se realizaron puntos de sutura absorbible (Vicryl®) para reposicionar el colgajo y se cubrió la herida con un apósito periodontal (Coe-Pack®).

### **b) Grupo control sin injerto de PDMSC**

Previo a la intervención, se obtuvieron los signos vitales del paciente y se realizó un enjuague bucal por 2 minutos con Clorhexidina 0.12%. Tras



realizar la asepsia de la zona con solución de cloruro de benzalconio, se colocó anestesia loco-regional, por medio de infiltraciones de lidocaína y adrenalina 1:50000. El acceso quirúrgico en la zona a tratar se realizó mediante técnica de colgajo, con una primera incisión paralela al eje longitudinal de los dientes, y la segunda siguiendo un diseño festoneado.

Posteriormente, se elevó un colgajo mucoperióstico para permitir el acceso a las superficies radiculares y al hueso interproximal. Se alisaron las superficies radiculares con equipo ultrasónico y se irrigó la zona con solución antiséptica o suero fisiológico.

Una vez limpia la superficie, se colocaron fragmentos de 0.5 cm<sup>2</sup> de esponja liofilizada de colágena tipo 1 (polivinilpirrolidona, clg-PVP. Fibroquel®) en el defecto óseo con la ayuda de pinza Adson lisa empapada en gel de clorhexidina.

Finalmente, se colocó una membrana absorbible de colágena (Zimmer-extend®), se realizaron puntos de sutura absorbible (Vicryl®) para reposicionar el colgajo y se cubrió la herida con un apósito periodontal (Coe-Pack®).

### **Quinta etapa**

Se informó al paciente sobre los cuidados posquirúrgicos que debía seguir en las horas siguientes a la cirugía y los días posteriores.

En cuanto a antibioticoterapia, se indicó metronidazol, 500mg cada 8 horas y 300mg de clindamicina cada 8 horas. Para el control del dolor y del edema se suministró Nimesulide, una dosis de 100 mg al final de la intervención, y otra, 12 horas después, durante 3 días, acorde a la necesidad, máximo dos veces al día.

Los pacientes tuvieron un estricto control de biopelícula en la zona durante las primeras 2 semanas por medio de enjuagues con solución oxoral por 2 minutos dos veces al día, el uso de pasta dental TEBODONT® y la limpieza dental con cepillo curaprox surgical®.

Para controlar el proceso de curación, se programaron revisiones semanales durante el primer mes y transcurrido este tiempo fueron quincenales. Seis meses después de la intervención, se realizaron estudios de tomografías, mediciones clínicas y toma de muestras de saliva a los pacientes de ambos grupos.

#### **IV.4.4 Evaluación de los parámetros clínicos**

Para conocer en estado periodontal, se realizó la medición de profundidad del surco gingival, determinación de movilidad dental, evaluación radiográfica y determinación de DMO y del área de lesión.

##### **IV.4.4.1 Profundidad del surco gingival**

Para ello, se usó la sonda periodontal recomendada por la OMS, la cual está particularmente diseñada para una manipulación suave de los tejidos blandos ubicados alrededor de la pieza dentaria. La sonda presenta una porción codificada, la cual debe usarse con una fuerza suave para determinar la profundidad de la bolsa y para detectar la presencia de cálculo subgingival. Esta presión no debe ser mayor de 20 gramos.

La sonda se introduce entre el diente y la encía, lo más paralelamente posible a la superficie de la raíz. La profundidad del surco gingivodentario se determina observando la marca, al nivel del margen gingival. El extremo de la sonda debe mantener el contacto con la superficie de la raíz.

Los sitios recomendados para el sondaje son el mesial y el distal en las superficies vestibular y punto medio de la superficie palatina/lingual.

Se procede a determinar la profundidad de las bolsas desde el LAC en las partes mesiales, vestibulares, distales y linguales de cada uno de los 6 dientes en evaluación.

Si el margen gingival está sobre el esmalte, se registra:

1. La distancia desde el margen libre gingival hasta el límite amelocementario.
2. La distancia desde el margen libre gingival hasta el fondo de la bolsa.

La medición 1 se resta de la 2 y se obtiene así la medida de la distancia desde el LAC hasta el fondo de la bolsa.

Si el margen gingival está sobre el cemento, el valor desde el LAC hasta el fondo de la bolsa se mide directamente.

#### IV.4.4.2 Movilidad dental

La movilidad dental se mide de la siguiente forma empleando dos instrumentos metálicos y aplicando presión en sentido vestíbulo-lingual. El grado de movilidad se determina de acuerdo con la observación clínica (Cuadro IV.4.4.2).<sup>109</sup>

Cuadro IV.4.4.2 Criterios para determinar la movilidad dental.

Grado	Observación clínica
0	Movilidad fisiológica, 0.1-0.2 mm en dirección horizontal.
1	Movimiento hasta 1 mm en sentido horizontal.
2	Movimiento de más de 1 mm en sentido horizontal.
3	Movimiento en sentido horizontal y en sentido vertical.

#### **IV.4.4.3 Evaluación radiográfica y determinación de la DMO**

Para evaluar los tejidos duros desde el punto de vista radiográfico, fue necesario buscar cambios radiográficos que están asociados con patología ósea periodontal, como son: pérdida de la continuidad (radiopacidad) de las corticales y crestas óseas, pérdida de la altura ósea y formación de defectos óseos, ensanchamiento del espacio del ligamento periodontal, radiolucidez en zona apical y de furcación. Cabe señalar que la distancia normal de la cresta ósea hasta la CEJ es de +/- 2 mm.<sup>110</sup>

El patrón de pérdida ósea puede ser horizontal o vertical. La severidad de la pérdida ósea puede ser estimada dividiendo en tercios la distancia desde la CEJ hasta el ápice del diente así: 1/3 cervical (leve), 1/3 medio (moderada) y 1/3 apical (severa).

Para la determinación de la DMO, se realizó mediante el software DrD3Diagnostic, con el cual se realizaron cortes de 5 cm<sup>3</sup> para visualizar la zona con el defecto óseo vertical. Posteriormente, se señaló el área de la lesión y se realizó la medición de la densidad en zonas de 0.3mm<sup>3</sup>. El puntaje total para la DMO es la media de todas las áreas examinados.

Además, se realizó un corte en la parte más profunda del defecto y con la herramienta proporcionada por el software, se realizó la medición del área.

#### **IV.4.5 Evaluación de marcadores de EOx y actividad de enzimas antioxidantes**

Se realizó la determinación de LPO, SOD y AOX en las muestras de saliva de los pacientes de ambos grupos, tanto basales como 6 meses posterior a la intervención quirúrgica.

#### IV.4.5.1 Determinación de lipoperóxidos

Se empleó la técnica de peroxidación lipídica por el método colorimétrico del ácido tiobarbitúrico (TBA). Esta técnica utiliza el malonaldehído (MDA) como marcador de lipoperoxidación, mediante una reacción con TBA el cual forma un pigmento de color rosa que se mide a 535 nm. La formación del complejo TBA-MDA por eliminación de oxígeno se favorece por la adición de butiril-hidroxitolueno (BHT). Se adicionan 10 mL de BHT (2 mmol) por ml de muestra en caso de que ésta no se vaya a ensayar inmediatamente, para prevenir la auto-oxidación.

El método utilizado se basa en el análisis realizado por Jentzsch en 1996 en relación con el MDA en fluidos corporales humano.<sup>111</sup>

Para iniciar, se marcan tubos de vidrio, ocho para la curva estándar y el resto para las muestras a medir. Se colocan 400 µL de muestra a las cuales se agregan 50 µL de BHT 12.6 mM y 400 µL de ácido ortofosfórico 0.2 mol/L consecutivamente, se mezclan y se agitan en vórtex por 10 segundos.

Posteriormente, se adicionan 50 µL de TBA 0.11mol/L, se mezclan y agitan en vórtex por 10 segundos, se tapan los tubos y se colocan en un baño de agua a 90°C por 45 minutos.

Cuidadosamente se sacan los tubos del baño y se colocan en hielo, una vez fríos, se agregan a cada tubo 1,200 µL de butanol y 100 µL de solución saturada de cloruro de sodio. Se mezclan en el vórtex por 10 segundos y se centrifugan a 4,200 x g durante 1 minuto.

Finalmente, se extrae el sobrenadante y se lee contra blanco de butanol a 535 nm y a 572 nm para hacer corrección de lectura por presencia de aductos coloridos que se forman durante la reacción y se calcula la diferencia.

La concentración de lipoperóxidos se calcula al interpolar en la curva estándar construida cantidades crecientes de la sustancia patrón que es el 1,1,3,3-tetrametoxipropeno (TMP). Para la curva se preparan las siguientes soluciones:

TMP 1 mM: se diluyen 17  $\mu$ L de TMP en 100 ml de agua destilada (solución madre preparada en función del peso molecular del TMP)

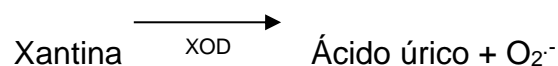
TMP 0.2 mM: se toma 1 ml de TMP 1 mM y se añaden a 4 ml de agua bidestilada (se prepara cada vez que se usa).

Se preparan ocho tubos de concentraciones crecientes como se presenta a continuación y se le da el mismo tratamiento que a las muestras.

Tubo	TMP ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O (mL)	MDA ( $\mu$ mol/L)
1	0	1.000	0
2	5	0.995	0.2
3	10	0.990	0.4
4	20	0.980	0.8
5	30	0.930	1.2
6	50	0.950	2.0
7	70	0.930	2.8
8	100	0.900	4.0

#### IV.4.5.2 Determinación de SOD

En la cuantificación de la actividad de SOD se empleó el kit comercial Ransod superóxido dismutasa (Randox Laboratorios Ltd, UK) que se basa en el empleo de xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar el radical superóxido.

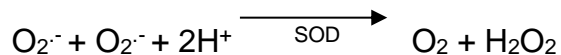


Los radicales superóxido formados reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-

nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo.



Se mide la actividad de la enzima superóxido dismutasa por el grado de inhibición de la reacción:



Procedimiento: Se toman 400  $\mu\text{L}$  de muestra de saliva y se colocan en cubetas especiales para el equipo automatizado Selectra Jr.

#### IV.4.5.3 Determinación de la actividad antioxidante total

Para la determinación de la actividad antioxidante total (AOx) se empleó un kit comercial (Total antioxidant status, Randox Laboratories Ltd, UK). El análisis del estado de los antioxidantes totales, se trata de una prueba en donde se combinan la peroxidasa (metamioglobina) con peróxido de hidrógeno y ABTS (2,2'-azido-di etilbenzotiazolin sulfonato) para dar como resultado la formación del radical catión  $\text{ABTS}^+$ . Este radical presenta una coloración verde azulada, la presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración, siendo ésta proporcional a la concentración de antioxidantes.

Procedimiento: Se pipetea 400  $\mu\text{L}$  de muestra de saliva y se colocan en cubetas especiales para el equipo automatizado Selectra Jr.

#### IV.4.6 Evaluación de marcadores de inflamación crónica

Se utilizó citometría de flujo para conocer los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL8, IL-10 y TNF- $\alpha$ , con estuche comercial de BD.

##### Preparación de los estándares.

Para ello, se realizan diluciones seriadas en el siguiente orden 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256. Transfiriendo 300  $\mu$ L de la solución madre a los siguientes tubos.

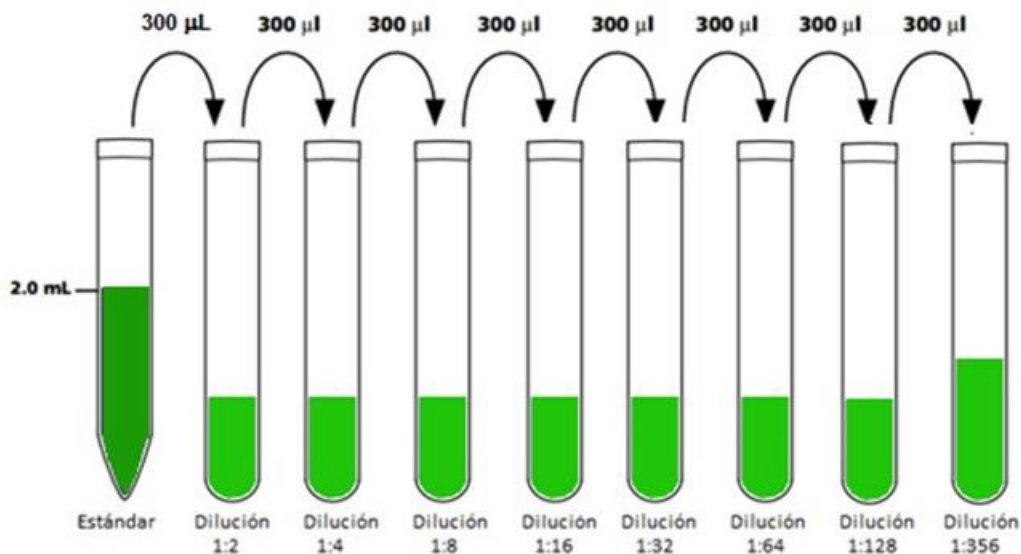


Figura IV.4.6.1 Preparación de diluciones a partir del estándar de Human Inflammatory Cytokine.

##### Preparación de la muestra

Se colocan 25  $\mu$ L de muestra de saliva en tubos de ensayo y se adicionan 25  $\mu$ L de mezcla de perlas de captura, las cuales han sido vigorosamente agitadas. Se incuban durante 1.5 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Una vez transcurrido el tiempo, se adicionan 500  $\mu$ L de Wash Buffer a cada tubo de ensayo y se centrifuga a 200 x g durante 5 minutos.



Aspirar cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo y desecharlo, dejando aproximadamente 50  $\mu$ L de líquido en cada tubo.

Posteriormente adicionar 25  $\mu$ L de Human Inflammatory Cytokine PE Detection Reagent a cada tubo de ensayo, agitar suavemente hasta resuspender el botón e incubar durante 1.5 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Al término de este lapso, adicionar 500  $\mu$ L de Wash Buffer a cada tubo de ensayo y centrifugar a 200 x g durante 5 minutos.

Finalmente, aspirar cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo, desecharlo y agregar 150  $\mu$ L de Wash Buffer a cada tubo de ensayo hasta resuspender el botón para que así la muestra pueda ser adquirida en citómetro de flujo. El análisis de datos se realiza mediante el uso de FCAP Array software.

## **IV.5 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando medidas descripción, promedio y desviación estándar (DE); como pruebas de comparación se realizó una U-Mann Whitney. Para todas las pruebas se consideró un valor de  $p < 0.05$  como significancia estadística. Para tal efecto, se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS versión 20.0

## V. Resultados

En el Cuadro V.1 se presentan las características clínicas individuales de la población de estudio, donde se observa que la mayoría de los sujetos son hombres y el promedio de edad de los pacientes es de  $59 \pm 5.1$  años. En este sentido, el cambio de la densidad mineral ósea no muestra diferencias relativas a edad y sexo después del tratamiento con DPMSC.

Asimismo, en el análisis grupal de los datos, se puede apreciar que tanto el grupo al cual se le colocó colágena más DPMSC (con DPMSC) como el grupo al que únicamente se le colocó colágena (sin DPMSC) mostraron un incremento en la densidad mineral ósea, sin embargo, el aumento en el grupo con DPMSC es de casi dos veces más respecto al grupo sin células (con DPMSC,  $142.4 \pm 82.01$  vs. sin DPMSC,  $50.2 \pm 63.55$  UH) con una significancia estadística limítrofe ( $p=0.09$ ). De igual forma, en cuanto a la profundidad del surco gingival (PSG), se observó una mejoría clínica estadísticamente significativa en el grupo con DPMSC en comparación al grupo al que no se les colocaron células (con DPMSC,  $3.32 \pm 0.28$  vs. sin DPMSC,  $1.80 \pm 0.56$  mm,  $p<0.001$ ) (Cuadro V.2).

En cuanto al grado de movilidad dental, el 100% de los pacientes del grupo con DPMSC y del grupo sin DPMSC dejaron de tener movilidad grado III, no obstante, el 72% del primer grupo cambió de grado III a grado I, en contraste del 40% observado en el grupo al que no se les injertaron DPMSC (Cuadro V.2).

Por otra parte, en la Figura V.1. se muestra la imagen tomográfica y radiológica de un caso de un paciente del grupo con DPMSC y otro del grupo sin DPMSC en donde observa un relleno tipo óseo más evidente clínicamente en el primero respecto al segundo.

En cuanto a los marcadores de estrés oxidante en saliva, en el cuadro V.3 se pueden apreciar de forma individual los niveles de antioxidantes totales (AOx), superóxido dismutasa (SOD) y lipoperóxidos (LPO) de todos los pacientes. En

donde se observa que en la mayoría de los sujetos pertenecientes al grupo al cual se les colocó las DPMSC hay un aumento en AOX y SOD, de manera contraria a lo que se aprecia con el grupo a quienes no se les colocaron DPMSC. En cuanto a los LPO, podemos notar que en casi todos los casos hay una disminución de este parámetro en el grupo con DPMSC, mientras que en el grupo sin DPMSC sólo en algunos cuantos (Cuadro V.3).

De igual forma, en el cuadro V.4 se presenta la comparación de los mismos marcadores, pero por grupo de intervención, donde se observa que después del tratamiento con DPMSC existe un aumento estadísticamente significativo de la SOD (basal,  $1.49 \pm 0.96$  vs. postratamiento,  $2.14 \pm 1.12$  U/L,  $p < 0.05$ ).

Finalmente, con relación al efecto de las DPMSC sobre la concentración de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10, se observó que al grupo al cual se les colocaron DPMSC tuvo una disminución en la IL-1 $\beta$  (basal,  $1001.91 \pm 675.5$  vs. postratamiento,  $722.3 \pm 349.4$  pg/mL,  $p < 0.05$ ) y que la IL-6 también aumentó al injertar las DPMSC (basal,  $11.31 \pm 5.7$  vs. postratamiento,  $28.06 \pm 18.43$  pg/mL,  $p = 0.06$ ) (Cuadro V.5).

**Cuadro V.1. Características clínicas individuales de la población.**

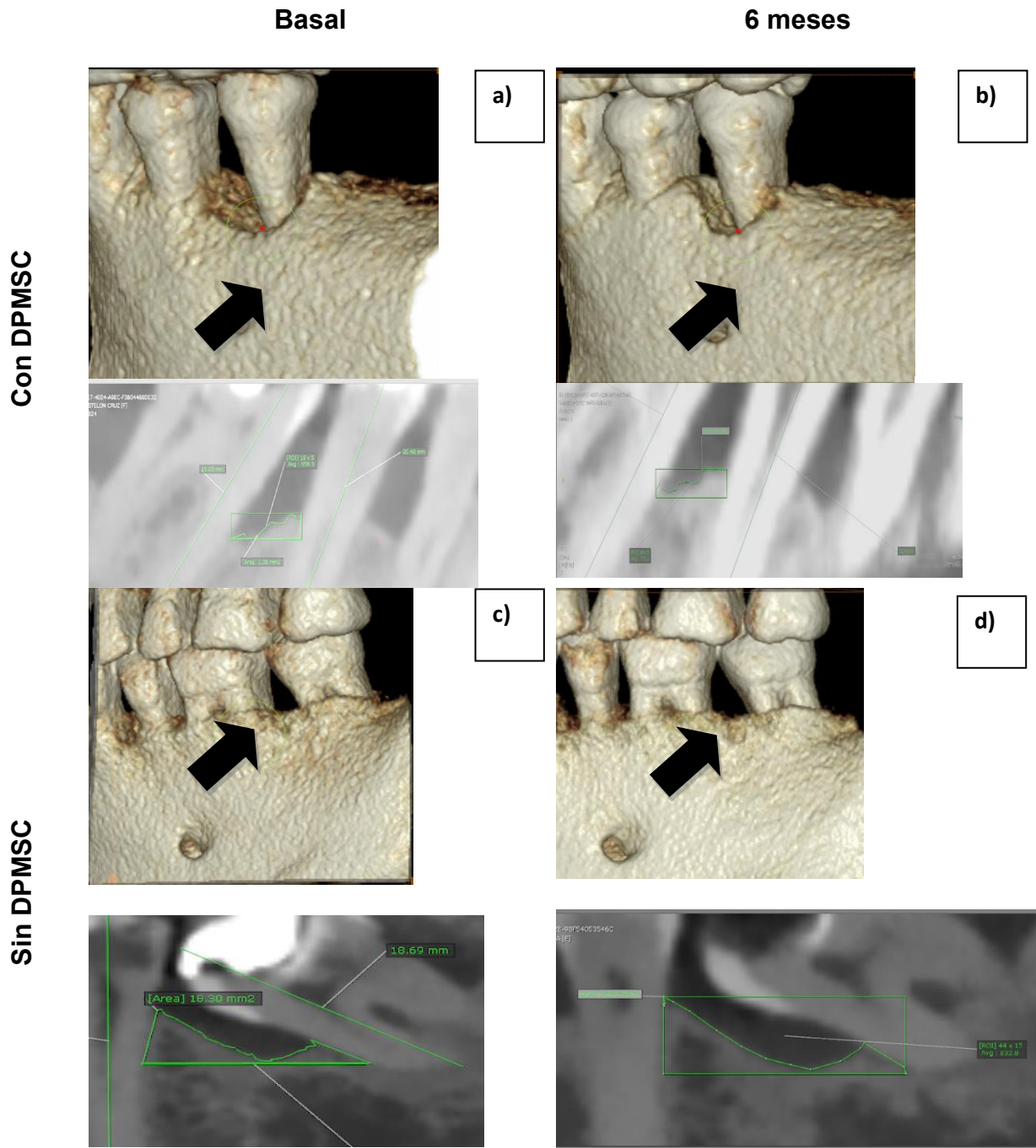
	Edad (años)	Sexo n (%)	DMO basal (UH)	DMO 6 meses (UH)	Diferencia de DMO (UH)	PSG basal (mm)	PSG 6 meses (mm)	Diferencia de PSG (mm)
<b>Con DPMSC (n=11)</b>								
<b>Caso 1</b>	62	Hombre	695.90	835.13	<b>139.23</b>	5.9	2.1	<b>-3.8</b>
<b>Caso 2</b>	50	Hombre	636.06	667.80	<b>31.74</b>	5.3	2.4	<b>-2.9</b>
<b>Caso 3</b>	63	Mujer	801.60	862.73	<b>61.13</b>	5.4	2.5	<b>-2.9</b>
<b>Caso 4</b>	62	Hombre	650.40	763.30	<b>112.90</b>	5.3	2.1	<b>-3.2</b>
<b>Caso 5</b>	60	Hombre	212.80	507.61	<b>294.81</b>	5.7	2.2	<b>-3.5</b>
<b>Caso 6</b>	64	Mujer	797.35	984.90	<b>187.55</b>	6.0	2.5	<b>-3.5</b>
<b>Caso 7</b>	54	Hombre	528.95	694.85	<b>165.90</b>	5.0	1.9	<b>-3.1</b>
<b>Caso 8</b>	50	Mujer	723.10	964.40	<b>241.30</b>	5.5	2.3	<b>-3.2</b>
<b>Caso 9</b>	58	Mujer	844.60	892.00	<b>47.40</b>	5.8	2.2	<b>-3.6</b>
<b>Caso 10</b>	63	Hombre	462.97	536.07	<b>73.10</b>	6.5	2.9	<b>-3.6</b>
<b>Caso 11</b>	64	Hombre	673.30	885.10	<b>211.80</b>	5.9	2.7	<b>-3.2</b>
<b>Media</b>	59.1	H=7 (64) M=4 (36)	638.821	781.263	<b>142.442±82.01</b>	5.66	2.34	<b>-3.32±0.28</b>
<b>Sin DPMSC (n=10)</b>								
<b>Caso 1</b>	65	Hombre	663.41	715.55	<b>52.14</b>	6.0	4.2	<b>-1.8</b>
<b>Caso 2</b>	65	Hombre	683.30	662.40	<b>-20.90</b>	6.0	3.8	<b>-2.2</b>
<b>Caso 3</b>	63	Hombre	414.66	571.30	<b>156.64</b>	5.4	3.7	<b>-1.7</b>
<b>Caso 4</b>	62	Hombre	702.63	631.83	<b>-70.80</b>	5.3	3.2	<b>-2.1</b>
<b>Caso 5</b>	54	Hombre	809.60	862.73	<b>53.13</b>	5.1	4.4	<b>-0.7</b>
<b>Caso 6</b>	50	Mujer	409.30	490.10	<b>80.80</b>	5.9	3.0	<b>-2.9</b>
<b>Caso 7</b>	64	Hombre	658.40	700.50	<b>42.10</b>	4.9	3.2	<b>-1.7</b>
<b>Caso 8</b>	53	Mujer	774.96	849.40	<b>74.44</b>	5.8	3.7	<b>-2.1</b>
<b>Caso 9</b>	58	Mujer	625.75	753.15	<b>127.40</b>	5.6	4.0	<b>-1.6</b>
<b>Caso 10</b>	63	Hombre	462.97	470.64	<b>7.67</b>	5.8	4.6	<b>-1.2</b>
<b>Media</b>	59.7	H=7 (70) M=4 (40)	620.498	670.760	<b>50.262±63.55</b>	5.58	3.78	<b>-1.80±0.56</b>

Se muestran medias  $\pm$  desviaciones estándar. DMO: densidad mineral ósea; UH: unidades Hunsfield; PSG: profundidad de surco gingival; DPMSC: células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental; H: hombres, M: mujeres.

**Cuadro V.2. Efecto de las DPMSC sobre los parámetros clínicos por grupo de tratamiento.**

Parámetro	Con DPMSC (n=11)			Sin DPMSC (n=10)			p
	Basal	6 meses	Diferencia de DMO (UH)	Basal	6 meses	Diferencia de PSG (mm)	
<b>Densidad mineral ósea (UH)</b>	638.82 ± 181.7	781.26 ± 162.2	142.442±19.5	620.49 ± 143.5	670.76 ± 134.4	50.262±9.1	0.098
<b>Profundidad del surco gingival (mm)</b>	5.66 ± 0.41	2.34 ± 0.29*	-3.32±0.12	5.58 ± 0.38	3.78 ± 0.53	-1.80±0.15	0.001
<b>Movilidad dentaria</b>							
<b>Grado III (%)</b>	10 (90)	0 ( 0)		7 (70)	0 ( 0)		
<b>Grado II (%)</b>	1 (10)	3 (27)		3 (30)	6 (60)		
<b>Grado I (%)</b>	0 ( 0)	8 (73)		0 ( 0)	4 (40)		

Los valores muestran la media ± desviación estándar. Prueba U-Mann Whitney y Wilcoxon, \*p<0.05.  
DPMSC: células troncales derivadas de pulpa dental; UH: unidades Hunsfield.



**Figura V. 1** Se observa el hueso alveolar en una tomografía volumétrica tipo *cone bean* (superior) y la medición del área en una radiografía (inferior) en el grupo al que se les injertó DPMSC de manera basal (a) y después del tratamiento. Se contrasta con un paciente del grupo al que no se les colocaron DPMSC en su momento basal (c) y post-tratamiento (d). El cuadro señala el área de hueso basal (2.98mm<sup>2</sup>) y pos-tratamiento (3.35mm<sup>2</sup>).

**Cuadro V.3 Marcadores de estrés oxidante en saliva previos a la colocación de DPMS y 6 meses posterior a ello.**

	Edad (años)	Sexo n (%)	AOx basal (mmol/L)	AOx post (mmol/L)	Diferencia de AOx (mmol/L)	SOD basal (U/L)	SOD post (U/L)	Diferencia de SOD (U/L)	LPO basal (µmol/L)	LPO post (µmol/L)	Diferencia de LPO (µmol/L)
<b>Con DPMS (n=11)</b>											
C 1	62	H	0.63	0.90	<b>0.27</b>	2.01	2.34	<b>0.33</b>	0.08	0.03	-0.05
C 2	50	H	0.63	0.60	<b>-0.03</b>	1.16	3.63	<b>2.47</b>	0.05	0.13	0.08
C 3	63	M	0.60	0.69	<b>0.09</b>	0.45	1.05	<b>0.60</b>	0.06	0.04	-0.02
C 4	62	H	0.28	0.62	<b>0.34</b>	0.55	1.01	<b>0.46</b>	0.07	0.02	-0.05
C 5	60	H	0.77	1.17	<b>0.40</b>	2.21	2.91	<b>0.70</b>	0.09	0.02	-0.07
C 6	64	M	0.45	0.61	<b>0.16</b>	2.29	1.53	<b>-0.76</b>	0.12	0.04	-0.08
C 7	54	H	0.32	0.43	<b>0.11</b>	1.64	2.10	<b>0.46</b>	0.08	0.03	-0.05
C 8	50	M	0.74	1.28	<b>0.54</b>	2.91	3.97	<b>1.06</b>	0.10	0.04	-0.06
C 9	58	M	1.02	0.34	<b>-0.68</b>	0.43	1.45	<b>1.02</b>	0.04	0.09	0.05
C 10	63	H	0.67	0.53	<b>-0.14</b>	0.25	0.58	<b>0.33</b>	0.11	0.07	-0.04
C 11	64	H	0.47	1.16	<b>0.69</b>	2.52	2.97	<b>0.45</b>	0.07	0.02	-0.05
<b>Media</b>	<b>59.1</b>	<b>H=7 (64) M=4 (36)</b>	<b>0.598</b>	<b>0.757</b>	<b>0.159±0.35</b>	<b>1.493</b>	<b>2.14</b>	<b>0.647±0.73</b>	<b>0.079</b>	<b>0.048</b>	<b>-0.031±0.04</b>
<b>Sin DPMS (n=10)</b>											
C 1	65	H	0.44	0.37	<b>-0.07</b>	0.69	0.77	<b>0.08</b>	0.04	0.05	<b>0.01</b>
C 2	65	H	0.44	0.20	<b>-0.24</b>	2.19	1.10	<b>-1.09</b>	0.05	0.08	<b>0.03</b>
C 3	63	H	0.45	1.24	<b>0.79</b>	2.01	2.10	<b>0.09</b>	0.06	0.01	<b>-0.05</b>
C 4	62	H	0.59	0.07	<b>-0.52</b>	1.81	0.42	<b>-1.39</b>	0.02	0.05	<b>0.03</b>
C 5	54	H	1.06	1.38	<b>0.32</b>	0.56	0.59	<b>0.03</b>	0.14	0.13	<b>-0.01</b>
C 6	50	M	0.57	0.73	<b>0.16</b>	1.17	1.58	<b>0.41</b>	0.03	0.01	<b>-0.02</b>
C 7	64	H	0.62	0.41	<b>-0.21</b>	2.06	1.18	<b>-0.88</b>	0.07	0.10	<b>0.03</b>
C 8	53	M	0.60	0.61	<b>0.01</b>	1.25	1.79	<b>0.54</b>	0.10	0.09	<b>-0.01</b>
C 9	58	M	0.80	1.24	<b>0.44</b>	0.22	0.48	<b>0.26</b>	0.11	0.03	<b>-0.08</b>
C 10	63	H	0.34	0.15	<b>-0.19</b>	1.80	0.99	<b>-0.81</b>	0.05	0.06	<b>0.01</b>
<b>Media</b>	<b>59.7</b>	<b>H=7 (70) M=4 (40)</b>	<b>0.591</b>	<b>0.640</b>	<b>0.049±0.36</b>	<b>1.376</b>	<b>1.10</b>	<b>-0.276±0.65</b>	<b>0.067</b>	<b>0.061</b>	<b>-0.006±0.03</b>

AOx: Actividad Antioxidante Total; SOD: Superóxido dismutasa; LPO: Lipoperóxidos; DPMS: células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental; H: hombres, M: mujeres.

Cuadro V.4 Marcadores de estrés oxidante en saliva previos a la colocación de DPMSC y 6 meses posterior a ello.

Marcador	Con DPMSC			Sin DPMSC			Valor de <i>p</i>
	Basal	6 meses	Diferencia	Basal	6 meses	Diferencia	
<b>AOX (mmol/L)</b>	0.598 ± 0.21	0.757 ± 0.32	<b>0.159 ± 0.35</b>	0.591 ± 0.29	0.640 ± 0.49	<b>0.049 ± 0.36</b>	0.618
<b>SOD (U/L)</b>	1.49 ± 0.96	2.14 ± 1.12*	<b>0.647 ± 0.73</b>	1.386 ± 0.70	1.100 ± 0.57	<b>-0.276 ± 0.65</b>	0.047
<b>LPO (µmol/L)</b>	0.0791 ± 0.02	0.0448 ± 0.35	<b>-0.031 ± 0.04</b>	0.0677 ± 0.03	0.0610 ± 0.03	<b>-0.006 ± 0.03</b>	0.225

Los valores muestran la media ± desviación estándar. Prueba U-Mann Whitney, \**p*<0.05. DPMSC: células troncales derivadas de pulpa dental; AOX: Actividad Antioxidante Total; SOD: Superóxido dismutasa; LPO: Lipoperóxidos.



**Cuadro V.5. Concentraciones de citocinas proinflamatorias (pg/mL) en muestras de saliva previos a la colocación de DPMSC y 6 meses posterior a ello.**

Marcador	Con DPMSC		Sin DPMSC		Valor de p
	Basal	6 meses	Basal	6 meses	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	8.91 $\pm$ 3.04	7.66 $\pm$ 3.37	9.276 $\pm$ 5.98	7.80 $\pm$ 5.78	0.844
<b>IL-6</b>	11.31 $\pm$ 5.76	28.06 $\pm$ 18.43	20.13 $\pm$ 15.57	22.43 $\pm$ 18.40	0.067
<b>IL-1 <math>\beta</math></b>	1001.91 $\pm$ 657.53	722.30 $\pm$ 349.45*	1238.18 $\pm$ 779.95	1543.92 $\pm$ 827.15	0.039
<b>IL-10</b>	2.92 $\pm$ 0.91	2.80 $\pm$ 0.48	2.62 $\pm$ 0.61	3.36 $\pm$ 0.56	0.268
<b>IL-8</b>	1270.92 $\pm$ 670.64	1145.72 $\pm$ 805.99	1497.27 $\pm$ 1339.83	827.27 $\pm$ 632.15	0.417

Los valores muestran la media  $\pm$  desviación estándar. Prueba U-Mann Whitney, \*p<0.05. DPMSC: células troncales derivadas de pulpa dental; IL: Interleucina; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.

## VI. Discusión

La EP es consecuencia de una respuesta inmunológica exacerbada que genera el organismo ante la acumulación excesiva de bacterias Gram negativas.<sup>112</sup> Durante la fase aguda de la EP, la presencia de bacterias y sus productos atraen a macrófagos, leucocitos y neutrófilos al área de infección. Éstos últimos contienen enzimas como la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa para producir especies reactivas de oxígeno (EROs) que actúen contra los patógenos.<sup>113, 114</sup>

Bajo condiciones normales, los mecanismos antioxidantes protegen a los tejidos del daño por las EROs. Sin embargo, si la capacidad antioxidante del organismo es insuficiente, se produce el estrés oxidante (EOx) que es un desbalance entre EROs y antioxidantes a favor a de los primeros, que provocan daño tisular.<sup>115</sup>

El EOx provoca la oxidación de enzimas importantes, estimula la liberación de citocinas proinflamatorias, la peroxidación lipídica y el daño al ADN y a las proteínas. Estos mecanismos afectan a los tejidos gingivales, al ligamento periodontal, al cemento radicular y al hueso alveolar que sostienen al diente.<sup>116, 117</sup>

La degradación directa o indirecta de la colágena de la sustancia fundamental en la EP, es el resultado de la activación de las proteasas. Por otra parte, se estimula la liberación de citocinas pro-inflamatorias de manera desproporcionada a través de la activación de NF-kB y la producción de PG-E<sub>2</sub> mediante la peroxidación lipídica y la liberación de superóxido, lo cual se relaciona con la resorción ósea.<sup>118</sup>

Con la finalidad de controlar estos eventos y recuperar el tejido perdido, se han propuesto varias terapéuticas, entre ellas, el trasplante de algún tipo de MSC como las DPMSC. El injerto con DPMSC podría ser una buena estrategia para tratar la EP porque son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia las células necesarias para reparar el tejido y pueden dirigirse al área del tejido inflamado y secretar citocinas antiinflamatorias que modulan la respuesta del sistema inmune.<sup>119</sup> Además, algunos ensayos preclínicos sugieren que las MSC tienen

potencial antioxidante y, en consecuencia, capacidad de reducir el estrés oxidante que ocurre durante la inflamación en la EP.<sup>120, 121</sup>

A pesar de los resultados prometedores reportados *in vitro* y en modelos animales, son escasas las investigaciones en humanos que sustenten la aplicación clínica.<sup>74, 75, 100, 106</sup> En este sentido, en el presente estudio se muestran resultados del efecto de las DPMSC sobre un andamiaje de colágena para la regeneración de tejidos periodontales en pacientes en proceso de envejecimiento con defectos óseos verticales causados por la EP.

Al respecto, en algunos estudios clínicos se ha sugerido que el efecto terapéutico relativo a la regeneración del tejido periodontal, podría ser detectado a través de imágenes radiográficas y parámetros clínicos.<sup>1, 74, 75, 100, 106</sup> Sin embargo, para valorar los cambios en la densidad mineral ósea (DMO) es conveniente utilizar otros medios de diagnóstico más precisos como la tomografía que nos permite valorar cualitativa y cuantitativamente si el tejido neo-formado es de tipo óseo o conectivo.<sup>122</sup>

En este sentido, en nuestro estudio se observó un aumento de la DMO en el grupo con DPMSC con una tendencia a la diferencia. Asimismo, en el análisis individualizado se puede observar que en aproximadamente el 90% de los casos tratados con DPMSC la DMO aumenta, y de forma global el grupo tratado con células incrementa dos veces más la DMO en comparación con el grupo sin células. Al respecto, la formación de tejido dentro del defecto óseo de nuestros pacientes puede deberse a que las DPMSC se diferencian rápidamente en osteoblastos y endotelocitos,<sup>123</sup> lo cual permite la formación de hueso y de los vasos sanguíneos necesarios para irrigar al tejido neoformado. Además, se ha observado que las DPMSC colocadas en defectos óseos, expresan proteínas morfogénicas óseas 2 (BMP2), que a su vez producen una mayor cantidad de hueso, que posteriormente se mineraliza, tal como lo reportaron Liu *et al.* (2011) y el grupo de Aimetti *et al.* (2014), quienes observaron mediante radiografías que el defecto había sido completamente llenado por un tejido similar al hueso.<sup>124,99</sup>

En cuanto a la profundidad del surco gingival, en nuestro estudio se observó una disminución estadísticamente significativa en el grupo con DPMSC en comparación con el grupo con tratamiento convencional. Lo cual sugiere que las DPMSC propician una proliferación celular que se traduce en un incremento del tejido gingival y por lo tanto su inserción se ubique de manera más coronal. Dicho hallazgo concuerda con diversos estudios preclínicos y con el trabajo de Aimetti *et al.* (2014), quienes describen un caso clínico con un defecto periodontal, tratado mediante células troncales mesenquimales obtenidas de uno de los terceros molares del mismo paciente, donde tras un año de intervención se observó que el nivel de profundidad al sondeo había disminuido y el grado de movilidad dentaria también se había reducido.<sup>99</sup> Ésto es debido a que tanto la regeneración del epitelio del surco gingival, como la formación de tejido óseo propician que la adherencia epitelial se repositone más coronalmente, reduciendo la profundidad del surco gingival tal como lo han señalado Sculean *et al.* (2004), en un estudio con defectos infraóseos en humanos.<sup>125</sup>

En cuanto al análisis radiográfico, en nuestro estudio se observa un aumento en el área del defecto periodontal, lo cual concuerda con diversos ensayos preclínicos y clínicos, quienes reportan que después de 12 semanas de la colocación de diferentes tipos de MSC, radiográficamente se observa una zona radiopaca en la parte coronal del defecto óseo.<sup>74, 75, 100, 106</sup>

Por otra parte, las MSC poseen mecanismos biológicos tanto enzimáticos como no enzimáticos, que ayudan a neutralizar a las especies reactivas de oxígeno y corregir los daños producidos al proteoma y genoma por el EOx, de esta manera, se garantiza un manejo eficiente de éste.<sup>126</sup> Puesto que el EOx está estrechamente relacionado con la EP, en nuestro estudio evaluamos las concentraciones de lipoperóxidos, antioxidantes totales y de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Al respecto, se observó que después de 6 meses de la colocación del injerto de DPMSC hay un incremento estadísticamente significativo de la concentración de SOD en comparación con el grupo que no fue tratado con DPMSC. Lo cual concuerda con otros estudios que han demostrado que las MSC

incrementan los niveles de SOD, apoyando la propuesta del efecto antioxidante de las MSC.<sup>127</sup>

Al respecto, algunos estudios han demostrado que las MSC pueden resistir altos niveles de EOX y a la muerte inducida por éste. Lo cual se relaciona con la reducción en la apoptosis y habilidad de MSC de procesar el peróxido y el peroxinitrito, ya que éste se asocia con que en las MSC se expresan y tienen actividad las enzimas SOD1, SOD2, CAT y GPX1 y un nivel alto de GSx intracelular.<sup>1</sup> Además, las MSC expresan un alto nivel de metionina y de sulfóxido reductasa A. Esta última es una enzima importante para la reparación de proteínas oxidadas y para recuperar los residuos de metionina que actúan como atrapadores de oxidantes.<sup>128</sup>

Si bien, el tratamiento con MSC puede prevenir la disminución de la actividad de SOD, es importante mencionar que tanto la síntesis, como la liberación de SOD por las MSC es regulado sinérgicamente por mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  que previenen el daño tisular.<sup>129, 130</sup> Al respecto, se ha demostrado que la correcta proliferación, migración y maduración de las DPMSC depende de las moléculas que se encuentran en el ambiente y del control genético.<sup>131</sup> La acción combinada de transducción de señales que son inducidas por algunas citocinas, determina que las DPMSC se diferencien hacia un linaje osteogénico.<sup>132, 133</sup> Además, se sabe que altas concentraciones de citocinas proinflamatorias desempeña un papel fundamental en la descomposición del tejido periodontal.<sup>9</sup>

Por otro lado, en un análisis de expresión genética se ha propuesto el efecto predominante del tratamiento con MSC sobre la activación de las vías inflamatorias “normalizando” los niveles de inflamación.<sup>134</sup> En este sentido, en la presente investigación se observó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de IL-1 $\beta$  en el grupo al cual se le colocaron las DPMSC en comparación con el de tratamiento convencional. Esta citocina está estrechamente relacionada con la existencia y severidad de la EP. Esto concuerda con varios estudios que afirman que la IL-1 $\beta$  es sintetizada por varias estirpes celulares del

tejido periodontal y que ocupa una posición central entre los mediadores de la cascada inflamatoria durante la EP.<sup>7, 8, 10</sup>

Por otra parte, si bien los niveles altos de IL-1  $\beta$  se asocian a la EP, también es cierto que de manera temprana la IL-1 $\beta$  induce efectivamente a que las células troncales mesenquimales se diferencien a osteoblastos y el tejido se mineralice.<sup>135</sup> Por lo cual, sería recomendable en futuros estudios, realizar una evaluación a corto plazo después de la colocación de las DPMSC.

También, se ha reportado que después de la administración de MSC, se propicia un microambiente proinflamatorio que cambia a uno anti-inflamatorio al inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias (como TNF- $\alpha$  e IL-6) y regular la permeabilidad endotelial. Estos efectos pueden ser mediados por mecanismos parácrinos que controlan la cascada de inflamación.<sup>136</sup> La IL-6 está implicada en la diferenciación de PDMSC hacia preosteoblastos,<sup>137</sup> por lo cual es posible que intervenga en la regeneración del periodonto.<sup>9, 10</sup> Al respecto, en nuestro estudio, las concentraciones de IL-6 mostraron una disminución con una tendencia a la diferencia en el grupo tratado con DPMSC.

Por otra parte, en nuestra investigación se observó que los pacientes tratados con DPMSC no presentaron signos ni síntomas de rechazo, lo cual concuerda con otros estudios clínicos que señalan que ninguno de los pacientes tuvo efectos adversos al injerto de células troncales mesenquimales, puesto que estas células tienen actividad inmunosupresora, lo cual permite usarlas alogénicamente en el tratamiento de diversas enfermedades.<sup>138, 139</sup> De igual forma, nuestros resultados concuerdan con los del estudio de Feng *et al.* (2010), quienes observaron que los pacientes a quienes se les colocaron células del ligamento periodontal, tuvieron un efecto benéfico sobre los defectos periodontales y tuvieron una cicatrización sin complicaciones de la encía durante las primeras 3 semanas.<sup>75</sup>

Lo anterior puede estar relacionado con el hecho de que las MSC suprimen la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, células B y natural killer.<sup>134</sup> También inducen la proliferación de células T reguladoras (Tregs) CD4/CD25, cuando son

co-cultivadas con células mononucleares sanguíneas, y pueden activar macrófagos e influir para que se diferencien hacia un inmunofenotipo antiinflamatorio.<sup>140-143</sup>

La capacidad inmunomoduladora de las MSC es una propiedad que se aprovecha para el tratamiento de enfermedades relacionadas con inflamación, como el caso de la EP, porque pueden regular tanto la respuesta inmune innata como adaptativa.<sup>144-146</sup>

Algunos estudios sugieren que las MSC pueden inhibir la activación linfocitos T, células natural killer y de células dendríticas,<sup>147</sup> y que las células dendríticas tipo 1 son inducidas por las MSC para que reduzcan la secreción de TNF- $\alpha$  y las células dendríticas tipo 2 para que incrementen la secreción de IL-10.<sup>148, 149</sup> Asimismo, las células Th1 reducen la secreción de INF- $\gamma$  y las Th2 incrementen la secreción de IL-4, lo cual induce a un fenotipo de mayor tolerancia inmune.<sup>95, 148, 150</sup>

Las MSC pueden suprimir las reacciones inmunes tanto *in vitro* como *in vivo*, porque expresan bajos niveles de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y no expresan MHC II. Por lo cual se propone que las MSC tienen un “privilegio inmunológico” que les permite ser utilizadas en trasplantes alogénicos sin problemas.<sup>146, 151, 152</sup>

Estudio con MSC autólogas y alogénicas demuestran que éstas producen factores solubles como TGF- $\beta$  y factor de crecimiento de hepatocitos que suprimen la proliferación de linfocitos.<sup>153</sup> En ensayos clínicos incipientes donde utilizan las MSC de forma alogénica, se ha mostrado que tienen una buena tolerancia y que no indujeron respuesta inmune cuando fueron trasplantadas en un receptor no relacionado, tal como se observó en nuestro estudio.<sup>154, 155</sup>

Finalmente, nuestros hallazgos muestran una ventaja terapéutica en la aplicación de células troncales mesenquimales en defectos verticales, neoformación ósea, actividad antioxidante y antiinflamatoria en comparación del tratamiento convencional. Por lo que el tratamiento con DP MSC podría ser una opción

terapéutica más efectiva para la recuperación de tejidos conectivos alrededor del diente, que se han perdido por la EP.



## **VII. Conclusiones**

- Nuestros hallazgos sugieren que el tratamiento con DPMSC tiene un efecto positivo sobre la regeneración ósea en el periodonto en personas en proceso en envejecimiento con EP.
- El tratamiento con DPMSC tiene un efecto antioxidante y antiinflamatorio caracterizado por un incremento en la actividad de la SOD y una disminución de la IL-1 $\beta$  respectivamente.
- Este estudio es pionero en el campo. Si bien, los resultados son positivos, la variabilidad entre individuos indica la necesidad de aumentar el número de muestra.

## **VIII. Perspectivas**

- Es necesario realizar más estudios clínicos con mayor número de sujetos y seguimiento a largo plazo para confirmar nuestros hallazgos y se sustente la utilidad terapéutica de las DPMSC.
- Es recomendable determinar los marcadores biológicos a corto plazo después de la intervención quirúrgica.
- Es conveniente realizar más estudios donde se pueda dar seguimiento clínico y tomográfico a los pacientes para comprobar que el efecto del tratamiento no disminuya en los próximos meses.

---

## IX. Literatura citada

1. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006; 40:11-28.
2. Ortíz-Barrios LB, Granados-García V, Cruz-Hervert P, Moreno-Tamayo K, Heredia-Ponce E, Sánchez-García S. The impact of poor oral health on the oral health-related quality of life (OHRQoL) in older adults: the oral health status through a latent class analysis. *BMC Oral Health*. 2019; 19: 141. doi: 10.1186/s12903-019-0840-3.
3. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53: 55-69.
4. Hajishengallis G. Aging and its Impact on Innate Immunity and Inflammation: Implications for Periodontitis. *J Oral Biosci*. 2014; 56: 30–7.
5. Cohen B. Morphological factors in the pathogenesis of periodontal disease. *Br Dent J*. 1959; 107:31.
6. Dhir S. Biofilm and dental implant: The microbial link. *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17: 5–11.
7. Teles R, Teles F, Frias-López J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000*. 2013; 62: 95–162.
8. Pitaru S1, McCulloch CA, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res*. 1994; 29: 81-94.
9. Ebersole JL, Dawson DR, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, González OA. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontol 2000*. 2013; 62: 163-202
10. Hajishengallis G, Maekawa T, Abe T, Hajishengallis E, Lambrisc JD. Complement involvement in periodontitis: molecular mechanisms and rational therapeutic approaches. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 865: 57–74.
11. Hasan A, Palmer RM. A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. *Br Dent J*. 2014; 216: 457-61.
12. An JY, Darveau R, Kaeberlein M. Oral health in geroscience: animal models and the aging oral cavity. *Geroscience*. 2018; 40: 1-10. doi: 10.1007/s11357-017-0004-9.
13. Ebersole JL, Dawson DA, Emecen Huja P, Pandruvada S, Basu A, Nguyen L et al. Age and Periodontal Health - Immunological View. *Curr Oral Health Rep*. 2018; 5: 229-41. doi: 10.1007/s40496-018-0202-2.
14. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, Dawson D 3rd, Morford LA, Huja PE et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2016; 72: 54-75. doi: 10.1111/prd.12135.
15. Rajendran M, Priyadarshini V, Arora G. Is immunosenescence a contributing factor for periodontal diseases? *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17: 169-74. doi: 10.4103/0972-124X.113064.

16. Curtis MA. Periodontal microbiology--the lid's off the box again. *J Dent Res.* 2014; 93: 840-2. doi: 10.1177/0022034514542469.
17. Zapata HJ, Quagliarello VJ. The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. *J Am Geriatr Soc.* 2015; 63: 776–81.
18. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27: 409–19.
19. Bertoldi C, Lalla M, Pradelli JM, Cortellini P, Lucchi A, Zaffe D. Risk factors and socioeconomic condition effects on periodontal and dental health: A pilot study among adults over fifty years of age. *Eur J Dent.* 2013; 7: 336–46.
20. Mombelli A. Aging and the periodontal and peri-implant microbiota. *Periodontol 2000.* 1998;16: 44–52.
21. Portron S, Soueidan A, Marsden AC, Rakic M, Verner C, Weiss P. Periodontal regenerative medicine using mesenchymal stem cells and biomaterials: A systematic review of pre-clinical studies. *Dent Mater J.* 2019; 38: 867-83. doi: 10.4012/dmj.2018-315.
22. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014; 69: S4–9.
23. Biagi E, Candela M, Turrone S, Garagnani P, Franceschi C, Brigidi P. Ageing and gut microbes: perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacol Res.* 2013; 69: 11–20.
24. Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J.* 2008; 53: 108-21.
25. Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010; 16: 219-55.
26. Magan A, Ripamonti U. Biological aspects of periodontal tissue regeneration: cementogenesis and the induction of Sharpey's fibres. *SADJ.* 2013; 68: 304-6, 308-12, 14.
27. Bartold PM. *Periodontol 2000.* 2010; 53:55-69.
28. Hu J, Cao Y, Xie Y, Wang H, Fan Z, Wang J, et al. Periodontal regeneration in swine after cell injection and cell sheet transplantation of human dental pulp stem cells following good manufacturing practice. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7: 130.
29. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8: 315-7.
30. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006; 441: 1068-74.
31. Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18: 846-58.

32. Bjerknes M, Cheng H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 283: G767-77.
33. Xiao L, Tsutsui T. Human dental mesenchymal stem cells and neural regeneration. *Hum Cell*. 2013; 26: 91-6.
34. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev*. 2013; 9: 32-43.
35. Hyun I. The bioethics of stem cell research and therapy. *J Clin Invest*. 2010; 120:71–5.
36. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 313-9.
37. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001; 19: 180–92.
38. Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int*. 2012; 2012: 461718.
39. Paul G, Özen I, Christophersen NS, Reinbothe T, Bengzon J, Visse E, et al. The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2012; 7: e35577.
40. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Luz-Crawford P, Águila-Díaz C, Fernández A, Figueroa FE, et al. Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6:32.
41. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004; 116: 639-48.
42. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014; 32:1408-19.
43. Hoogduijn MJ, Betjes MG, Baan CC. Mesenchymal stromal cells for organ transplantation: different sources and unique characteristics? *Curr Opin Organ Transpl*. 2014; 19: 41–6.
44. Hernández-Monjaraz B, Santiago-Osorio E, Monroy-García A, Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM. Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: E944. doi: 10.3390/ijms19040944.
45. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 13625-30.
46. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 5807-12.
47. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004; 364: 149-55.

48. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008; 34:166-71.
49. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE.S. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008; 87: 767-71.
50. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol.* 2009; 183: 7787-98.
51. Sun HH, Chen B, Zhu QL, Kong H, Li QH, Gao LN. Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials.* 2014; 35: 9459-72.
52. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005; 8: 191-9.
53. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol.* 2012; 57: 1231-40.
54. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008 Spring; 4(1):21-6.
55. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009; 88: 792-806.
56. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod.* 2009; 35: 1536-42.
57. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81: 531-5.
58. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res.* 2010; 89: 791-6.
59. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 1: 124-31.
60. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2004; 34, 9–21.
61. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006; 38: 306-21.
62. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005; 366(9499): 1809-20.

63. Matthews DC. Prevention and treatment of periodontal diseases in primary care. *Evid Based Dent*. 2014; 15: 68-9. doi: 10.1038/sj.ebd.6401036.
64. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells for Periodontal Tissue Regeneration in Elderly Patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019; 74: 1351-8. doi: 10.1093/gerona/gly227.
65. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol*. 2000. 2004; 34, 9–21.
66. Sensebe L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *VoxSang*. 2010; 98: 93-107.
67. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*. 2013; 101: 121–32.
68. Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Ueda M. Novel cell-free regenerative medicine of bone using stem cell derived factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013; 28: 1009–16.
69. Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18:14779–89.
70. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007; 2648–59.
71. Kawai T, Katagiri W, Osugi M, Sugimura Y, Hibi H, Ueda M. Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2015; 17: 369–81.
72. Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med*. 2016; 12:5.
73. Inukai T, Katagiri W, Yoshimi R, Osugi M, Kawai T, Hibi H, *et al*. Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 430: 763–8.
74. Pérez-Borrego A, Domínguez-Rodríguez L, Iliástigui-Ortueta ZT, Hernández-Ramírez P. Utilización de células madre en el tratamiento de defectos óseos periodontales. *Rev Cub Estomat*. 2009; 46: 108-16.
75. Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH *et al*. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis*. 2010; 16: 20-8.
76. Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K. Periodontal regeneration with multilayered periodontal ligament derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*. 2009; 30, 2716–23.
77. Han J, Menicanin D, Marino V, Ge S, Mrozik K, Gronthos S, *et al*. Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model. *J Periodontal Res*. 2014; 49: 333-45.

78. Yu N, Oortgiesen DA, Bronckers AL, Yang F, Walboomers XF, Jansen JA. Enhanced periodontal tissue regeneration by periodontal cell implantation. *J Clin Periodontol.* 2013; 40: 698-706.
79. Mroziak KM, Wada N, Marino V *et al.* Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. *Regen Med.* 2013; 8: 711-23.
80. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol.* 2009; 219: 667-76.
81. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81: 531-35.
82. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, *et al.* Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int.* 2007; 31: 1191-7.
83. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM *et al.* Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells.* 2008; 26: 1065-73.
84. D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V *et al.* Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009; 18: 75-83.
85. Bright R, Hynes K, Gronthos S, Bartold PM. Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review. *J Periodontal Res.* 2015; 50: 160-72.
86. Ripamonti U, Petit JC. Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20: 489-99.
87. Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z *et al.* Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells.* 2010; 28: 1829-38.
88. Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials.* 2012; 33: 6320-44.
89. Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu NX, Lv X, Li Q *et al.* Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res.* 2015; 361: 439-55.
90. Sundelacruz S, Kaplana DL. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; 20: 646-655. doi: 10.1016/j.semcd.2009.03.017
91. Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials.* 2012; 33: 6320-44.
92. Khorsand A, Eslaminejad MB, Arabsolghar M, Paknejad M, Ghaedi B *et al.* Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. *J Oral Implantol.* 2013; 39: 433-43.
93. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F *et al.* A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living



- autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005; 20: 1394-402.
94. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A *et al.* *In vitro* bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg.* 2006; 17: 511-5.
95. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Proto A, Giuliano MT, Pirozzi G *et al.* Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo. *Cell Prolif.* 2008; 41: 1-11.
96. Brar GS, Toor RS. Dental stem cells: dentinogenic, osteogenic, and neurogenic differentiation and its clinical cell based therapies. *Indian J Dent Res.* 2012; 23: 393-7.
97. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S *et al.* Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003; 82: 976-81.
98. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development.* 2016; 143: 2273-80.
99. Aimetti M, Ferrarotti F, Cricenti L, Mariani GM, Romano F. Autologous dental pulp stem cells in periodontal regeneration: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2014; 34 Suppl 3: s27-33.
100. Carini F, Menchini Fabris GB, Biagi E, Salvade' A, Sbordone L, Baldoni MG. Estudio experimental sobre la utilización de células madre humanas en la terapia de los defectos periodontales: resultados preliminares. *Av Periodon Implantol.* 2011; 23: 97-107.
101. Park JY, Jeon SH, Choung PH. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. *Cell Transplant.* 2011; 20: 271-85.
102. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, *et al.* Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17: 1015-26.
103. Suaid FF, Ribeiro FV, Gomes TR, Silvério KG, Carvalho MD, Nociti FH Jr, *et al.* Autologous periodontal ligament cells in the treatment of Class III furcation defects: a study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2012; 39: 377-84.
104. Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Arzate H, Villalobos C *et al.* Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J Periodontal Res.* 2012; 47: 33-44.
105. Fu X, Jin L, Ma P, Fan Z, Wang S. Allogenic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. *J Periodontol.* 2014; 85: 845-51.
106. Ferrarotti F, Romano F, Gamba MN, Quirico A, Giraudi M, Audagna M, Aimetti M. Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2018; 45: 841-50. doi: 10.1111/jcpe.12931.
107. Yang Y, Yang R, Roth M, *et al.* Genetically transforming human osteoblasts to sarcoma: development of an osteosarcoma model. *Genes Cancer.* 2017; 8: 484-94.

108. Moghadam FH, Tayebi T, Dehghan M, *et al.* Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes after short term culture in alkaline medium. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2014; 8: 12–19.
109. Salvi GE, Lindhe J, Lang NP. Examination of patients with periodontal disease. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical periodontology and implant dentistry.* Blackwell-Munksgaard 5th edition, Oxford UK. 2008: 573-86.
110. Regan JE, Mitchell DF. Roentgenographic and dissection measurements of alveolar crest height. *J Am Dent Assoc.* 1963; 66: 356-9.
111. Jentsch A, Bachmann H, Fürst P, Bielsalski H. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20: 251-56.
112. Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 1985; 12: 648-59.
113. Nizam N, Gümüş P, Pitkänen J, Tervahartiala T, Sorsa T, Buduneli N. Serum and salivary matrix metalloproteinases, neutrophil elastase, myeloperoxidase in patients with chronic or aggressive periodontitis. *Inflammation.* 2014; 37: 1771-8.
114. Syndergaard B, Al-Sabbagh M, Kryscio RJ, Xi J, Ding X, Ebersole JL, Miller CS Salivary biomarkers associated with gingivitis and response to therapy. *J Periodontol.* 2014; 85: e295-303.
115. Greabu M, Totan A, Miricescu D, Radulescu R, Virlan J, Calenic B. Hydrogen Sulfide, Oxidative Stress and Periodontal Diseases: A Concise Review. *Antioxidants (Basel).* 2016; 5: E3.
116. Fredriksson M, Gustafsson A, Asman B, Bergström K. Hyper-reactive peripheral neutrophils in adult periodontitis: generation of chemiluminescence and intracellular hydrogen peroxide after in vitro priming and FcyR stimulation. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 394-8.
117. Alok Sharma, Swati Sharma. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Periodontics: A Review. *Int J Den Clin,* 2011; 3: 44-7
118. Chapple ILC, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol* 2000. 2007; 43: 160-232.
119. Hao L, Sun H, Wang J, Wang T, Wang M, Zou Z. Mesenchymal stromal cells for cell therapy: besides supporting hematopoiesis. *Int J Hematol.* 2012; 95(1): 34-46.
120. Shalaby SM, El-Shal AS, Abd-Allah SH, Selim AO, Selim SA, Gouda ZA *et al.* Mesenchymal stromal cell injection protects against oxidative stress in Escherichia coli-induced acute lung injury in mice. *Cytotherapy.* 2014; 16: 764- 75.
121. Sun T, Gao GZ, Li RF, Li X, Li DW, Wu SS *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates oxidative stress and restores intestinal mucosal permeability in chemically induced colitis in mice. *Am J Transl Res.* 2015; 7: 891-901.

122. Goodarzi Pour D, Romoozi E, Soleimani Shayesteh Y. Accuracy of Cone Beam Computed Tomography for Detection of Bone Loss. *J Dent (Tehran)*. 2015; 12: 513-23.
123. Mangano C, De Rosa A, Desiderio V, d'Aquino R, Piattelli A, De Francesco F *et al*. The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials*. 2010; 31: 3543-51.
124. Liu HC, E LL, Wang DS, Su F, Wu X, Shi ZP *et al*. Reconstruction of Alveolar Bone Defects Using Bone Morphogenetic Protein 2 Mediated Rabbit Dental Pulp Stem Cells Seeded on Nano-Hydroxyapatite/Collagen/Poly(L-lactide). *Tissue Engineering Part A*. 2011, 17: 2417-2433.
125. Sculean A, Stavropoulos A, Windisch P, Keglevich T, Karring T, Gera I. Healing of human intrabony defects following regenerative periodontal therapy with a bovine-derived xenograft and guided tissue regeneration. *Clin Oral Investig*. 2004; 8: 70-4.
126. Valle-Prieto A, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev*. 2010; 19: 1885-93.
127. Silva WA, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL *et al*. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2003; 21: 661–9.
128. Salmon AB, Perez A, Bokov A, Jemigan G, Kim H, Zhao RH *et al*. Lack of methionine sulfoxide reductase A in mice increases sensitivity to oxidative stress but does not diminish life span. *FASEB J*. 2009; 23: 3601–8.
129. Da Costa Gonçalves F, Grings M, Nunes NS, Pinto FO, Garcez TN, Visioli F *et al*. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. *Biotechnol Lett*. 2017; 39: 613-22. doi: 10.1007/s10529-016-2272-3.
130. Kemp K, Hares K, Mallam E, Heesom KJ, Scolding N, Wilkins A. Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival. *J Neurochem*. 2010; 114: 1569–80.
131. Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 844–850.
132. Ohata Y, Ozono K. Bone and Stem Cells. The mechanism of osteogenic differentiation from mesenchymal stem cell. *Clin Calcium*. 2014; 24: 501-8.
133. Dangaria SJ, Ito Y, Luan X, Diekwisch TG. Successful periodontal ligament regeneration by periodontal progenitor preseeding on natural tooth root surfaces. *Stem Cells Dev*. 2011; 20: 1659-68.
134. Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS *et al*. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182: 1047-57.
135. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. Interleukin-1 $\beta$  induces differentiation of human

- mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 3355-63.
136. Tai WL, Dong ZX, Zhang DD, Wang DH. Therapeutic effect of intravenous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation on early-stage LPS-induced acute lung injury in mice. *J South Med Univ.* 2012; 32: 283-90.
137. Nowwarote N, Sukarawan W, Pavasant P, Osathanon T. Basic Fibroblast Growth Factor Regulates REX1 Expression Via IL-6 In Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *J Cell Biochem.* 2017; 118: 1480-8. doi: 10.1002/jcb.25807
138. Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF *et al.* Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis.* 2014; 20: 25-34.
139. Kang YH, Lee HJ, Jang SJ, Byun JH, Lee JS, Lee HC. Immunomodulatory properties and in vivo osteogenesis of human dental stem cells from fresh and cryopreserved dental follicles. *Differentiation.* 2015; 90: 48-58.
140. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; 105: 1815–22.
141. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006; 107: 367–72.
142. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine.* 2007; 262: 509–25.
143. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology.* 2009; 37: 1445–53.
144. Hall SR, Tsoyi K, Ith B, Padera RF, Lederer JA, Wang Z *et al.* Mesenchymal stromal cells improve survival during sepsis in the absence of heme oxygenase-1: The importance of neutrophils. *Stem Cells.* 2013; 31: 397–407.
145. Noël D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma.* 2007; 48: 1283–9.
146. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004; 363: 1439–41.
147. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H *et al.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005; 105: 2214–19.
148. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q *et al.* Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells and Development.* 2004; 13: 263–71.

149. Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X *et al.* Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2 dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*. 2009; 113: 46–57.
150. Batten P, Sarathchandra P, Antoniw JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM *et al.* Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng*. 2006; 12: 2263-73.
151. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6: 435–41.
152. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106: 1755–61.
153. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002; 99: 3838-43.
154. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm*. 2005; 2: 8.
155. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY *et al.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 8932–7.

## X. Anexos

### X. 1 Consentimiento informado de donación



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE LOS DIENTES DE LECHE Y TERCEROS MOLARES

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_  
Domicilio \_\_\_\_\_  
Colonia \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_  
Del. o Municipio \_\_\_\_\_ C.P. \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DEL MEDICO QUE INFORMÓ (DENTCELL) \_\_\_\_\_

Declaro que: Entiendo que las células mesenquimales podrán ser utilizadas para realizar un trasplante autólogo o para algún paciente relacionado que así lo requiera (bajo la previa autorización del donante).

Entiendo que la información referente a mi persona y/o a la de mi hijo/a será tratada de forma confidencial y codificada de forma que quede protegida mi identidad y/o la de mi hijo/a.

Entiendo que mi consentimiento no obliga a DENTCELL a criopreservar las células mesenquimales provenientes de los dientes de leche o terceros molares si se considera que las circunstancias no son idóneas.

Conservo la posibilidad de renunciar a este consentimiento hasta la extracción del diente del paciente.

He leído y comprendido toda la información dada, estoy satisfecho/a de la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído convenientes y me han aclarado todas las dudas planteadas.

En consecuencia doy mi consentimiento para que sean criopreservadas las células mesenquimales dentales, mías y/o de los dientes de mi hijo/a.

Nombre y firma

Nombre y firma

\_\_\_\_\_  
Médico que informó (DENTCELL)

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Padre\*

\_\_\_\_\_  
Madre\*

\*Solo firmar en caso de menores de edad.

CÉLULAS DE CORDÓN UMBILICAL, S.A. DE C.V.  
PARQUE DE OBISPO HO. JR. COL. PARQUE DE LA BARRICA, HIDALGO, ESTADO DE MÉXICO, C.P. 52961, TEL. +52(55)5201 1714 / 01 862 962 9900



Una Esperanza de Vida®



## HISTORIA CLÍNICA

No. Reg:

### Identificación:

Nombre del Paciente: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Tipo de Donación: Autóloga [ ] Alogénica [ ] Procedencia: Extracción [ ] Natural [ ]

**Firma:** \_\_\_\_\_

Acepto otorgar mi consentimiento voluntariamente las células hematopoyéticas más y/o de mi hijo(a)

### Indicadores Geográficos:

Originario de: \_\_\_\_\_ Residencia actual: \_\_\_\_\_

### Antecedentes:

Contacto con enfermos de hepatitis 

SI	NO
----	----

 ¿Quién? \_\_\_\_\_

Alergias 

SI	NO
----	----

Imunizaciones 

SI	NO
----	----

 Tipo: \_\_\_\_\_

Cardiopatías 

SI	NO
----	----

 Diabetes Mellitus 

SI	NO
----	----

Enfermedades Renales 

SI	NO
----	----

 Epilepsia 

SI	NO
----	----

Coagulopatías 

SI	NO
----	----

 Lipidemias frecuentes 

SI	NO
----	----

Cáncer 

SI	NO
----	----

 Hepatitis 

SI	NO
----	----

Neoplasia Hematológica 

SI	NO
----	----

 Ictericia/Acatis/Coluria 

SI	NO
----	----

Anemia 

SI	NO
----	----

 Trastornos mentales 

SI	NO
----	----

Infecciones bacterianas 

SI	NO
----	----

 Trasplante(s) 

SI	NO
----	----

¿Cuándo? \_\_\_\_\_ RH Donante \_\_\_\_\_ Otras \_\_\_\_\_

### En los últimos 6 meses:

Tos/Diñea persistente 

SI	NO
----	----

Pérdida de peso > a 10% 

SI	NO
----	----

Diñea Crónica 

SI	NO
----	----

Aslania/Adinamia 

SI	NO
----	----

### En el último mes:

Ingesta de medicamentos 

SI	NO
----	----

¿Cuál(es) \_\_\_\_\_

Tiempo \_\_\_\_\_

Dosis \_\_\_\_\_

### Exploración física:

Peso \_\_\_\_\_ Altura \_\_\_\_\_

Nombre y Firma Médico \_\_\_\_\_ ¿Se considera apto para donar? 

SI	NO
----	----

CÉLULAS DE CORDÓN UMBILICAL, S.A. DE C.V.

PARQUE DE OBRERA NO. 49 COL. PARQUE DE LA HEREDERA, HERREROS CUAUHTÉMOC DE CALZADA MEXICO, C.P. 03960 TEL. +52(55)5201111/01881818180



Una Esperanza de Vida®



## INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

La pulpa contenida en los dientes de leche y terceros molares, es rica en células mesenquimales, las cuales son utilizadas hoy en día para el tratamiento y regeneración de:

Huesos y tejidos, así como de algunas enfermedades o padecimientos.

Aún cuando las probabilidades de que estas células sean utilizadas en un trasplante son bajas, le brindamos la posibilidad de tenerlas a su alcance en caso de ser requeridas.

El éxito de la criopreservación depende mucho del estado del diente, su traslado a tiempo del mismo y requisición de los documentos necesarios para elaborar el archivo personal, los cuales deberá de leer y entender perfectamente el paciente antes de firmar.

El procedimiento de criopreservación se realiza en varias etapas, la primera de ellas consiste en elaborar el expediente personal, otorgándole un número de identificación único, imperecedero y codificado en nuestro sistema de captura de datos, el cual se mantiene durante el tiempo que permanezcan las células almacenadas en nuestras instalaciones. Posteriormente se procede a evaluar el estado del diente y se comienza con el proceso de esterilización, se rompe el diente para poder extraer la pulpa dental y se inicia con ella un proceso de cultivos.

Días después verificamos que no existan microorganismos que puedan ser perjudiciales para la muestra.

La siguiente etapa del proceso consiste en obtener el volumen necesario de células mesenquimales a través de los cultivos.

Inmediatamente después se transfieren las células a un recipiente especializado para la criopreservación.

La etapa final del proceso consiste en almacenar el recipiente que contiene las células mesenquimales a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ , alimentado con nitrógeno líquido que proporciona esta temperatura para mantener a las células mesenquimales por tiempo indefinido.

CÉLULAS DE CORDÓN UMBILICAL, S.A. DE C.V.

PASEO DE OMBANDA 10, 4º. COL. PARQUE DE LA FLORES, HERRERERÍA, ESTADO DE MÉXICO, CP. 5286, TEL. +52(55)5011141/5016619/5016620





Una Esperanza de Vida®



## FORMATO PARA ENVÍO DE MATERIAL BIOLÓGICO

No. Expediente \_\_\_\_\_

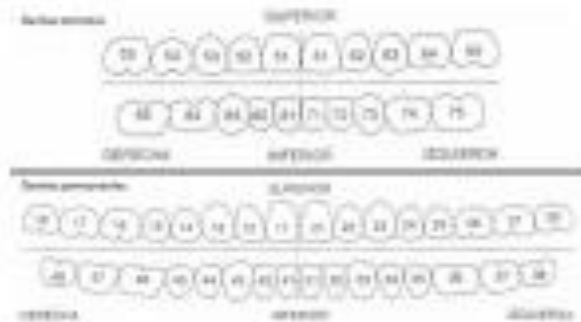
Paciente \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Ciudad \_\_\_\_\_

Fecha y hora de toma de la pieza dental \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ AM PM  
Día Mes Año Hora

No. de pieza(s) dental(es) enviada(s) \_\_\_\_\_

No. de fosa(s) enviada(s) \_\_\_\_\_



El diente fue extraído por un Odontólogo  SI  NO

Nombre del Odontólogo \_\_\_\_\_

E-mail \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Odontólogo Responsable

Nombre y firma

CIVILIA DENTACIÓN SINGULAR S.A. DE C.V.

PROCESO DE ENTREGA DE DIENTES EXTRAÍDOS PARA ANÁLISIS BIOLÓGICO. FOLIO 10 DE 10. REV. 01/2018. TEL: 52-55-5612-1111. WWW.CIVILIA.COM.MX

## X. 2 Consentimiento informado de aceptación de tratamiento



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA



### EFECCIÓN ANTIOXIDANTE DEL TRATAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL EN ADULTOS MAYORES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL. REPORTE DE TRES CASOS

#### Carta de consentimiento informado

##### **Antecedentes**

La pulpa contenida en los dientes de leche es rica en células troncales mesenquimales (coloquialmente llamadas células madre) las cuales son utilizadas para el tratamiento y regeneración de los tejidos que están alrededor de los dientes (periodontales)

##### **Objetivo**

Conocer el efecto de la aplicación de células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental en el tratamiento de enfermedad periodontal.

##### **Condiciones para ingresar al estudio**

- Edad 45 – 64 años, sin distinción del sexo.
- Enfermedad periodontal (defectos óseos verticales moderados)
- Clínicamente sanos o con enfermedades crónico-degenerativas controladas.
- Compromiso para dar seguimiento a 3, 6 y 12 meses después de la cirugía.
- Firmar o poner la huella digital en la carta de consentimiento informado.

##### **Riesgos**

La cirugía periodontal será realizada por personal calificado con material nuevo y desechable. Las células que se colocarán serán proporcionadas por el Banco de Córdon Umbilical donde previamente se les realizaron pruebas para confirmar que están libres de agentes infecciosos.

La colocación de las células podría o no funcionar de acuerdo a las condiciones de cada paciente y a su apego al tratamiento (cuidados postoperatorios, que acuda a sus citas, no fumar, etc.). Dependiendo de esto, en algunos casos, la intervención quirúrgica podría no afectar la historia natural de la enfermedad y que el tejido periodontal del paciente no se regenere y, en consecuencia, llegue a perder la o las piezas dentarias.

##### **Beneficios**

La cirugía periodontal, las células y la tomografía **no tendrán ningún costo** y los resultados de la revisión odontológica serán comunicados al paciente para el control y vigilancia de su estado de salud.

### Confidencialidad

Toda la información obtenida es **ESTRICTAMENTE CONFIDENCIAL**, por lo que sólo se le proporcionará al participante y a su odontólogo tratante.

### Preguntas

Toda duda que tengan los participantes durante el tiempo que de la investigación, la podrán consultar con su odontólogo tratante y con los integrantes del proyecto.

### Derecho a rehusar

La aceptación a participar en este estudio es enteramente **VOLUNTARIA**. Así mismo, puede decidir abandonar el estudio en el momento que usted lo considere conveniente.

### CONSENTIMIENTO

DECLARO QUE HE LEÍDO O ME HAN LEÍDO EN PRESENCIA DE UN FAMILIAR RESPONSABLE EL CONTENIDO DEL PRESENTE DOCUMENTO, COMPRENDIENDO LOS COMPROMISOS QUE ASUMO Y LOS ACEPTO EXPRESAMENTE. POR ELLO, MANIFESTO MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACIÓN CON TÍTULO: **“EFECTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE PULPA, SOBRE LA REGENERACIÓN DEL PERIODONTO EN ADULTOS MAYORES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL”** Y FIRMO VOLUNTARIAMENTE ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

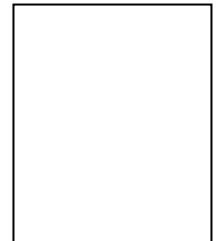
Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos y he recibido una copia de este impreso.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma de un familiar (testigo):

Nombre y firma del investigador:

M. en C. Beatriz Hernández Monjaraz \_\_\_\_\_  
Ciudad de México, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2016.



***En caso de no saber leer y escribir poner huella digital en el cuadro después de haberle leído el documento al participante en presencia del testigo.***

Para cualquier duda o aclaración, puede contactar al responsable del proyecto:

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez. Unidad de Investigación en Gerontología, FES Zaragoza, UNAM. Batalla 5 de mayo s/n, esq. Fuerte de Loreto. Col. Ejército de Oriente, 09230, México, D.F. Teléfono: 56230700, ext. 39182. E-mail: mendovic@servidor.unam.mx

## X.3 Artículos publicados en revistas nacionales e internacionales

Case Report



Journal of International Medical Research  
2018, Vol. 46(7) 2983-2993  
© The Author(s) 2018  
Reprints and permissions:  
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0300060518773244  
journals.sagepub.com/home/imr



### Retrieval of a periodontally compromised tooth by allogeneic grafting of mesenchymal stem cells from dental pulp: A case report

Beatriz Hernández-Monjaraz<sup>1</sup>,  
Edelmiro Santiago-Osorio<sup>2</sup>,  
Edgar Ledesma-Martínez<sup>2</sup>,  
Andrés Alcauter-Zavala<sup>1</sup> and  
Víctor Manuel Mendoza-Núñez<sup>1</sup>

#### Abstract

**Objective:** To report a case of successful allogeneic grafting of mesenchymal dental pulp stem cells (DPSCs) as preliminary findings in a patient with periodontal disease enrolled into clinical trial ISRCTN12831118.

**Methods:** Mesenchymal stem cells from the dental pulp of a deciduous tooth from a 7-year-old donor were separated from the pulp chamber and processed via enzymatic digestion and centrifugation. DPSCs were passaged and cultured on a 35 × 13 mm culture dish in minimum essential medium-alpha, without supplementation. After reaching 80% confluency, 5 × 10<sup>6</sup> allogeneic DPSCs in 250 µl phosphate buffered saline were seeded onto a dry scaffold of lyophilized collagen-polyvinylpyrrolidone sponge placed in the left lower premolar area of a 61-year-old patient with periodontal disease. Surgical access to the lower premolar area was achieved using the flap technique.

**Results:** At 3 and 6 months following allogeneic graft, the patient showed no sign of rejection and exhibited decreases in tooth mobility, periodontal pocket depth and bone defect area. Bone mineral density had increased at the graft site.

<sup>1</sup>Research Unit on Gerontology, FES Zaragoza, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico  
<sup>2</sup>Hematopoiesis and Leukemia Laboratory, Research Unit on Cell Differentiation and Cancer, FES Zaragoza, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

**Corresponding author:**  
Victor Manuel Mendoza-Núñez, Research Unit on Gerontology, Faculty of Higher Studies Zaragoza, National Autonomous University of Mexico, Guetlao No. 66, Col. Ejército de Oriente, 09230 Mexico City, Mexico.  
Email: mendovic@unam.mx

Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

**Conclusions:** Regenerative periodontal therapy using DPSCs of allogeneic origin may be a promising treatment for periodontal disease-induced bone defects.

### Keywords

Periodontitis, tissue regeneration, periodontal treatment

Date received: 30 November 2017; accepted: 5 April 2018

## Introduction

Periodontal disease is a chronic inflammatory condition that is highly prevalent in elderly patients.<sup>1</sup> Disease progression is marked by the destruction of underlying support structures of the teeth, which eventually leads to definitive tooth loss.<sup>1</sup> Periodontal disease has negative effects on digestive, nutritional and glycaemic control in patients with diabetes, and is also associated with an increased incidence of Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis and heart disease.<sup>2</sup> Moreover, periodontal disease is common in pregnant females and may lead to premature birth and a low birth weight.<sup>3</sup> Conventional periodontal disease treatments include changes in hygiene and dietary habits, scaling and root planing, and even flap periodontal surgery. In general, however, these treatments control only the acute phase of disease and do not restore the tissues damaged by periodontal disease.<sup>4</sup> Thus, recent research has focused on regenerative approaches, including mesenchymal stem-cell grafting, which has promising applications. Mesenchymal stem cells are involved in growth, wound healing and replacing cells that have been lost through either daily exfoliation or pathological conditions.<sup>5</sup>

Traditionally, bone marrow has served as the main source of mesenchymal stem cells for basic research and therapeutic use; however, there are mesenchymal stem

cells in almost all tissues, including teeth. Because of their accessibility and ability to differentiate into multiple lineages, mesenchymal dental pulp stem cells (DPSCs) are increasingly recognized as a viable source for the development of effective cell-based therapies.<sup>6,7</sup>

Although patient trials are limited, multiple groups view mesenchymal stem cells as a promising and safe treatment, regardless of human leukocyte antigen (HLA) compatibility.<sup>8,9</sup> In this sense, there is evidence that allogeneic mesenchymal stem-cell infusion appears to be well tolerated. Most trials have reported only mild or transient effects, and some have even reported the absence of adverse reaction to allogeneic mesenchymal stem cells.<sup>10</sup> Of patients with osteogenesis imperfecta treated with mesenchymal stem cells, none exhibited clinical symptoms of an autoimmune response to allogeneic cells.<sup>11</sup> Furthermore, an intravenous infusion of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with aplastic anaemia has been shown to be safe.<sup>12</sup> More recently, myocardial regeneration was safely achieved using human allogeneic umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem cells.<sup>13,14</sup> Thus, the present authors hypothesized that an infusion of allogeneic DPSCs would similarly induce periodontal tissue regeneration in adult patients with periodontal disease. This case report presents clinical, radiographic and surgical evidence of successful periodontal

regeneration following the therapeutic application of allogeneic DPSCs, as preliminary findings in one patient enrolled into trial ISRCTN12831118, which is a pilot trial aimed at standardizing techniques for periodontal regeneration.

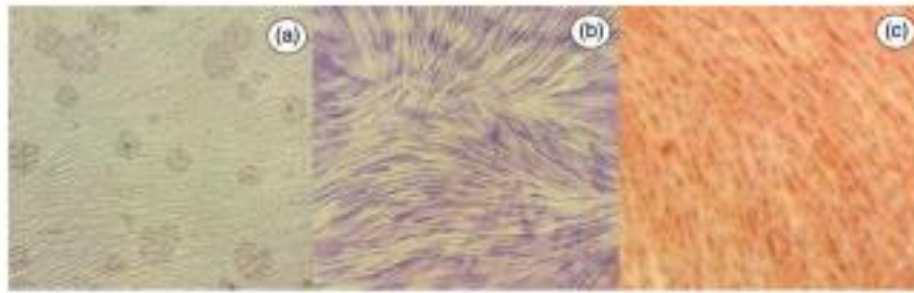
### Case report

A 61-year-old male patient was referred to a dental clinic at the National Autonomous University of Mexico to receive treatment for periodontal disease. The patient first presented at the clinic in March 2016, at which time oral diagnosis was confirmed, as were supra- and subgingival dental calculus, bleeding upon probing, grade II mobility (graded by holding one side of the tooth with a metal instrument and the other side with the index finger and moving in buccolingual and vertical directions, as previously described)<sup>13</sup> and a periodontal pocket depth of 6.5 mm in the second left lower premolar (No. 35). Radiological analysis showed a radiolucent zone on the mesial side of the root of the same tooth. No deep caries, changes in tooth mobility, or root involvement were detected in any other teeth.

The patient reported a history of systemic arterial hypertension since the age of 35, which he controlled by taking metoprolol and nifedipine every 24 h. The mother had a history of systemic arterial hypertension and diabetes, and the father had no history of pathology. The patient provided written informed consent for treatment and publication of the case and was enrolled into trial ISRCTN12831118. The surgical protocol followed the principles of the Helsinki Declaration and was approved by the Bioethics and Biosafety Committee of the Research Committee of the Faculty of Higher Studies Zaragoza, National Autonomous University of Mexico, ref: 25/11/SO/3.4.1.

Mesenchymal stem cells were obtained from the dental pulp of a 7-year-old male donor under aseptic conditions and under the strict criteria of good manufacturing practices, using reagents that were free of products of animal origin. The dental pulp was gently removed from the teeth and was immersed in a digestive solution (3 mg/ml type I collagenase plus 4 mg/ml dispase in Minimum Essential Medium [MEM]- $\alpha$  [Life Technologies; Grand Island, NY, USA]) for 1 h at 37°C. Once digested, the dental pulp was dissociated and centrifuged at 497 g for 5 min. After centrifugation, the dissociated tissue was resuspended in MEM- $\alpha$  and seeded at  $2 \times 10^4$  cells/ml into a 35 mm  $\times$  13 mm dish, then incubated at 37°C until 80% confluence was achieved. The cells were expanded by serial passage into 35 mm dishes, and at the third passage, cells were cultured to 80% confluence for analyses by flow cytometry and for use in treating the recipient patient. Cell phenotype was analysed using BD antibodies to human cell antigens and a BD FACSCalibur™ flow cytometer with BD Pro v.5.1.1 software (all BD Biosciences, San José, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Cells were found to be positive for cluster of differentiation (CD)105 (85.81%), CD73 (99.81%), and CD90 (99.54%) and negative for CD45 (0.06%), CD34 (0.09%), CD31 (0.20%), CD14 (0.04%), CD11b (0.04%) and HLA-D related (DR) (1.06%). In addition, differentiation assays (Figure 1) were performed for osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages as described previously.<sup>16,17</sup> The present findings were consistent with the International Society for Cellular Therapy criteria for mesenchymal stem cells.<sup>18</sup>

The recipient patient's blood chemistry, blood cytometry, prothrombin time and activated partial thromboplastin time were all within normal parameters (Table 1). Cone beam volumetric tomography was performed



**Figure 1.** Representative images showing in vitro multi-lineage differentiation of dental pulp stem cells obtained from a 7-year-old donor: (a) oil red O staining showing lipid deposits (arrows), indicative of adipogenic lineage; (b) alcian blue staining showing glycosaminoglycans deposits (arrows), indicative of chondrogenic lineage; and (c) alizarin red staining showing more densely stained areas with mineral deposits (arrows), indicative of osteogenic lineage; (all images, original magnification  $\times 40$ ).

**Table 1.** Blood chemistry, blood cytometry, prothrombin time and activated partial thromboplastin time before and after allogeneic dental pulp stem cell grafting in a 61-year-old male patient with periodontal disease.

Blood parameter	Assessment time-point		Normal range
	Pre-surgery	6 months post-surgery	
Haematocrit, %	48.0	47.5	38–54
Haemoglobin, g/dl	15.8	15.6	12–16
White cell count, $\times 10^3/\text{mm}^3$	8.5	8.3	5.0–10.0
Red cell count, $\times 10^6/\text{mm}^3$	5.23	5.11	4.2–6.2
Platelet count, $\times 10^3/\text{mm}^3$	172	162	150–400
MCHC, %	31	32	26–32
MCH, %	29	30.5	27–32
MCV, fl	94	93	82–98
Lymphocytes, %	22	21	20–40
Neutrophils, %	67	67	40–70
Eosinophils, %	1	0	0–1
Monocytes, %	8	7	2–8
Basophils, %	0	0	2–4
Biochemistry			
Glucose, mg/dl	101	100	70–100
Urea, mg/dl	50.3	49	10–50
Creatinine, mg/dl	0.95	0.89	0.50–1.20
Uric acid, mg/dl	5.0	5.0	2.40–5.4
Cholesterol, mg/dl	160	150	150–200
Triglycerides, mg/dl	89	83	50–160
Bilirubin, mg/dl	0.25	0.10	0–0.3
C-reactive protein, mg/l	0	0	0–10
Coagulation			
PT, s	12.8	12.0	10–15
aPTT, s	33.1	32.1	27–45

MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; PT, prothrombin time; aPTT, activated partial thromboplastin time.



**Figure 2.** Cone beam volumetric tomography images of the left lower premolar area of a 61-year-old male patient with periodontal disease, showing: (a) boundary of the initial bone defect area of 18.30 mm<sup>2</sup> (arrow) at baseline; (b) bone defect area reduced to 5.73 mm<sup>2</sup> (arrow) at three months following dental pulp stem cell graft; and (c) bone defect area reduced to 4.58 mm<sup>2</sup> (arrow) at six months following dental pulp stem cell graft.

**Table 2.** Clinical evaluation before and after allogeneic dental pulp stem cell grafting in a 61-year-old male patient with periodontal disease, showing baseline and post-intervention (3- and 6-month) results.

Parameter	Study time-point		
	Baseline	3 months	6 months
Depth of periodontal defect, mm	6.5	3.6	3.5
Tooth mobility, grade	II	I	I
Bone mineral density			
Distal area, Hounsfield Units	916	1111	1328
Proximal area, Hounsfield Units	612	880	1058
Middle area, Hounsfield Units	163	381	929

Tooth mobility grade: I, normal; II, slight mobility.<sup>15</sup>

to calculate the size of the periodontal defect and the bone mineral density (Figure 2a; Table 2) using OnDemand3D™ Project Viewer software (Cybermed Inc., Seoul, Korea). Subsequently, phase I periodontal therapy (non-surgical) was performed, comprising the removal of supra- and subgingival calculus using a Tigon Piezo Scaler (W&H Impex, Windsor, OH, Canada), root scaling/root planing, replacement of restorations, occlusal adjustment and instructing the patient in proper oral hygiene. After 12 weeks, the amount of biofilm detected was minimal, and the periodontal defect remained

unchanged, with a depth of 6.5 mm in the mesial, middle and distal areas.

Prophylactic antibiotic therapy, using 500 mg metronidazole and 300 mg clindamycin, orally, every 8 h, was initiated three days prior to the surgical phase. Before proceeding to the surgical phase, a rinse was performed with chlorhexidine 0.12% for 2 min, and the area was cleaned with benzalkonium chloride. Loco-regional anaesthesia was applied (1:50 000 lidocaine and adrenaline).

Surgical access to the left lower premolar area was achieved using the flap technique. The root surfaces were smoothed using an

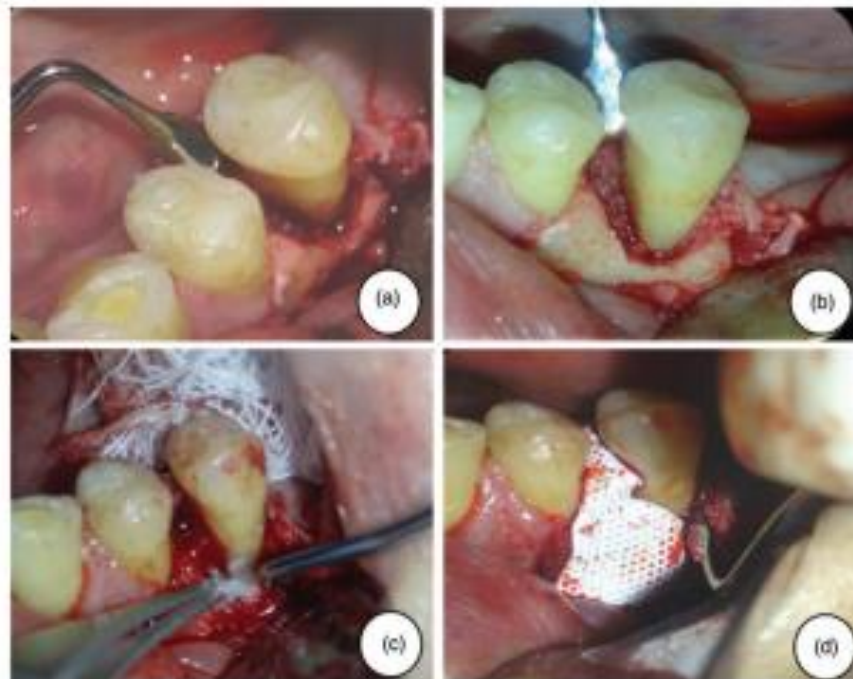


ultrasonic reamer (W&H Impex, Windsor, OH, Canada), the granulation tissue was removed and the area was irrigated with 0.9% NaCl in injectable water. After cleaning the surface, a dry scaffold of lyophilized collagen-polyvinylpyrrolidone sponge (Fibroquel; Aspid, Mexico City, Mexico) was placed on the bone defect in 0.5 cm<sup>2</sup> fragments using an Adson calliper (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) filled with chlorhexidine gel. Following three passages, a total of  $5 \times 10^6$  DPSCs in 250  $\mu$ l of phosphate buffered saline were seeded onto the scaffold.<sup>19</sup> A Teflon-coated titanium membrane (Cytoplast<sup>®</sup> Ti-250/Ti-150 non-resorbable barrier membranes; Osteogenics Biomedical, Lubbock, TX, USA) was applied, and the flap was repositioned

with absorbable suture points. Surgical cement was added to the area to protect the intervention. The intervention was further protected with metronidazole and clindamycin (as above) supplemented with 100 mg nimesulide, orally, every 12 h for 5 days to control oedema and pain (Figure 3).

Following surgical intervention, the patient was instructed to rinse with Oxoral<sup>®</sup> solution for 2 min twice daily for two weeks. In addition, the patient was instructed to use Tebodont<sup>®</sup> toothpaste and to perform dental cleaning with a Curaprox Surgical brush. Weekly observations were performed to monitor the healing process.

The surgical cement was removed at 7 days following surgery, and cone beam



**Figure 3.** Representative clinical views of the left lower premolar area of a 61-year-old male patient with periodontal disease, showing: (a) the mesial circumferential bone defect during periodontal surgery; (b) debris removal and collocation of a dry scaffold of lyophilized collagen-polyvinylpyrrolidone sponge; (c) seeding of dental pulp stem cells; and (d) adaptation of non-resorbable membrane.

volumetric tomography was performed at 3 and 6 months following surgery (Figure 2b and 2c). The patient will be examined monthly up to 1 year following the surgical intervention and every 6 months for 3 years after the intervention to confirm that the defect has filled with bone tissue and that the new tissue remains stable over time.

At 3 and 6 months following surgical intervention, the patient showed no signs or symptoms of rejection. Throughout this time, the gingiva showed no signs of inflammation, and depth of the periodontal pocket and dental mobility both decreased compared with initial baseline findings (Table 2). Furthermore, the patient's blood chemistry and blood cytometry parameters at 6 months postoperatively (white blood cell count, red blood cell count, the percentage of neutrophils, the percentage of lymphocytes, blood bilirubin and C-reactive protein) were comparable with values at 2 weeks prior to surgery (Table 1), suggesting that there was no immunological rejection, as also noted in a previously published study.<sup>20</sup>

The clinical results were in agreement with the findings of cone beam volumetric tomography and bone densitometry assays. Cone beam volumetric tomography revealed that an initial damaged area of 18.30 mm<sup>2</sup> was reduced to 5.73 and 4.58 mm<sup>2</sup> at 3 and 6 months, respectively, following the DPSC graft (Figure 2). Densitometry assays revealed an increase in bone mineral density in the walls of the defect at 3 and 6 months post-treatment, which is suggestive of bone tissue regeneration (Table 2).

## Discussion

Tissue engineering using stem cells is an approach that might address the deficiencies of more conventional therapeutic options by regenerating living and functional periodontal structures.<sup>21</sup> For many years,

bone marrow has been the main source of stem cells but harvesting mesenchymal stem cells from bone marrow is difficult and painful. DPSCs represent an ideal stem cell source, as they are easily accessible, can be harvested using a non-invasive protocol, and are rapidly expandable *in vitro*. Animal studies have suggested that the application of DPSCs could promote the growth of human dental tissues *in vivo*. When transplanted into mice and immunodeficient rats, DPSCs isolated from human third molars differentiate into cementoblast-like cells and can form complex structures, such as pulp-dentin and a periodontal ligament-cementum root.<sup>22-25</sup>

In the present study, collagen scaffold was chosen because it is the main protein of undifferentiated mesenchymal tissues and because scaffolds with a collagen base have been reported to support stem cells during the first weeks of differentiation by facilitating initial cell attachment and cell differentiation and, consequently, the formation of calcified tissue.<sup>26</sup> Collagen is radiolucent with high periodontal tissue compatibility and degradability.<sup>27</sup> Furthermore, the pore structure of a collagen sponge is ideal for the colonization of seeded cells and enhances bone formation by promoting the differentiation of osteoblasts,<sup>28</sup> thus providing a suitable scaffold for the engineering of tooth tissue.

Compared with other adult tissue sources, DPSCs are an easily accessible source of adult dental stem cells.<sup>29</sup> The supply of pulp tissue decreases with age, however, due to narrowing root canals, physiological secondary dentin formation, and pathological tertiary dentin formation and mineralization.<sup>30</sup> Thus, older patients' teeth contain fewer DPSC colonies than the teeth of younger patients.<sup>31</sup> There is some conflicting evidence, as some groups have reported no such age-related change, but the majority of studies find an age-related decrease in differentiation/regeneration capacity of

cells derived from dental pulp. Human DPSCs obtained from older donors are thought to lose their proliferative activity and differentiation capability, and become senescent, after fewer passages than cells derived from younger donors.<sup>32-34</sup> Thus, the present authors believe that minimal manipulation of DPSCs in culture will increase the possibility of achieving tissue regeneration.

Allogeneic DPSCs were obtained from a 7-year-old donor patient in the present study, following good manufacturing practices, to graft onto a periodontal defect in an elderly male patient. A previous study, published in 2009, showed that mesenchymal stem cells are only weakly immunogenic in humans and validated the clinical use of mesenchymal stem cells from HLA-mismatched donors.<sup>35</sup> Results from the same study indicated that mesenchymal stem cells could be transplanted successfully into allogeneic recipients across HLA barriers, with little evidence that the mesenchymal stem cells would be rejected or would sensitize the recipient to other cells of the same HLA type.<sup>35</sup> Since then, many procedures have been performed with allogeneic HLA-mismatched mesenchymal stem cells without evidence of immune rejection.<sup>36</sup>

These and other experimental data present strong evidence that DPSCs have the potential to induce the formation of human dental tissues *in vivo*; however, clinical data were available for only a few human cases.<sup>37</sup> Thus, the present case report examined whether the transplantation of human DPSCs contributed to periodontal repair in a patient with a periodontal disease-induced infrabony defect.

The combination choice of metronidazole and clindamycin for pre-surgical prophylactic therapy in the present case is supported by an investigation by Sigusch *et al* (2001)<sup>38</sup> that reported the use of metronidazole and clindamycin in treating periodontal disease. In addition, these antibiotics have been used

in combination to treat other infectious diseases.<sup>39</sup> Furthermore, the present authors have used the combination of metronidazole and clindamycin as a prophylactic treatment for surgical intervention and achieved good results.

The patient described here exhibited clinical improvement at 3 and 6 months following DPSC treatment, as indicated by a decreased depth of periodontal defect, normal gingiva characteristics, decreased tooth mobility, and observation of bone-like tissue in both tomographic and bone densitometry assays. To the best of the authors' knowledge, the present case provides the first evidence that allogeneic DPSC transplantation in humans is capable of inducing bone tissue regeneration in a periodontal disease-induced infrabony defect. The findings are consistent with those of a previous study that provided the first evidence that an autologous human DPSC transplant could induce the restoration of mandibular bone tissue in patients with third molar extraction,<sup>40</sup> and are consistent with another study demonstrating that DPSCs deposited in a collagen scaffold are able to successfully repair bone.<sup>41</sup> In the present case, a collagen scaffold was used to generate bone tissue, however, it is possible to transplant DPSCs and obtain a remodelled and highly vascularized bone tissue without the use of scaffolding.<sup>42</sup> Thus, the present authors would like to explore this less invasive possibility in future studies.

A possible mechanism behind the bone defect repair observed in the present study is that conditions in the oral microenvironment facilitated DPSC differentiation. Evidence suggests that local factors can modulate the physiology of mesenchymal stem cells to promote tissue regeneration in injured organs and tissues.<sup>43</sup> Negative signals in the aged periodontium can send distress signals to the grafted allogeneic mesenchymal stem cells, thereby inducing

the mesenchymal stem cells to secrete a diverse repertoire of factors, such as growth factors, cytokines, mRNA and extracellular matrix, that support cell survival. Components of the mesenchymal stem cell secretome might therefore rescue injured cells, reduce tissue damage, and accelerate repair.<sup>43,44</sup>

In addition to bone formation, the complete regeneration of periodontal tissue requires the formation of periodontal ligament and root cement.<sup>45</sup> Further research should, therefore, include analysis of a sample of neoformed tissue in terms of histological composition, to confirm the kinds of tissue formed other than bone.

Regenerative periodontal therapy using allogeneic DPSCs did not present evidence of immunological rejection in the current case, and it was shown to help reduce the periodontal pocket and drive the formation of bone-like tissue to actively repair the periodontal disease-induced infrabony defect.

The present work represents a pilot proposal for a periodontal disease treatment protocol, and a control case is not presented for comparison. A split-mouth model could be considered in future research, in which the patient simultaneously serves as control and treatment and both sites are exposed to the same internal and external factors that could affect the outcome. In addition, a randomized clinical study is required to corroborate the present findings in a larger patient population.

A further limitation was that fact that due to the treatment protocol, it could not be determined whether the number of cells seeded onto the scaffolding was maintained on the scaffolding. Thus, it is suggested that the cells be transferred and allowed to attach to the scaffold before surgery, so that when the surgery is performed, the likelihood of a successful therapy is increased.

In conclusion, the findings of the present case report suggest that DPSC treatment promotes periodontal regeneration. Further

research should include a randomized clinical trial to verify the findings.

#### Acknowledgements

The authors appreciate the support of Norma Angélica Sosa-Hernández and Itzen Aguiñiga-Sánchez, who provided biological materials and valuable technical advice regarding the management of cells; and acknowledge Rosa Diana Hernández-Palacios for her support in the clinical diagnosis and supervision of treatment.

#### Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was financially supported by the General Directorate of Academic Personnel Affairs (Project PAPIIT IN221815), Postgraduate in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico, and DentCell.

#### References

1. Manji F, Dahlen G and Fejerskov O. Caries and periodontitis: contesting the conventional wisdom on their aetiology. *Caries Res* 2018; 52: 548–564.
2. Carter CJ, France J, Crean S, et al. The *Porphyromonas gingivalis*/host interactome shows enrichment in GWASdb genes related to alzheimer's disease, diabetes and cardiovascular diseases. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 408.
3. Reddy BV, Tanneera S and Chava VK. The effect of phase-I periodontal therapy on pregnancy outcome in chronic periodontitis patients. *J Obstet Gynaecol* 2014; 34: 29–32.
4. Deas DE, Moritz AJ, Sagun RS Jr, et al. Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol* 2000 2016; 71: 128–139.

5. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 2011; 99: 1-7.
6. Alraies A, Alaidaroos NY, Waddington RJ, et al. Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. *BMC Cell Biol* 2017; 18: 12.
7. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM and Santiago-Osorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a review. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 4709572.
8. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371: 1579-1586.
9. Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, et al. Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *Am J Blood Res* 2013; 3: 225-238.
10. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One* 2012; 7: e47559.
11. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8932-8937.
12. Clè DV, Santana-Lemos B, Tellechea MF, et al. Intravenous infusion of allogeneic mesenchymal stromal cells in refractory or relapsed aplastic anemia. *Cytotherapy* 2015; 17: 1696-1705.
13. Musialek P, Mazurek A, Jarocho D, et al. Myocardial regeneration strategy using Wharton's jelly mesenchymal stem cells as an off-the-shelf 'unlimited' therapeutic agent: results from the Acute Myocardial Infarction First-in-Man Study. *Postępy Kardiol Interwencyjnej* 2015; 11: 100-107.
14. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med* 2015; 13: 162.
15. Wasserman BH, Geiger AM and Turgeon LR. Relationship of occlusion and periodontal disease. VII. Mobility. *J Periodontol* 1973; 44: 572-578.
16. Yang Y, Yang R, Roth M, et al. Genetically transforming human osteoblasts to sarcoma: development of an osteosarcoma model. *Genes Cancer* 2017; 8: 484-494.
17. Moghadam FH, Tayebi T, Dehghan M, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes after short term culture in alkaline medium. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2014; 8: 12-19.
18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller Y, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
19. Pérez Borrego A, Domínguez Rodríguez L, Ilisástigui Ortueta ZT, et al. Stem-cells used in treatment of periodontal bone defects. *Rev Cubana Estomatol* 2009; 46: 122-128 [In Spanish, English abstract].
20. Chen FM, Gao LN, Tian BM, et al. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 33.
21. Zhang J, An Y, Gao LN, et al. The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. *Biomaterials* 2012; 33: 6974-6986.
22. Sun HH, Chen B, Zhu QL, et al. Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials* 2014; 35: 9459-9472.
23. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13625-13630.
24. Zhang W, Ahluwalia IP, Literman R, et al. Human dental pulp progenitor cell behavior on aqueous and hexafluoroisopropanol based silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2011; 97: 414-422.
25. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional

- tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006; 1: e79.
26. Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27: 3238–3248.
  27. Kosen Y, Miyaji H, Kato A, et al. Application of collagen hydrogel/sponge scaffold facilitates periodontal wound healing in class II furcation defects in beagle dogs. *J Periodontol Res* 2012; 47: 626–634.
  28. Aimetti M, Manavella V, Cricenti L, et al. A novel procedure for the immediate reconstruction of severely resorbed alveolar sockets for advanced periodontal disease. *Case Rep Dent* 2017; 2017: 9370693.
  29. Bansal R and Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med* 2015; 6: 29–34.
  30. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, et al. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93: 474–482.
  31. Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, et al. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 2010; 55: 648–654.
  32. Wang H, Zhong Q, Yang T, et al. Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. *Mol Med Rep* 2018; 17: 6551–6559.
  33. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res* 2008; 87: 676–681.
  34. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, et al. Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. *PLoS One* 2012; 7: e49146.
  35. Sundin M, Barrett AJ, Ringdén O, et al. HSCT recipients have specific tolerance to MSC but not to the MSC donor. *J Immunother* 2009; 32: 755–764.
  36. Golpanian S, DiFede DL, Khan A, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cell infusions for aging frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017; 72: 1505–1512.
  37. Hernández-Monjaraz B, Ledesma-Martínez E, Hernández-Palacios RD, et al. Mesenchymal stem cells as a treatment for periodontal disease in older adults. *Odontología actual* 2016; 3: 4–7 [In Spanish].
  38. Sigusch B, Beier M, Klinger G, et al. A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol* 2001; 72: 275–283.
  39. Tchernev G. Folliculitis et perifolliculitis capitis abscedens et suffodiens controlled with a combination therapy: systemic antibiotics (metronidazole plus clindamycin), dermatosurgical approach, and high-dose isotretinoin. *Indian J Dermatol* 2011; 56: 318–320.
  40. D'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endothelial cells: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1162–1171.
  41. Giuliani A, Manescu A, Langer M, et al. Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2: 316–324.
  42. Paino F, La Noce M, Giuliani A, et al. Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: a new tool in bone tissue engineering. *Clin Sci (Lond)* 2017; 131: 699–713.
  43. Spees JL, Lee RH and Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 125.
  44. Zhang B, Yin Y, Lai RC, et al. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev* 2014; 23: 1233–1244.
  45. Schüpbach P, Gaberthüel T, Lutz F, et al. Periodontal repair or regeneration: structures of different types of new attachment. *J Periodontol Res* 1993; 28: 281–293.



Review

## Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review

Beatriz Hernández-Monjaraz <sup>1</sup>, Edelmiro Santiago-Osorio <sup>2</sup>, Alberto Momroy-García <sup>3</sup>, Edgar Ledesma-Martínez <sup>2</sup> and Víctor Manuel Mendoza-Núñez <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Research Unit on Gerontology, IES Zaragoza, National Autonomous University of Mexico, 09230 Mexico City, Mexico; beatrizhmonjaraz@hotmail.com

<sup>2</sup> Haematopoiesis and Leukemia Laboratory, Research Unit on Cell Differentiation and Cancer, IES Zaragoza, National Autonomous University of Mexico, 09230 Mexico City, Mexico; edelmir@unam.mx (E.S.-O.); 2814.2800@gmail.com (E.L.-M.)

<sup>3</sup> Immunology and Cancer Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, 09230 Mexico City, Mexico; albertomom@yaho.com

\* Correspondence: vmendoza@unam.mx; Tel: +52-55-5623-0721; Fax: +52-55-5773-6300

Received: 2 March 2018; Accepted: 15 March 2018; Published: 22 March 2018

**Abstract:** Periodontitis is a chronic disease that begins with a period of inflammation of the supporting tissues of the teeth table and then progresses, destroying the tissues until loss of the teeth occurs. The restoration of the damaged dental support apparatus is an extremely complex process due to the regeneration of the cementum, the periodontal ligament, and the alveolar bone. Conventional treatment relies on synthetic materials that fill defects and replace lost dental tissue, but these approaches are not substitutes for a real regeneration of tissue. To address this, there are several approaches to tissue engineering for regenerative dentistry, among them, the use of stem cells. Mesenchymal stem cells (MSC) can be obtained from various sources of adult tissues, such as bone marrow, adipose tissue, skin, and tissues of the orofacial area. MSC of dental origin, such as those found in the bone marrow, have immunosuppressive and immunotolerant properties, multipotency, high proliferation rates, and the capacity for tissue repair. However, they are poorly used as sources of tissue for therapeutic purposes. Their accessibility makes them an attractive source of mesenchymal stem cells, so this review describes the field of dental stem cell research and proposes a potential mechanism involved in periodontal tissue regeneration induced by dental MSC.

**Keywords:** DPSC; biological mechanism; periodontal treatment

### 1. Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory disease of the supportive tissues of the teeth. This disease is caused by specific microorganisms or groups of specific microorganisms, which result in a pathological disinsertion of the collagen fibres of the cementum; progressive destruction of the periodontal ligament and alveolar bone with increased probing depth formation, recession, or both; and apical migration of the union epithelium [1].

When these conditions last over time, they cause the tissue to continue to be destroyed until the tooth is lost due to lack of support. This not only has repercussions at the local level that affect the chewing, phonation, and aesthetics of the patient but it is also related to other pathologies that affect quality of life [2].

Although the disease can be treated successfully in its early stages, unfortunately, it is diagnosed when it affects the periodontal ligament, which causes most patients to seek dental care when the

disease is very advanced, and the chances of keeping the tooth in the mouth are minimal. Consequently, different therapeutic options focus on recovering the lost health of the tissues (alveolar bone, periodontal ligament, and cementum). The conventional treatment consists of emphasizing hygiene, performing scaling and root planing, providing antibiotics, and, occasionally, performing flap surgery to access the root surfaces to debride them properly [3].

These actions stop the acute phase of the disease, and sometimes a significant amount of new connective tissue insertion is recovered; however, the regeneration of the complex structure of the periodontium is not achieved. Conventional treatment relies on natural and synthetic materials that fill defects and replace lost dental tissue, but these approaches are not substitutes for a real regeneration of tissue with a physiological architecture and function. To address this, there are successful engineering initiatives. The purpose of tissue engineering is the regeneration of tissues through the combined use of biomaterials and biologic mediators in order to create living tissues that can replace structures or functions that have been lost. In this sense, there are several approaches to tissue engineering for regenerative dentistry, among them, the use of stem cells. In particular, stem cells have great versatility at the level of tissue regeneration for many different characteristics and can modulate chronic inflammation, a central feature in periodontitis. Given the characteristics of these cells, they are considered a potentially useful tool for efficient regeneration of periodontal tissues [4].

Therefore, this mini-review presents the basic concepts of periodontitis, the mesenchymal stem cells of dental origin that are used in the treatment, and the possible molecular mechanism involved in the regeneration of periodontal tissues.

### 1.1. Periodontitis

Periodontitis is a condition that destroys the tissues around the tooth, which evolves to tooth loss and triggers various complications at the local and systemic level [5,6].

Periodontitis is one of the diseases in which the importance of an imbalance of species of pathogenic and beneficial microorganisms is well demonstrated. Dysbiosis in the initial stage is generally induced by poor hygiene that causes the accumulation of different types of bacteria such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) and, specifically, those of the red complex: *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), and *Treponema denticola* [7].

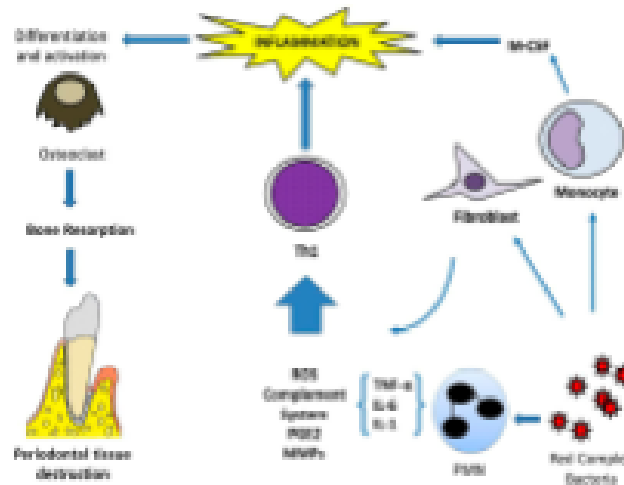
Although periodontitis is initiated by an imbalance that causes the accumulation of these bacteria and their lipopolysaccharides (LPS), the destruction of the supporting tissues of the tooth is mainly due to an exacerbated immune response of the host in susceptible individuals, which prevents the acute inflammation from being effectively resolved and initiates chronic periodontitis [8]. (Figure 1). In these cases, the accumulation of bacteria in the gingival sulcus causes the migration of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and monocytes. These cells, together with those of the gingival epithelium, secrete cytokines such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and adhesion molecules such as endoglin and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), which increase the adhesion of PMNs and monocytes to endothelial cells and increase the permeability of the gingival capillaries, which leads to the accumulation of leukocytes in the infection zone [9].

This allows the macrophages that have arrived at the area of the lesion to produce prostaglandin 2 (PGI<sub>2</sub>). High levels of this molecule and IL-1 $\beta$  increase the binding of PMNs and monocytes to endothelial cells, exacerbating inflammation, which, together with IL-6 and TNF- $\alpha$ , induce osteoclasts to activate and resorb the alveolar bone [10,11].

Meanwhile, local capillaries release a large amount of serum as a result of the release of histamine and complement molecules, which leads to increased vascular permeability. This serum is converted into a tissue fluid that contains inflammatory peptides (antibodies, complement, and other agents that mediate the body's defence) that are carried into the gingival sulcus. Increased gingival fluid causes the tissues and the amount of gingival crevicular fluid to increase in volume [11]. Macrophages and neutrophils in the infection area contain enzymes such as nicotinamide adenine dinucleotide



phosphate (NADPH) oxidase and myeloperoxidase that produce reactive oxygen species (ROS) to eliminate pathogens [12,13].



**Figure 1.** Pathophysiological mechanisms in periodontitis. The presence of red complex bacteria promotes periodontal inflammation in susceptible individuals. Activated polymorphonuclear neutrophils (PMN), fibroblast, and monocytes in the oral cavity induce production of cytokines such as tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1, and IL-6. The initial function of this inflammation is to protect against bacteria; however, chronic inflammation induces enhanced reactive oxygen species (ROS), complement system, and PGE2 and matrix metalloproteinases (MMPs) such as gelatinase B and collagenase 1. This inflammatory microenvironment induces a Th1 lymphocyte profile, which promotes inflammation and is associated with the maintenance and progression of the lesion. In addition, activated monocytes induce cytokines as M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) that promote activation and differentiation of osteoclasts, which are related to resorption of alveolar bone, damage to cementum, and periodontal ligament.

Under normal conditions, antioxidant mechanisms protect the tissues from damage mediated by ROS. However, if the body's antioxidant capacity is insufficient against ROS, oxidative stress (OxS) occurs that damages the hard and soft tissues of the periodontium [14,15].

OxS causes oxidation of important enzymes, stimulation of release of more proinflammatory cytokines, lipid peroxidation, and damage to DNA and proteins. These mechanisms affect the gingival tissues, periodontal ligament, and alveolar bone that support the teeth [16,17]. In addition, excessive release of pro-inflammatory cytokines is stimulated through the activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and the production of PGE2 through lipid peroxidation and superoxide release, which is related to bone resorption [18].

If this situation is sustained, the epithelial adhesion is destroyed, and the alveolar crest loses its height, which translates clinically into dental mobility and formation of periodontal pockets, causing the accumulation of more bacteria that increase the problem, thereby completely destroying the periodontal ligament; the alveolar bone becomes atrophied, and the tooth is lost [19,20].

To avoid this outcome, conventional treatment for periodontitis patients is divided into three different phases, which often overlap. The initial phase is focused on stopping the progression of destruction of periodontal tissues by eliminating local factors through oral hygiene instructions combined with scaling and root planing. The second phase is corrective and is aimed at restoring the

function and aesthetics of tissues, while the last phase is considered periodontal maintenance that is intended to prevent the recurrence of periodontitis [21].

Even when this treatment is carried out with rigor, the results are mostly aimed at the stabilization of the disease and not the regeneration of the lost periodontal tissues [22]. Therefore, it is necessary to carry out other procedures to recover tissue insertion, including root surface conditioning, bone grafting, guided tissue regeneration, and the application of growth factors [21].

Despite the use of these treatments, the original anatomy and physiology has not been restored, and in some cases, periodontal aberrations such as ankylosis, gingival recession, and formation of compact bone have developed [23,24]. Therefore, new therapeutic options, such as the use of mesenchymal stem cells (MSCs), including those isolated from dental tissues, have been proposed [25,26].

### 1.2. Mesenchymal Stem Cells

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult connective tissue cells that originate from the mesoderm. A stem cell is an undifferentiated cell that is distinguished by its capacity for autoregulation (which perpetuates the population of stem cells) and by its capacity for asymmetric division, which indicates a daughter stem cell and another with greater commitment to proliferation and cell differentiation [27,28] (Figure 2).

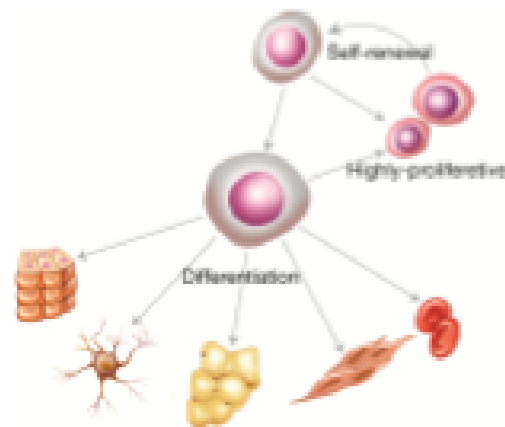


Figure 2. Characteristics of mesenchymal stem cells. The scheme shows the cellular differentiation capacity considering autoregulation, replication, and differentiation in epithelial, neural, adipose, muscular, and sanguine cells.

Stem cells can be isolated in the early stages of embryogenesis (embryonic stem cells) or in various postnatal tissues (adult stem cells). Although embryonic stem cells have a long lifespan and potential for high differentiation, the bioethical aspects involved in their production have focused the research on adult stem cells, which are considered pluripotent and found in most tissues, with the potential to repair damaged tissues or renew cell populations that are constantly being replaced [29–32].

MSCs are involved in growth, wound healing, and replacement of cells that are lost daily by exfoliation or in pathological conditions. Different studies have shown that they induce repair in neuronal, hepatic, and skeletal muscle after infusion in both preclinical and clinical models [33–35]. These qualities make them a potential tool for tissue engineering and tissue repair [36]. Interestingly, it has been shown that allogeneic MSC infusions are well tolerated, and there appear to be no side effects (acute or late) and no ectopic tissue formation [37].

Another advantage of MSCs is that they can be obtained from various sources of adult tissues such as bone marrow, adipose tissue, skin, and tissues of the orofacial area [38–44]. The first cells isolated from the orofacial area were those of third molar dental pulp. Subsequently, MSCs have been isolated from deciduous teeth, apical papilla, and periodontal ligament [45–47]. (Figure 3).

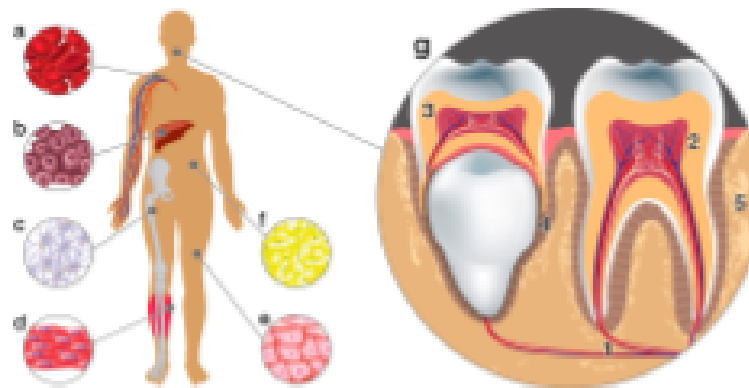


Figure 3. Sources of stem cells in the human organism. The diagram shows some tissue sources of adult stem cells. (a) Peripheral blood, (b) Liver, (c) Bone marrow, (d) Muscles, (e) Skin, (f) Adipose tissue, (g) Dental tissues: (1. Apical dental papilla, 2. Adult pulp, 3. Pulp of deciduous teeth, 4. Periodontal ligament, and 5. Alveolar bone).

### 1.3. Mesenchymal Stem Cells of Orofacial Area

Within the orofacial area, there are several sources of MSCs, including periodontal ligament stem cells (PL-MSC), apical papilla derived stem cells (SCAP), dental follicle cells (DFC), and dental pulp mesenchymal stem cells (DP-MSC) from both deciduous (SHED) and permanent teeth (DPSC). They all have attracted scientific interest, given their similarity to MSCs derived from bone marrow, their immunoregulatory capacity, and their minimally invasive obtention procedure [48,49].

The human periodontal ligament (PDL), a fibrous connective tissue that surrounds and supports the tooth, contains a small subpopulation of MSC that is responsible for maintaining and regenerating periodontal tissue structure and function. These cells form osteoblasts, fibroblasts, and tooth cementoblasts that form cementum- and periodontal ligament-like tissues [46].

SCAP and DFC are stem cells that are located only in the developing tooth germ before they erupt into the oral cavity; SCAP is at the tips of growing teeth, and DFC is in a connective tissue sac surrounding the enamel organ and dental papilla. These cells form adherent clonogenic clusters and similar to other MSC populations; they differentiate into adipocytes and odontoblasts/osteoblasts [50], progenitors for cementoblasts, and periodontal ligament (PL) [51]. DFC are believed to be parent cells that differentiate into PDL fibroblasts, osteoblasts, and cementum-fabricating cementoblasts during the development of the periodontium [52].

DP-MSC are cells in the pulp chamber of the tooth that originate from the cranial neural crest. They have clonogenic capacity and rapid proliferative rates, can differentiate into various cell types such as chondrocytes, adipocytes, and odontoblasts, and can even be reprogrammed into myocytes or neurons. Similar to bone marrow, the type of surface markers they express are Stro-1, CD29, CD73, CD90, CD105, and CD166, and they are negative for hematopoietic markers such as CD14, CD45, CD84, CD95, and CD28 [53].

The differentiation of DP-MSCs and PL-MSC into the different cell strains is determined by the microenvironment surrounding the cells, such as growth and transcription factors, molecular receptors,

and extracellular matrix proteins. In addition, both *in vitro* and *in vivo* studies have shown that both have the ability to form mineralized tissues [54–59].

#### 1.4. MSCs of Dental Origin in Periodontal Regeneration

One of the advantages of MSCs of dental origin is that they can be safely used in allogeneic transplants, because they have immunosuppressive properties such as those found in bone marrow-derived cells [60]. Good immune tolerance and tissue repair ability have both been observed in different models. Also, it is necessary to evaluate the effectiveness of MSC, DP-MSC, SCAP, and PL-MSC to form dental tissues and regenerate lost periodontium in several animal and human models [61] (Table 1).

In addition to their immunomodulatory function, they also have an anti-inflammatory function, which suggests that they can stop the development of lesions and allow the intrinsic regenerative processes to have a greater possibility of success. In this sense, MSCs of dental origin may have a direct or indirect effect on the control of Oxs processes and the inflammation characteristic of periodontitis, since it has been suggested that these cells have an anti-inflammatory effect that could help to reduce the high levels of ROS and cytokines that are present in periodontitis [62].

These cells have demonstrated a strong ability to induce bone formation *in vivo*. According to investigations, DP-MSCs of exfoliated teeth cannot differentiate directly into osteoblasts but may induce the formation of new bone by forming an osteoinductive template to recruit osteogenic cells from the host [45]. As DP-MSCs are common progenitors of odontoblasts and osteoblasts, they are considered useful for periodontal tissue engineering [63,64]. In addition, MSCs may exert a neovascularization effect; therefore, one of the therapeutic functions is the early induction of granulation tissue, which, in the case of periodontitis, will be followed by stabilization of the neovascular network in the periodontal niche [65].

On the one hand, histological findings in animal models suggest that the application of MSCs of dental origin can promote the regeneration of infra-bone defects. Rats with bone defects that were treated with PL-MSCs presented a higher percentage of bone-type filler after surgery, as well as the generation of structures similar to cementum and periodontal ligament after 21 days of treatment [66]. Similarly, Yu et al. observed in a rat model that the placement of PL-MSCs on a gelatinous scaffold is effective at achieving the regeneration of soft and hard periodontal tissues [67].

On the other hand, a study that aimed to understand the effect of DP-MSCs in a preclinical miniature pig model demonstrated that allogeneic transplantation of DP-MSCs from deciduous teeth can effectively repair the loss of hard and soft tissue caused by periodontitis without adverse effects [68].

To accelerate the repair of artificially created dehiscence to emulate the tissue destruction of patients with advanced periodontitis, a study was conducted in sheep in which PL-MSCs were placed in a collagen scaffold. The results showed extensive coverage of new alveolar bone with a cell line similar to osteoblasts at 4 weeks of treatment [68].

On the other hand, it has been observed that a functional connection between the cementum, ligament, and alveolar bone requires cells, a series of chemical signals and a physical support called scaffolding. In this regard, it has been shown that DP-MSCs promoted regeneration in periodontal defects when placed in combination with biomaterials [69].

Likewise, it has been found that DP-MSCs placed in a collagen scaffold can be used to repair bone defects in humans, since this allograft produces rapid regeneration of alveolar bone in both quality and quantity of tissue compared with techniques that use bone from various sources for guided regeneration [70].

In this sense, Aimetti et al. described a clinical case of a periodontal defect in a 56-year-old male treated with DP-MSCs obtained from one of his third molars. At one year after surgery, it was observed clinically and radiologically that the defect had been completely filled by bone-like tissue [71].

**Table 1.** Studies on the application of dental stem cells in the repair of bone defects caused by periodontitis.

Cell Type	Receiver	Objective	Findings	Source
DP-MSC	Immune-compromised mice	To know the capacity to form bone	Cultured human DP-MSC produced calcified tissue that was histologically proved to be bone when transplanted into immunocompromised mice.	[63]
DPSC	Swine	To investigate the roles of the hepatocyte growth factor (HGF) and DPSCs in periodontal tissue regeneration	Cells and HGF that were produced significantly improved periodontal bone regeneration in swine.	[72]
DPSC	Immune-compromised mice	Compare DPSC with bone marrow cells in the formation of the dentin-pulp complex	The transplanted cells generated a dentine structure covered with odontoblasts surrounding pulp tissue. The dentin-pulp complex was formed from dental pulp stem cells.	[48]
DPSC	Humans	Demonstrate that the biocomplex of DPSC and collagen sponge can be used to repair bone defects in humans	Autografts produced rapid bone regeneration, which was of optimum quality and quantity compared to standard techniques for guided regeneration.	[70]
DPSC	Humans	To regenerate the infrabony defect on the mandibular right second premolar	The defect was filled with bonelike tissue, as confirmed through the reentry procedure.	[71]
SHED	Immune-compromised mice	To know the characteristics and potential of development in vivo	SHED was able to differentiate into odontoblasts and induce osteoblasts to form bone in vivo; however, they were unable to regenerate the dentin-pulp complex.	[45]
SHED	Swine	To investigate the ability of allogeneic SHEDs to regenerate lost periodontium in a swine periodontitis model	The effective repair of the loss of hard and soft tissue caused by periodontitis was observed.	[60]
PL-MSC	Immune-compromised mice	To know the spatial distribution of the stem cells in the periodontal ligament	The stem cells found on the alveolar bone had a greater potential for multilineage differentiation than those found on the root surface, both in osteogenic and adipogenic differentiation.	[73]
PL-MSC	Dog	Examine stem cells derived from multiple layers of ligament for periodontal regeneration	Cell formation was observed on the defect walls with periodontal ligament and polyglycolic acid stem cells.	[74]
PL-MSC	Dog	To know the ideal cell type for clinical application	Stem cells provided incremental lines of neo cement, with Sharpey fibres being inserted and cellular cementum at the apex of the root.	[75]
PL-MSC	Dog	To histomorphometrically evaluate the use in the treatment of class III furcation defects	Ligament cells, in association with guided tissue regeneration, were able to significantly promote periodontal regeneration.	[76]
PL-MSC	Swine	To explore the potential of using autologous periodontal ligament stem cells to treat periodontal defects	Stem cells were effective in autologous transplantation, which was used to treat periodontitis in a preclinical miniature swine model.	[77]
PL-MSC	Swine	To develop a feasible allogeneic cell-based method for the treatment of periodontitis	Allogenic stem cells were able to repair bone defects in an experimental model of periodontitis without immunological rejections.	[78]
PL-MSC	Swine	To evaluate the bone regeneration potential of biomimetic intrafibrillarly mineralized collagen (IMC) loaded with autologous periodontal ligament stem cells (PL-MSC s) in large bone defects	IMC achieved a significantly higher extent of forming new bones, with the normal architecture of natural bones and blood vessels.	[79]
PL-MSC	Humans	To know the utility of autologous progenitor cell transplantation in tissue repair	It was shown that transplantation of autologous periodontal ligament progenitor cells was able to provide a therapeutic benefit in periodontal defects.	[80]
PL-MSC	Humans	To evaluate the safety of autologous transplantation and its effectiveness as adjuvant to graft materials in the repair of bone defects caused by periodontitis	The use of stem cells did not produce adverse effects but was effective at repairing bone defects.	[81]

Table 1. Cont.

Cell Type	Receiver	Objective	Findings	Source
PL-MSc	Immune-compromised mice	Recreate a favourable regeneration microenvironment and enhance the reconstruction of physiologic architecture of a dental cementum/PDL-like complex	The mixed-type PL-MSc pellets supported cementum/periodontal ligament (PDL)-like tissue regeneration with neovascularization.	[82]
SCAP	Immune-compromised mice	Evaluate the potential application of these cells for cementum/PL regeneration and bio-root engineering	Tissue-regenerative capacity was shown to produce a typical cementum/PDL-like complex in vivo.	[83]
DFC and PL-MSc	Immune-compromised mice	To evaluate DFCs that could enhance the function of both PL-MScs by providing a beneficial young microenvironment	PL-MScs co-cultured with DFCs produced a typically arranged tissue with Sharpey-like perpendicular fibres. Additionally, a root/periodontal ligament-like complex and a periodontal ligament/bone-like complex were observed.	[84]
DP, SHED and PL-MSc	Immune-compromised mice	To evaluate the effectiveness of MSC to form dental tissues	DPSC and SHED were able to generate a dentin-pulp complex. PL-MSc generated structures associated with the periodontium.	[85]
CSC and PL-MSc	Dog	To evaluate the regenerative potential in experimentally created periodontal intrabony defects	Higher amounts of new cementum were formed and a larger dimension of new connective tissue. Cellular therapy promoted periodontal regeneration in experimental intrabony periodontal defects.	[86]

Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells (DP-MSc), third molar human dental pulp stem cells (DPSC), stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), periodontal ligament stem cells (PL-MSc), cementum stem cells (CSC), root apical papilla derived stem cells (SCAP), dental follicle cells (DFC).

### 1.5. Biological Mechanisms of MSCs of Dental Origin Involved in Periodontal Regeneration

For the transplantation of dental origin MSCs to regenerate injured periodontium, it is essential to have at least three factors: blood supply, adequate molecular signals and proliferation, and differentiation towards the cellular precursors that are capable of regenerating the lost tissues (Figure 4).

During the formation of new periodontal tissues, it is necessary to have sufficient blood supply, because the molecules that are necessary for regeneration will arrive through vessels. DP-MSCs can exert a neovascularization effect that induces early granulation tissue, which, in the case of periodontitis, is followed by the formation of a vascular network in the periodontal niche [65,67].

There is even evidence that after transplantation of DP-MSCs from deciduous teeth, they can differentiate into functional blood vessels that connect to the recipient vessels [68].

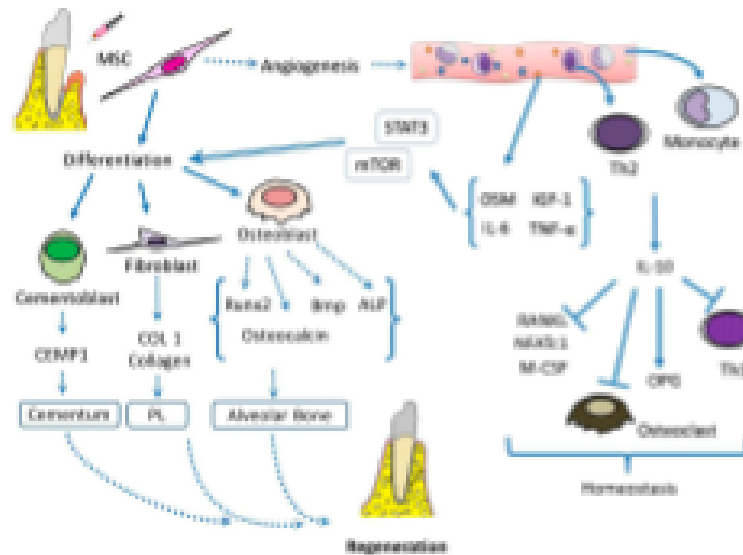


Figure 4. Putative mechanism involved in the regeneration of periodontal tissue via DP-MSCs. The placement of DP-MSCs allows the reformation of blood vessels that carry signals (IL-6, IGF-1, and TNF- $\alpha$  and osteostatin M-CSF) and cells (Th2 and monocytes) to the site of the lesion. Signals, via the STAT3 and mTOR pathways, will allow the DP-MSCs to be transformed into osteoblasts, which in turn will produce ligands to bone morphogenic protein 2 (BMP), alkaline phosphatase (ALP), and runt-related transcription factor 2 (Runx2) for the generation of alveolar bone, whereas the production of IL-10 and osteoprotegerin (OPG) will create a suitable microenvironment in which osteoclast activity is inhibited and tissue repair is promoted. On the other hand, DP-MSCs also differentiate into cementoblasts and fibroblasts, which secrete proteins such as CEMPI and COL1 for synthesis of cementum and collagen fibers of the periodontal ligament, respectively. Finally, the reformation of blood vessels, an environment with the indicated signals and the differentiation of DP-MSCs into the constituent cells of the periodontium, will jointly achieve the regeneration of periodontal tissues. PL: Periodontal ligament; BMP: Bone morphogenic protein; RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; NFKB1: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1; M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor.

To have a suitable means for DP-MSC differentiation, it is necessary to have signals that arrive through neovascularized blood vessels such as insulin-like growth factor 1 (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), and hepatocyte growth factor

(HGF) [89], which help to reduce inflammation and induce the regeneration of periodontal tissue. In addition, it is known that adequate amounts of TNF- $\alpha$  and IGF-1 are generated after the surgical procedure for the placement of cells, which contribute to regeneration [90].

TNF- $\alpha$  has no direct effect on the proliferation or cell cycle of DP-MSCs; however, it increases the mineralization of the extracellular matrix and the expression of mineralization-related genes such as bone morphogenic protein 2 (BMP2), alkaline phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (Runx2), and collagen I (COL-1) via the NF- $\kappa$ B pathway during osteogenic differentiation [91,92].

On the other hand, sufficient amounts of IGF-1 promote collagen synthesis in fibroblasts and differentiation into osteoblasts via the mTOR pathway and stimulate Runx2 and the production of osteocalcin [93]. Osteocalcin is also stimulated by IL-6. The presence of osteocalcin induces the production BMP2 and Runx2 ligands for the synthesis of extracellular matrix by osteoblasts [94].

Thus, while stimulating the synthesis of an extracellular matrix that is later to be mineralized is one factor, there are also others that play a crucial role in periodontal regeneration such as extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) [94]. MSC delivery has been shown to reduce the expression of MMP-1 and MMP-8 but to increase that of TIMP-2 and TIMP-4, whereby it is possible that MSC placement allows an optimal state of remodelling of the extracellular matrix during osteogenic differentiation [95].

On the other hand, both monocytes and Th2 lymphocytes that travel in the bloodstream produce IL-10, which in turn favours the expression of osteoprotegerin (OPG) and negatively regulates RANKL, NFATc1, and M-CSF, thereby decreasing differentiation and activation of osteoclasts by reducing bone resorption. At the same time, the inflammatory environment caused by Th1 is reduced, and the expression of Th2 and the anti-inflammatory microenvironment are favoured [96].

The third element to be taken into account is the DP-MSCs that are placed in the damaged periodontal tissue, which can proliferate and differentiate into the precursors of cementoblasts, osteoblasts, and fibroblasts that are responsible for the generation of alveolar bone, root cementum, and periodontal ligament, respectively.

Oncostatin M (OSM), which is a cytokine of the IL-6 family, as well as IL-6 itself, induces differentiation into preosteoblasts, since IL-6 is related to the production of ALP, which is required for the formation of osteogenic nodules, promotes the mineralization of the extracellular matrix, and increases the expression of genes associated with osteogenesis using the JAK3/STAT3 signalling pathway [97–99].

In an *in vivo* analysis of tissue formation, it was shown that the DP-MSCs from permanent and deciduous teeth can differentiate and form bone [100].

Finally, it has been observed that DP-MSCs differentiate into cementoblasts and fibroblasts, which, respectively, secrete the CEMP-1 protein and COL-1 for the synthesis of radicular cementum and collagen fibres of the periodontal ligament, respectively. In this way, the three elements contribute to functional periodontal regeneration [101]. (Figure 4).

#### 1.6. Current Challenges in MSC Dental Origin Use

Research on mesenchymal bone marrow stem cells is a widely explored field of knowledge; however, those of dental origin are in an incipient stage. In this sense, it could be argued that we still lack the requisite biological understanding of these cells to apply them to a human patient. Even something as elementary as the choice of differentiation markers that would allow a unified international understanding of the use of MSC of dental origin is a recurrent but elusive theme in research. However, this does not seem to impede the race to position MSCs as an alternative therapy.

Indeed, along with cutting-edge clinical trials, we continue to address issues that are related to the supply and procurement of enough cells for therapeutic purposes, their senescence prevention, and their guaranteed proliferation and expansion without detriment to their ability to differentiate. Beyond the questions of basic science, which will undoubtedly have to be resolved in the future, there are still issues that are related to *in vivo* functionality. Studies of xenotransplant have shown that it



is possible to form complex dentin, root cementum, periodontal ligament, tissues such as bone, etc. By transplanting MSCs of dental origin in various animal models, we have clear evidence that these stem cells have the potential to induce the formation of complex structures such as dental tissues (Table 1). However, these experimental animal data provided only an approximation of the anticipated behaviour in a human being. Clinical trials have not been widely reported and, as expected, at this early stage of their study, core issues regarding threats to human health and related questions need to be discussed.

The available human studies suggest that there are no adverse effects or ethical implications, but there are still very few of them that are needed to reach definitive conclusions. The history of medicine has taught us that an emerging procedure can rise to triumph only to eclipse later due to the development of unacceptable side effects [103]. This issue is exacerbated if the potential risk of the developing procedure exceeds its benefits. In this sense, the use of MSC of dental origin for the reconstruction of dental tissues could seem precipitous in the context of periodontitis, because it does not intrinsically endanger the life of the patient, and there are alternative procedures that are already widely known. However, despite the advances in current infections, this problem is closely associated with the loss of teeth. Therefore, the search for new therapeutic trends is still valid, and one proposal is the use of mesenchymal stem cells.

## 2. Conclusions

Biological, molecular, and clinical evidence supports the potential use of MSCs as an alternative therapy in diverse pathologies. In this sense, the use of MSCs of dental origin to repair and regenerate periodontal tissues can offer advantages over other more exploited cellular sources. Because of its similarity to target tissue and remarkable accessibility, it seems reasonable to conclude that using MSCs of dental origin to treat periodontitis is the most logical option. In addition, it would entail the least risk, since the therapeutic cells come from the same tissue that is intended to be cured, which would not be the case of MSCs that originated from bone marrow or adipose tissue. While this assumption needs to be verified in future studies, it does not, however, diminish the prospects for therapeutic use of MSC.

**Acknowledgments:** This work was financially supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Proyecto PAPIIT IN21815) and Programa en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

**Author Contributions:** Víctor Manuel Merediza-Núñez and Edelmiro Santiago-Osorio designed the main parts and led the development of the paper. Beatriz Hernández-Monjaraz, Alberto Moxroy-García, and Edgar Ledesma-Martínez performed the discussion and wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

ALP	Alkaline phosphatase
BMP2	Bone morphogenic protein 2
CSC	Cementum stem cells
COL-1	Collagen I
DFC	Dental follicle cells
DP-MSC	Dental pulp mesenchymal stem cells
DPSC	Permanent teeth stem cells
HGF	Hepatocyte growth factor
IL	Interleukin
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IMC	Intrafibrillary mineralized collagen
LPS	Lipopolysaccharides

M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MMPs	Matrix metalloproteinases
MSCs	Mesenchymal stem cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa beta
OPG	Osteoprotegerin
OSM	Oncostatin M
OxS	Oxidative stress
PL-MSC	Periodontal ligament mesenchymal stem cells
PGI <sub>2</sub>	Produce prostaglandin 2
PL	Periodontal ligament
PMNs	Polymorphonuclear neutrophils
ROS	Reactive oxygen species
Runt2	Runt-related transcription factor 2
SCAP	Stem cells from root apical papilla derived
SHED	Stem cells from both deciduous teeth
TNF- $\alpha$	Tumour necrosis factor alpha
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1
TIMPs	Tissue inhibitor of metalloproteinases
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## References

- Highfield, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust. Dent. J.* **2009**, *54*, 511–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Scannapieco, F.A.; Bush, R.B.; Paju, S. Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. *Ann. Periodontol.* **2003**, *8*, 38–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Heitz-Mayfield, L.J.; Tonello, L.; Heitz, E.; Needleman, I.; Miles, D. A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2002**, *29*, 92–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chattopadhyay, I.P.; Nam, S.Y.; Park, S.H.; Anil, S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J. Tissue Eng.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Armitage, G.C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000* **2004**, *34*, 9–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Xu, S.; Song, M.; Xiang, Y.; Liu, X.; He, Y.; Qin, Z. The association between periodontal disease and the risk of myocardial infarction: A pooled analysis of observational studies. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2017**, *17*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hux, Y.; Choi, S.K.; Ogata, Y.; Stark, P.C.; Levi, P.A.; Harizan, H.; Moritz, A. Consensus report Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Ann. Periodontol.* **1996**, *1*, 926–932.
- Page, R.C.; Kornman, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontology 2000* **1997**, *14*, 33–40. [[CrossRef](#)]
- Ford, P.J.; Carnocel, J.; Seymour, G.J. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **2004**, *53*, 111–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Donava-Panarea, V.T.; Popova, C.L.; Panou, V.E. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. *Folia Med.* **2014**, *56*, 152–160. [[CrossRef](#)]
- Meyle, J.; Chapple, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000* **2015**, *69*, 7–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nizam, M.; Gümrük, P.; Pitkinea, J.; Tervahartala, T.; Sorsa, T.; Bachmann, M. Serum and salivary matrix metalloproteinases, neutrophil elastase, myeloperoxidase in patients with chronic or aggressive periodontitis. *Inflammation* **2014**, *37*, 1771–1778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Syndergaard, B.; Al-Sabbagh, M.; Kyzioł, R.J.; Xi, J.; Ding, X.; Ebersole, J.L.; Miller, C.S. Salivary biomarkers associated with gingivitis and response to therapy. *J. Periodontol.* **2014**, *85*, e295–e303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Sorsa, T.; Tjälve-Laine, L.; Kontinen, Y.T.; Lashin, A.; Saki, T.; Lee, H.M. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann. Med.* **2006**, *38*, 306–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gamba, M.; Totan, A.; Miricescu, D.; Radulescu, R.; Virlan, J.; Calenic, B. Hydrogen Sulfide, Oxidative Stress and Periodontal Diseases: A Concise Review. *Antioxidants* **2016**, *5*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Fredriksson, M.; Gustafsson, A.; Asmar, B.; Bergström, K. Hyper-reactive peripheral neutrophils in adult periodontitis: Generation of chemiluminescence and intracellular hydrogen peroxide after *in vitro* priming and FcyR stimulation. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25*, 394–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Dahiya, P.; Kamal, R.; Gupta, R.; Bhardwaj, R.; Chaudhary, K.; Kaur, S. Reactive oxygen species in periodontitis. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2013**, *17*, 411–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Chapple, I.L.C.; Matthews, J.B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology* **2000** **2007**, *43*, 160–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pihlstrom, B.L.; Michalowicz, B.S.; Johnson, N.W. Periodontal diseases. *Lancet* **2005**, *366*, 1809–1820. [[CrossRef](#)]
20. Corlan Pătru, D.; Chahwiri, R.C.; Anghel, A.; Mihaescu, G.D.; Ciurug, A.N.; Popa, G.V.; Agap, D.F.; Buznic, C.J.; Sloj, I. Periodontal disease in diabetic patients—clinical and histopathological aspects. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2016**, *57*, 1323–1329. [[PubMed](#)]
21. Mateo-Cruz, R.; Bascones-Martínez, A. Tratamiento periodontal quirúrgico: Revisión. *Conceptos, Consideraciones, Procedimientos, Técnicas. Anales* **2011**, *23*, 135–170. [[CrossRef](#)]
22. Chen, F.M.; Zhang, J.; Zhang, M.; An, Y.; Chen, F.; Wu, Z.F. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7992–7997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Oertgenon, D.A.; Walheimsous, X.F.; Bronckers, A.L.; Meijer, G.J.; Jansen, J.A. Periodontal regeneration using an injectable bone cement combined with BMP-2 or FGF-2. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2014**, *8*, 202–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kato, A.; Miyaji, H.; Ishizuka, R.; Yokuraga, K.; Inoue, K.; Kozari, Y.; Yokoyama, H.; Sugaya, T.; Tanaka, S.; Sakagami, R.; et al. Combination of root surface modification with BMP-2 and collagen hydrogel scaffold implantation for periodontal healing in beagle dogs. *Open Dent. J.* **2015**, *9*, 52–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Needleman, L.G.; Worthington, H.V.; Gleditsys-Lopez, E.; Tucker, R.J. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, *3*, CD001724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kao, R.T.; Naran, S.; Reynolds, M.A. Periodontal regeneration—infra-bony defects: A systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J. Periodontol.* **2015**, *86*, 577–6108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slapke-Cortezbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Davis, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Morrison, S.J.; Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **2006**, *441*, 1068–1074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Young, H.E.; Duplaa, C.; Romero-Ramos, M.; Chesnot, M.F.; Wour'h, F.; Yost, M.J.; Brisson, K.; Terracio, L.; Asahara, T.; Masuda, H.; et al. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem. Biophys.* **2004**, *40*, 1–60. [[CrossRef](#)]
30. Hyun, I. The bioethics of stem cell research and therapy. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 71–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Bjerknes, M.; Cheng, H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric-epithelium. *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* **2002**, *283*, G2767–G2777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Xiao, L.; Tsuboi, T. Human dental mesenchymal stem cells and neural regeneration. *Hum. Cell* **2013**, *26*, 91–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Choi, Y.K.; Urrakshankhan, R.; Yoon, H.H.; Sen, Y.K.; Park, J.K. Effect of human mesenchymal stem cell transplantation on cerebral ischemic volume-controlled photothrombotic mouse model. *Biotechnol. J.* **2016**, *11*, 1397–1404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Su, W.C.; Chen, X.W. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth differentiate into functional hepatocyte-like cells by herbal medicine. *Biomater. Mater. Eng.* **2014**, *24*, 2243–2247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kim, M.J.; Kim, Z.H.; Kim, S.M.; Choi, Y.S. Conditioned medium derived from umbilical cord mesenchymal stem cells regenerates atrophied muscles. *Tissue Cell* **2016**, *48*, 533–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Rohban, R.; Pieber, T.R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 5173732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kurtzberg, J.; Prockop, S.; Teira, P.; Bittencourt, H.; Lewis, V.; Chan, K.W.; Horn, B.; Yu, L.; Talano, J.A.; Nemecek, E.; et al. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2014**, *20*, 229–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Tamaki, Y.; Nakahara, T.; Ishikawa, H.; Sato, S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology* **2013**, *101*, 121–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Blanpain, C.; Fuchs, E. Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science* **2014**, *344*, 1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Tsuji, W.; Rubin, J.P.; Marra, K.G. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J. Stem Cells* **2014**, *6*, 312–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Collart-Dutilleul, P.Y.; Chaubron, F.; De Vos, J.; Cuisinier, F.J. Allogenic banking of dental pulp stem cells for innovative therapeutics. *World J. Stem Cells* **2015**, *7*, 1010–1021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Cicconetti, A.; Sacchetti, B.; Bartoli, A.; Michienzi, S.; Corsi, A.; Funari, A.; Robey, P.G.; Bianco, P.; Riminacci, M. Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2007**, *104*, 618.e1–618.e12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mori, G.; Ballini, A.; Carbone, C.; Oranger, A.; Brunetti, G.; Di Benedetto, A.; Rapone, B.; Cantore, S.; Di Comite, M.; Colucci, S.; et al. Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *Int. J. Med. Sci.* **2012**, *9*, 480–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ivanowski, S.; Gronthos, S.; Shi, S.; Bartold, P.M. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis.* **2006**, *12*, 358–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Miura, M.; Gronthos, S.; Zhao, M.; Lu, B.; Fisher, L.W.; Robey, P.G.; Shi, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5807–5812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sonoyama, W.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Tuan, R.S.; Wang, S.; Shi, S.; Huang, G.T.J. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. *J. Endod.* **2008**, *34*, 166–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Seo, B.M.; Miura, M.; Gronthos, S.; Bartold, P.M.; Balouli, S.; Ibrahim, J.; Young, M.; Robey, P.G.; Wang, C.Y.; Shi, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **2004**, *364*, 149–155. [[CrossRef](#)]
48. Gronthos, S.; Mankani, M.; Ibrahim, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSC) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13625–13630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Karbanová, J.; Soukup, T.; Suchánek, J.; Pytlík, R.; Corbeil, D.; Mokry, J. Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low serum-containing medium. *Cells Tissues Organs* **2011**, *193*, 344–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Sonoyama, W.; Liu, Y.; Pang, D.; Yamaza, T.; Seo, B.M.; Zhang, C.; Liu, H.; Gronthos, S.; Wang, C.Y.; Shi, S.; et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE* **2006**, *1*, e79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Handa, K.; Saito, M.; Tsuruda, A.; Yamauchi, M.; Hattori, S.; Sato, S.; Toyoda, M.; Tsumaka, T.; Narayanan, A.S. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect. Tissue Res.* **2002**, *43*, 406–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Chen, F.M.; Sun, H.H.; Lu, H.; Yu, Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6320–6344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yang, X.; Van der Kraan, P.M.; Bian, Z.; Fan, M.; Walboomers, X.F.; Jansen, J.A. Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells. *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 1020–1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Stevens, A.; Zulfiani, T.; Olszajn, C.; LeRoy, H.; Obriot, H.; Kerr-Conte, I.; Formstecher, P.; Bailliez, Y.; Polakowska, R.R. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev.* **2008**, *17*, 1175–1184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wang, X.; Sha, X.J.; Li, G.H.; Yang, F.S.; Ji, K.; Wen, L.Y.; Liu, S.Y.; Chen, L.; Ding, Y.; Xuan, K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch. Oral Biol.* **2012**, *57*, 1231–1240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Ching, H.S.; Luddin, N.; Rahman, I.A.; Ponnusaj, K.T. Expression of Odontogenic and Osteogenic Markers in DPSCs and SHED: A Review. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *12*, 71–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Fiordomenico, L.; Borsi, L.; Calvitti, M.; Rondelli, D.; Arpinati, M.; Chirumbolo, G.; Becchetti, E.; Marchionni, C.; Alviano, F.; Fossati, V.; et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* **2005**, *80*, 836–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. La Nasa, M.; Paimo, E.; Spina, A.; Naddlen, P.; Montella, R.; Desiderio, V.; De Rosa, A.; Papaccio, G.; Tirino, V.; Laino, L. Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *J. Dent.* **2014**, *42*, 761–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Bright, R.; Hynes, K.; Gronthos, S.; Bartold, P.M. Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: A systematic review. *J. Periodontol. Res.* **2015**, *50*, 160–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Fu, X.; Jin, L.; Ma, P.; Fan, Z.; Wang, S. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. *J. Periodontol.* **2014**, *85*, 845–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Ohkoshi, S.; Hara, H.; Hirota, H.; Watanabe, K.; Hasegawa, K. Regenerative medicine using dental pulp stem cells for liver diseases. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **2017**, *8*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Da Costa Gonçalves, E.; Grings, M.; Nunes, N.S.; Pinto, F.D.; Garcia, T.N.; Viçôli, E.; Leipnitz, G.; Paz, A.H. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. *Biotechnol. Lett.* **2017**, *39*, 613–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Otaki, S.; Ueshima, S.; Shiraiishi, K.; Sugiyama, K.; Hamada, S.; Yorimoto, M.; Matsuo, O. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol. Int.* **2007**, *31*, 1191–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Aksel, H.; Huang, C.T. Human and Swine Dental Pulp Stem Cells Form a Vasculature-like Network after Angiogenic Differentiation in Comparison with Endothelial Cells: A Quantitative Analysis. *J. Endod.* **2017**, *43*, 588–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wu, Y.; Chen, L.; Scott, P.G.; Tredget, E.E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* **2007**, *25*, 2646–2659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Han, J.; Menicanin, D.; Marino, V.; Ge, S.; Mrozik, K.; Gronthos, S.; Bartold, P.M. Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model. *J. Periodontol. Res.* **2014**, *49*, 333–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Yu, N.; Cortgiessen, D.A.; Bronckers, A.L.; Yang, F.; Walboomers, X.F.; Jansen, J.A. Enhanced periodontal tissue regeneration by periodontal cell implantation. *J. Clin. Periodontol.* **2013**, *40*, 698–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Mrozik, K.M.; Wada, N.; Marino, V.; Richter, W.; Shi, S.; Wheeler, D.L.; Gronthos, S.; Bartold, P.M. Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. *Regen. Med.* **2013**, *3*, 711–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Khosravan, A.; Eslaminejad, M.B.; Arabshahi, M.; Paknejad, M.; Chordi, B.; Rokn, A.R.; Moslemi, N.; Nazarian, H.; Jahangir, S. Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. *J. Oral Implantol.* **2013**, *39*, 433–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. D’Aquino, R.; De Rosa, A.; Lanza, V.; Tirino, V.; Laino, L.; Graziano, A.; Desiderio, V.; Laino, G.; Papaccio, G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur. Cell Mater.* **2009**, *18*, 75–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Almetti, M.; Ferrarotti, F.; Cricenti, L.; Mariani, G.M.; Romano, F. Autologous dental pulp stem cells in periodontal regeneration: A case report. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2014**, *14*, s27–s33. [[CrossRef](#)]
72. Cao, Y.; Liu, Z.; Xie, Y.; Hu, J.; Wang, H.; Fan, Z.; Zhang, C.; Wang, J.; Wu, C.T.; Wang, S. Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine. *Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *6*, 249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Wang, L.; Shen, H.; Zheng, W.; Tang, L.; Yang, Z.; Gao, Y.; Yang, Q.; Wang, C.; Duan, Y.; Jin, Y. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17*, 1015–1026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Iwata, T.; Yamato, M.; Tsuchioka, H.; Takagi, K.; Mukohata, S.; Watanabe, K.; Okano, T.; Ishikawa, I. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2716–2723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Park, J.Y.; Jeon, S.H.; Chung, P.H. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. *Cell Transplant.* **2011**, *20*, 271–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Suid, F.F.; Ribeiro, F.V.; Gomes, T.R.; Silverio, K.C.; Carvalho, M.D.; Nociti, F.H. Autologous periodontal ligament cells in the treatment of Class III furcation defects: A study in dogs. *J. Clin. Periodontol.* **2012**, *39*, 377–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Liu, Y.; Zheng, Y.; Ding, G.; Fang, D.; Zhang, C.; Bartold, P.M.; Gronthos, S.; Shi, S.; Wang, S. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells* **2008**, *26*, 1065–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Ding, G.; Liu, Y.; Wang, W.; Wei, F.; Liu, D.; Fan, Z. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells* **2010**, *28*, 1829–1838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Zhang, C.; Yan, B.; Cui, Z.; Cui, S.; Zhang, T.; Wang, X. Bone regeneration in minipigs by intrafibrillarly-mineralized collagen loaded with autologous periodontal ligament stem cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Feng, F.; Akiyama, K.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Wang, T.M.; Chen, J.H.; Wang, B.B.; Huang, G.J.; Wang, S.; Shi, S. Utility of PDG<sub>FR</sub> progenitors for in vivo tissue regeneration: A report of 3 cases. *Oral Dis.* **2010**, *16*, 20–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Chen, F.M.; Gao, L.N.; Tian, B.M.; Zhang, X.Y.; Zhang, Y.J.; Dong, G.Y.; Lu, H.; Chu, Q.; Xu, J.; Yu, Y.; et al. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: A randomized clinical trial. *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Xie, H.; Liu, H. A novel mixed-type stem cell pellet for cementum/periodontal ligament-like complex. *J. Periodontol.* **2012**, *83*, 805–815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Han, C.; Yang, Z.; Zhou, W.; Jin, F.; Song, Y.; Wang, Y.; Huo, N.; Chen, L.; Qian, H.; Hou, R.; et al. Periapical follicle stem cell: A promising candidate for cementum/periodontal ligament regeneration and bio-root engineering. *Stem Cells Dev.* **2010**, *19*, 1405–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Liu, J.; Wang, L.; Liu, W.; Li, Q.; Jin, Z.; Jin, Y. Dental follicle cells rescue the regenerative capacity of periodontal ligament stem cells in an inflammatory microenvironment. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Shi, S.; Bartold, P.M.; Miura, M.; Sen, B.M.; Robey, P.G.; Gronthos, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod. Craniofacial Res.* **2005**, *8*, 191–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Nufiez, J.; Sanz-Blasco, S.; Vignoletti, F.; Munoz, P.; Arzate, H.; Villalobos, C. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J. Periodontol. Res.* **2012**, *47*, 33–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Chen, Y.J.; Zhao, Y.H.; Zhao, Y.J.; Liu, N.X.; Lv, X.; Li, Q.; Chen, F.M.; Zhang, M. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res.* **2015**, *361*, 439–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Sakai, V.T.; Zhang, Z.; Dong, Z.; Neiva, K.G.; Machado, M.A.; Shi, S.; Santos, C.F.; Nör, J.E. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 791–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Kawai, T.; Katagiri, W.; Otagi, M.; Sagimura, Y.; Hibi, H.; Ueda, M. Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 369–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Feng, X.; Feng, G.; Xing, J.; Shen, B.; Li, L.; Tan, W.; Xu, Y.; Liu, S.; Liu, H.; Jiang, J.; Wu, H. TNF- $\alpha$  triggers osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the NF- $\kappa$ B signalling pathway. *Cell Biol. Int.* **2013**, *37*, 1267–1275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Qin, Z.; Fang, Z.; Zhao, L.; Chen, J.; Li, Y.; Liu, G. High dose of TNF- $\alpha$  suppressed osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J. Mol. Histol.* **2015**, *46*, 409–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Feng, G.; Shen, Q.; Lian, M.; Gu, Z.; Xing, J.; Lu, X.; Huang, D.; Li, L.; Huang, S.; Wang, Y.; et al. RAC1 regulate tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated impaired osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Dev. Growth Differ.* **2015**, *57*, 497–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Ochiai, H.; Okada, S.; Saito, A.; Hoshi, K.; Yamashita, H.; Takato, T. Inhibition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression by prolonged transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) administration suppresses osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 22654–22661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. Kasper, G.; Glaeser, J.D.; Geissler, S.; Ode, A.; Tuischer, J.; Matziolis, G.; Perka, C.; Duda, G.N. Matrix metalloproteinase activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior. *Stem Cells* **2007**, *25*, 1985–1994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Page-McCaw, A.; Ewald, A.J.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 221–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rifas, I.; Arackal, S.; Weitzmann, M.N. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 650–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Song, H.Y.; Jeon, E.S.; Kim, J.L.; Jung, J.S.; Kim, J.H. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *101*, 1238–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Almaliki, S.G.; Agrawal, D.K. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Feng, X.; Shen, S.; Cao, P.; Zhu, L.; Zhang, Y.; Zheng, K.; Feng, G.; Zhang, D. The role of oncostatin M regulates osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells through STAT3 pathway. *Cytotechnology* **2016**, *68*, 2699–2709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Huang, C.T.; Gronthus, S.; Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 792–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Torii, D.; Tsutsui, T.W.; Watanabe, N.; Konishi, K. Bone morphogenetic protein 7 induces cementogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *Odontology* **2016**, *104*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Thrasher, A.J.; Gaspar, H.B.; Baum, C.; Modlich, U.; Schambach, A.; Candotti, F.; Otsu, M.; Sorrentino, B.; Scobie, I.; Cameron, E.; et al. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity. *Nature* **2006**, *443*, E5–E6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Células troncales mesenquimales como tratamiento para enfermedad periodontal en adultos mayores

## Caso clínico

Beatriz Hernández Monjaraz

Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Edgar Ledezma Martínez

Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Rosa Diana Hernández Palacios

Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Vicente Manuel Mendoza Núñez

Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

## Resumen

**Introducción.** Actualmente, existe una gama de tratamientos para recuperar los tejidos perdidos a causa de la enfermedad periodontal (EP); sin embargo, la restitución íntegra de las estructuras resulta complicada, sobre todo en la población de adultos mayores.

Considerando que las células troncales mesenquimales (MSC), están involucradas en el crecimiento, cicatrización de heridas, reemplazo celular y también inducen reparación en diferentes clases de tejido, se ha propuesto la aplicación *in situ* de MSC como una alternativa para regenerar el tejido dañado por la EP.

**Objetivo.** Aplicar células troncales mesenquimales en un adulto mayor para estandarizar la técnica y mostrar su utilidad terapéutica en enfermedad periodontal.

**Resultados.** Después de la aplicación de MSC la paciente no mostró signos de rechazo y se eliminó la movilidad dental y la inflamación ocasionada por la EP.

**Conclusiones.** La terapia periodontal regenerativa con MSC representa una opción para el tratamiento

de los defectos óseos ocasionados por la enfermedad periodontal en los adultos mayores.

**Palabras clave:** Células troncales mesenquimales, terapia celular, enfermedad periodontal.

## Introducción

La enfermedad periodontal (EP) es una enfermedad inflamatoria crónica de los tejidos de soporte del diente, que se presenta por lo general después de los 45 años y afecta hasta en un 90% a las personas mayores de 75 años; se caracteriza por sangrado gingival, formación de bolsas periodontales, destrucción de tejido conectivo y pérdida de hueso alveolar.<sup>1,2</sup>

La característica esencial de la EP es la destrucción del tejido periodontal, lo cual es consecuencia de la respuesta inmune del huésped ante diversos microorganismos. Cuando la inflamación de tejidos se mantiene por cierto tiempo, provoca la destrucción tisular, migración apical del epitelio de inserción, formación de bolsas periodontales, destrucción del hueso alveolar, y finalmente la pérdida del diente.<sup>3,4</sup>

La enfermedad periodontal (EP) es causa de pérdidas dentales prematuras y se ha correlacionado con diversos padecimientos, tales como aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, descontrol en el tratamiento de la diabetes, lenta curación de heridas, neumonía, osteoporosis, enfermedad renal, obesidad, síndrome metabólico, cáncer de páncreas e incluso enfermedad de Alzheimer.<sup>5,6</sup> En este contexto la utilización de células troncales mesenquimales como una alternativa terapéutica para enfermedad periodontal en adultos mayores tendría un gran impacto en su salud y calidad de vida, con repercusiones en su economía y disminución de riesgos para enfermedades sistémicas; por lo cual resulta fundamental su tratamiento.<sup>7</sup>

En cuanto a éste, generalmente se organiza en dos fases terapéuticas: la primera consiste en la eliminación mecánica de los factores locales como la placa dentobacteriana y el cálculo supra y subgingival; mientras que la segunda fase es



quirúrgica y pretende la recuperación del tejido perdido.<sup>8</sup>

Aunque ambas fases se llevan a cabo cotidianamente en los consultorios dentales, el efecto global de estos tratamientos convencionales son relativamente modestos y limitados; por lo cual, en los últimos años se han buscado nuevas alternativas como la aplicación de la ingeniería de tejidos para recuperar las estructuras destruidas por la EP. Dado que en el caso de la EP, el tejido neo-formado podría ser defectuoso, se ha propuesto el injerto de células troncales mesenquimales exógenas para producir nuevos tejidos y crear un microambiente adecuado para la regeneración de los mismos.<sup>9</sup>

En este sentido, las células troncales mesenquimales (MSC, del inglés Mesenchymal Stem Cells), también denominadas "células madre", son células multipotentes que se originan a partir del mesodermo y tienen la capacidad de autorenovarse y diferenciarse en diversas células tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>10</sup> Puesto que las MSC presentan un gran potencial de generar cartílago, hueso, músculo, tendón, ligamento y tejido adiposo, entre otros, se han llevado a cabo protocolos en modelos animales que permitan corregir los defectos periodontales a través del uso de progenitores endógenos y así promover la curación óptima de la enfermedad.<sup>11</sup>

Por otra parte, evidencias experimentales y clínicas, sugieren que la pulpa dental contiene MSC, con características específicas que podrían regenerar el periodonto.<sup>12</sup> De esta manera, las MSC aisladas de pulpa dental, pueden considerarse adecuadas para ingeniería de tejidos al diferenciarse en varios tipos de células como osteoblastos, osteocitos, odontoblastos y condrocitos.<sup>13</sup> Desafortunadamente, pese a los resultados prometedores de la aplicación de MSC en la EP en modelos animales, la diversidad metodológica de estos estudios hace que el paso a la fase clínica sea incipiente.

Por tal motivo el propósito del presente estudio es presentar los resultados de un caso clínico en el que se aplicaron MSC a una persona adulta mayor como tratamiento para la EP, con la finalidad de estandarizar la técnica y evidenciar la utilidad terapéutica que permita sustentar un ensayo clínico experimental.

### Caso clínico

Se presenta el caso de paciente femenina de 68 años de edad que acudió al Servicio de Odontología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, por presentar movilidad en el incisivo lateral superior derecho, dolor y sangrado ocasional.

Al interrogatorio por aparatos y sistema, refirió ausencia de enfermedades crónico degenerativas



Figura 1. Medición de bolsa periodontal en el incisivo lateral superior.

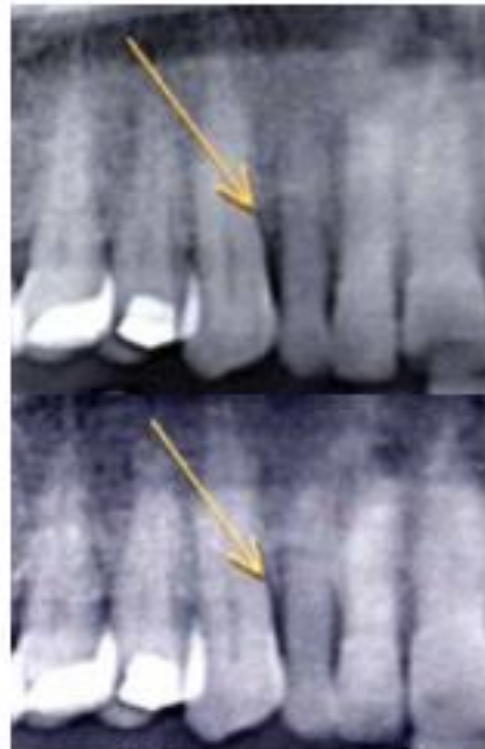


Figura 2. Radiografía periapical. Se muestra defecto óseo (flecha) b) radiografía postoperatoria que muestra defecto óseo (flecha) después de 6 meses de la intervención.



Figura 3. Reducción de la profundidad de bolsa en incisivo lateral superior.



y alergias. También negó antecedentes neoplásicos, alcoholismo y tabaquismo. Al examen clínico intrabucal la paciente presenta restauraciones desajustadas en molares superiores derechos, zonas edéntulas en molares inferiores y movilidad grado 2 en el incisivo lateral derecho superior; al sondaje se encontró la presencia de bolsa periodontal de 4mm en la cara vestibular del diente afectado (Figura 1).

Por lo cual, se consideró a la paciente como candidata para la aplicación de MSC y se procedió a solicitar el consentimiento informado y a realizar la valoración preoperatoria que consistió en la toma de estudios de laboratorio y exámenes radiográficos basales donde se identificó defecto óseo vertical (Figura 2.a); paralelamente, se inició la primera fase de terapia periodontal durante 4 semanas que incluyó instrucciones de cuidado e higiene bucal, así como eliminación de cálculo supragingival.

Para la obtención de las MSC, se aislaron las células de la pulpa de un diente decíduo, las cuales se cultivaron hasta obtener  $1 \times 10^6$  células y se colocaron en 0.5ml de solución de Tampón Fosfato Salino (PBS por sus siglas en inglés).

Para la aplicación alogénica de MSC, se realizó un colgajo mucoperiostico, preservando la papila, en la zona del incisivo lateral superior derecho, bajo anestesia local con lidocaína y epinefrina. Posterior al raspado y alisado de la raíz del incisivo lateral, se colocaron 5 mm<sup>2</sup> de colágena en la zona lesionada y se aplicaron  $1 \times 10^6$  MSC. El colgajo se reposicionó mediante puntos aislados de sutura. Finalmente, se le dieron indicaciones higiénico, dietéticas y farmacológicas a la paciente que incluyeron aseo riguroso de la zona con clorhexina al 0.2%, dieta blanda y antibioterapia con 500mg de metronidazol y clindamicina de 300mg ambos cada 8 horas durante 5 días.

El seguimiento de la paciente se realizó a los 7, 14, 28 y 180 días después de la cirugía periodontal. La paciente refirió ligera inflamación y dolor escaso los 2 días inmediatos a la cirugía, posterior a ello, la recuperación continuó sin contratiempos.

Finalmente, se dio seguimiento clínico y radiográfico a los 6 meses (Figura 2.b), durante la cual se observó que no había movilidad dental (movilidad = 0) así como una medición de surco gingival de 3mm. (Figura 3) Hasta el momento la paciente muestra una evolución clínica favorable.

## Discusión

Desde hace algunos años, la periodoncia se ha apoyado de otras áreas como la biología y la medicina regenerativa para diseñar nuevas propuestas que amplíen el abanico de posibilidades de los pacientes que padecen defectos óseos a consecuencia de la

enfermedad periodontal (EP).<sup>14</sup>

Dentro de estos nuevos enfoques terapéuticos, se encuentra la aplicación de células troncales mesenquimales (MSC) como una opción segura que gracias a sus características similares a las obtenidas de médula ósea<sup>15</sup> y aunado a su baja inmunogenicidad, brindan de manera alogénica los elementos indispensables para la regeneración de tejido evitando el uso de la inmunoterapia.<sup>2</sup>

A pesar que existen diversas fuentes de MSC en el organismo, las adquiridas de pulpa dental de dientes deciduos son una opción que es mínimamente invasiva.<sup>16</sup>

En este estudio se observó que no existe rechazo de tipo inmunológico de MSC por parte del organismo aceptor, lo cual da un soporte de que el uso alogénico de las MSC posibilitan su aplicación segura.

Por otra parte, la literatura reporta que el tratamiento con MSC puede ser efectivo para la recuperación del hueso perdido por la EP<sup>17</sup> en este sentido, la evaluación clínica de la paciente muestra una reducción en la profundidad de la bolsa periodontal (Figura 3). Aunque el estudio radiográfico muestra escasa evidencia de hueso neo-formado, se espera que en controles posteriores a los 12 y 18 meses se observen más cambios. Finalmente, para brindar una mejor evaluación del estado óseo de la paciente sería conveniente realizar una tomografía. La regeneración periodontal además de realizarse a través de MSC de pulpa dental, también ha mostrado resultados favorables en humanos con células madre mesenquimales (CMM) de médula y plasma rico en plaquetas.<sup>18</sup>

## Conclusiones

Los resultados del caso clínico sugieren que la terapia periodontal regenerativa con MSC representa una alternativa para el tratamiento de los defectos óseos ocasionados por la enfermedad periodontal en los adultos mayores. Sin embargo es necesario continuar con la investigación básica que permita dilucidar los mecanismos involucrados en el proceso, así como llevar a cabo ensayos clínicos controlados con muestras representativas para recomendar su aplicación en la práctica clínica.

## Agradecimientos

El caso clínico se llevó a cabo con el apoyo del Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; DCAPA (Proyecto PAPIIT IN221815); Banco de Cordón Umbilical (BCU).



## Referencias bibliográficas

1. Taboada-Arango C, Mendoza-Méico VM, Hernández-Palacios D, Martínez-Zandano I. Prevalencia de caries dental en un grupo de pacientes de la tercera edad. *Revista ADM* 2020; 32(74): 188-192.
2. Taboada-Arango C, Gómez-Gutiérrez Y, Taboada-Arango C, Mendoza-Méico VM. Prevención de signos y síntomas de los trastornos temporomandibulares en un grupo de adultos mayores. *Rev ADM* 2020; 32(75): 175-179.
3. Ballini A, Carbone G, Ferraraccio D, Cirilli M, Inciampola G, et al. Periodontal disease and bone pathogenesis: the crosstalk between cytokines and porphyromonas gingivalis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2019; 31(2): 273-81.
4. Lindhe J, Jönberg B, Lindqvist M. Same microbiological features of periodontal disease in man. *J Periodontol*. 1983; 54: 364-68.
5. Kao LC, Polunin AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*. 2020; 150: 817-822.
6. Campisi G, Chiappelli M, De Martinis M, Franco V, Giacchi L, Orsillo R, Licenzi S, Liu D. Pathophysiology of age-related diseases. *Human Aging*. 2020; 122.
7. Katsikenda B, Koppola P, Barozzi K, Misra A. Periodontal systemic connections: Bone Mineral Density: A Review of the Evidence with Implications for Medical Practitioners. *Int J Health Sci (Gaines)*. 2016; 10(7): 1093-102.
8. Matthews DC. Prevention and treatment of periodontal diseases in primary care. *Dent Based Dent*. 2014; 16(3): 60-9.
9. Yamamoto Y, Inada T, Kinoshita A, Wada K, Yoshida T, Yamada A, et al. Allogeneic Transplantation of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets in Canine Critical-Site Supra-Alveolar Periodontal Defect Model. *Stem Cells Open Access*. 2016; 5(1): 22-36.
10. Kishi NY, Ajiro SA, Akhavan-Ardebil. Dental pulp stem cells: Biology and use for periodontal tissue engineering. *Stem Cell J*. 2015; 16(12): 1001-9.
11. Inaba EA, Mironov P, Kizomov P. Cell therapy of periodontum: Is an animal to human? *Front Physiol*. 2015; 4: 325.
12. Mitsu M, Grubisic S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(10): 5807-12.
13. Sappayama M, Ichino K, Wada H, Hatake H, Inaba M, Matsumoto K, et al. Dental pulp-derived CD34(+)CD45(-) cells population is multipotent cell enhancer necessary of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(10): 2803-8.
14. S. Kai, M. Kato, and S. Kato. Application of Stem Cells in Interoctodentary Dentistry and Beyond: An Overview. *Ann Med Health Sci Res*. 2013; 3(2): 245-54.
15. Fujita I. Stem cells, a resource for patients and dentists. *Int J Periodont Dent*. 2016; 16(2): 89.
16. Ding G, Wu J, Liu Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor- $\beta$ . *Stem Cells*. 2015; 33(2): 81-90.
17. Carragano L, Cordeiro MM, Hsu SA, Hill JC. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. 2016; 99(1): 7.
18. Yamada Y, Inada M, Hibi H, Inaba S. Nueva técnica de regeneración de tejidos periodontales con células madre mesodérmicas y plasma rico en plaquetas mediante tecnología de ingeniería tisular. *Conexión: Rev Internacional de Odontol Estética adora a Periodoncia*. 2016; 10(14): 176-177.

## X.4 Reconocimientos



ASOCIACIÓN MEXICANA DE GERONTOLOGÍA Y GERIATRÍA A.C.

otorga el presente

### RECONOCIMIENTO

a

2DO. LUGAR ( T.L. MODALIDAD "ORAL" )

Beatriz Hernández Monjaraz, Edelmiro Santiago Osorio, Victor Manuel  
Mendoza Núñez.

por su participación como ponente en el XXXI Congreso Internacional AMGG 2016  
del 26 al 29 de Octubre del 2016 en el Palacio de la Escuela de Medicina de la UNAM.

"Células Madres: Una Alternativa para el Tratamiento  
de Enfermedad Periodontal en Adultos Mayores".

Dr. Ignacio Javier Orozco García  
Presidente

Dr. Sergio Valdés y Rojas  
Secretario





## X.5 Formación de recursos humanos



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA  
CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA**

**"EFECTO ANTIOXIDANTE DEL TRATAMIENTO DE  
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE PULPA  
DENTAL EN ADULTOS MAYORES CON ENFERMEDAD  
PERIODONTAL. REPORTE DE TRES CASOS".**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
CIRUJANA DENTISTA  
P R E S E N T A  
YESSENIA ALINE CRUZ FLORES**

**DIRECTOR: DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**

**ASESORA: M. en C. BEATRIZ HERNANDEZ**

**MONJARAZ**

**Ciudad de México, Abril 2018**



## X.6 Presentación en congresos nacionales





UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

## CONSTANCIA

Que otorga la  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA  
a través del Departamento  
de Educación Continua

a *Beatriz Hernández Monjaraz, Edelmiro Santiago  
Osorio, Alberto Monroy García, Andrés Alcauter  
Zavala, Víctor Manuel Mendoza Núñez*

Por la presentación del Trabajo en Cartel: **El tratamiento con Células Troncales Mesenquimales Disminuye los Niveles de Citocinas Inflamatorias en la Enfermedad Periodontal**, dentro del 13° Congreso de Investigación, organizado por la División de Estudios de Posgrado e Investigación de esta Facultad el 16 de octubre del año en curso.

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Ciudad de México, a 20 de octubre de 2017.



Lic. Guillermo Maldonado Pérez  
Jefe del Departamento







ASOCIACIÓN MEXICANA DE GERONTOLOGÍA Y GERIATRÍA A.C.

otorga la presente

## CONSTANCIA

a

*Beatriz Hernández Monjaraz*

por su asistencia al XXXI Congreso Internacional AMGG 2016  
del 26 al 29 de Octubre del 2016 en el Palacio de la Escuela de Medicina de la UNAM.

Valor Curricular 44 Horas

  
Dr. Ignacio Javier Orozco García  
Presidente

  
Dr. Armando González Bedoy  
Secretario





UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



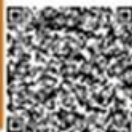
## CONSTANCIA

Que otorga la  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA  
a través del Departamento  
de Educación Continua

a *Beatriz Hernández Monjaraz, Edelmiro Santiago  
Osorio, Alberto Monroy García, Andrés Alcáuter  
Zavala, Victor Manuel Mendoza Núñez*

Por la presentación del Trabajo en Cartel: **Aplicación de Células Troncales Mesenquimales como Tratamiento para Enfermedad Periodontal en un Adulto Mayor**, dentro del 12º Congreso de Investigación, organizado por la División de Estudios de Posgrado e Investigación de esta Facultad, el 17 de octubre del año en curso.

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad de México, a 17 de octubre de 2016.



**Lic. Marissa Vivaldo Martínez**  
Jefa de la Unidad de Educación Continua y Desarrollo  
Académico







CERTIFICA QUE

**M. en C. Beatriz Hernández Monjaraz**

HA PARTICIPADO COMO EXPOSITOR CON EL POSTER

**Propuesta de una Técnica para la Implantación de Células Troncales de Pulpa Dental para el Tratamiento de Enfermedad Periodontal**

**IV Congreso Solcema "Células Madre: La Nueva Era de la Medicina"**

Realizado en Viña del Mar, Chile, el 23 de julio del 2016, con la Colaboración de RegenGroup

**Dr. Álvaro Skupin, FACP, FCCP, FASD**  
Presidente Solcema

**Dr. Raúl Ríos Ritter, PhD, FACOG**  
Presidente de Sochimreg - CEO RegenGroup



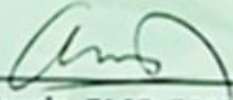
CERTIFICA QUE

*Dra. Beatriz Hernández*

HA PARTICIPADO COMO CONFERENCISTA EN EL

**IV Congreso Latinoamericano de Células Madre  
"Células Madre: La Nueva Era de la Medicina"**

Otorgado en Viña del Mar, Chile, el 23 de julio del 2016, con la Colaboración de RegenGroup

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Álvaro Skupin, FACP, FCCP, FASD**  
Presidente Solcema

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Raúl Ríos Bitter, PhD, FACOG**  
Presidente de Sochimreg - CEO RegenGroup



# LA SOCIEDAD MEXICANA PARA LA INVESTIGACIÓN EN CÉLULAS TRONCALES

Otorga la presente **CONSTANCIA** a

**BEATRIZ HERNÁNDEZ MONJARAZ**

Por su asistencia al

## **TERCER CONGRESO DE CELULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA**

México, D. F., 4-6 de noviembre de 2015

Auditorio Raoul Fournier Villada, Facultad de Medicina, UNAM

**Dr. Héctor Mayani Viveros**  
Presidente SOMICET

Unidad de Investigación Médica en  
Enfermedades Oncológicas, IMSS.

**Dr. Iván Velasco Velázquez**  
Vicepresidente SOMICET

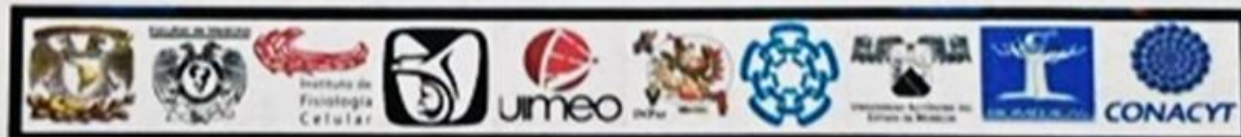
Instituto de Fisiología Celular,  
UNAM.

**Dra. María Antonieta Chávez G**  
Secretario SOMICET

Unidad de Investigación Médica en  
Enfermedades Oncológicas, IMSS.

**Dr. Jesús Chimal Monroy**  
Tesorero SOMICET

Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, UNAM.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Otorga la presente

CONSTANCIA

de:

*Beatriz Hernández Monjaraz, Víctor Manuel Mendoza Núñez*

Por haber presentado el trabajo *Células madre como opción terapéutica para el tratamiento de enfermedad periodontal en adultos mayores. Caso clínico* en la modalidad de ponencia en el "Primer Congreso Internacional Interdisciplinario sobre Vejez y Envejecimiento" con sede en la Unidad de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México del 10 al 12 de junio de 2015.

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Dr. Francisco José Trigo Tavera  
Secretario de Desarrollo Institucional

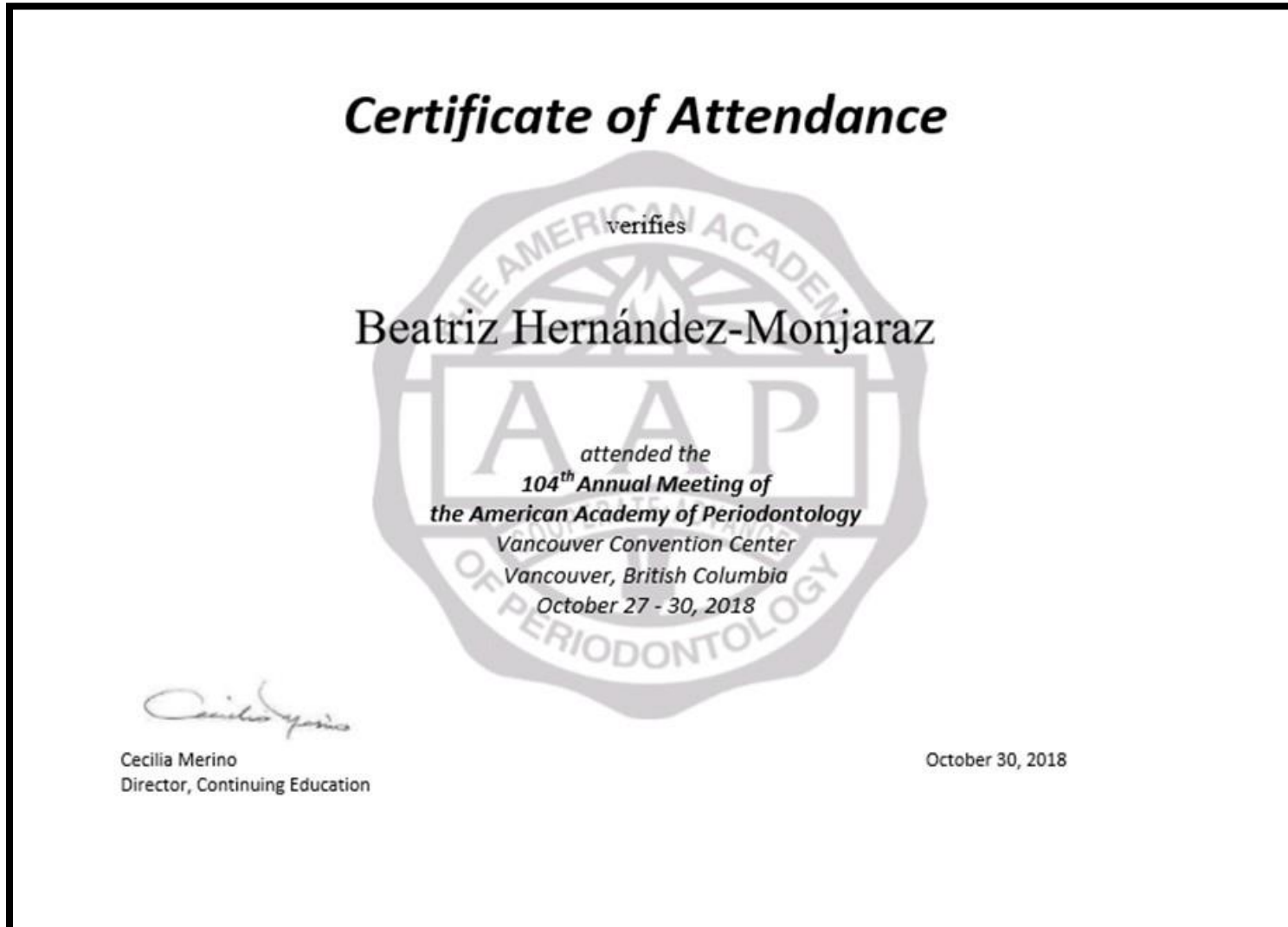
Dra. Verónica Montel de Oca Zavala  
Presidenta del I-CIVE

Dra. María Montero y López Lena  
Coordinadora del Comité Científico del CIVE





## X.7 Presentación en congresos internacionales





## CERTIFICATE OF ATTENDANCE

24th Annual Meeting of the  
Society for Redox Biology and Medicine

This certifies that

**Beatriz Hernández-Monjaraz**

has attended SfRBM 2017 and presented a poster presentation titled  
"Dental pulp mesenchymal stem cells for treatment of periodontal disease and its  
relationship with oxidative stress markers" during SfRBM 2017 held November 29 -  
December 2, 2017 at the Hilton Baltimore in Baltimore, MD, USA.

Kent Lindeman, CMP  
Executive Director  
December 2, 2017



## 186 - Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Periodontal Disease and its Relationship with Oxidative Stress Markers

Beatriz Hernández-Monjaraz<sup>\*</sup>, Mirna Ruiz-Ramos, Víctor Manuel Mendoza-Núñez

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.199>

[Get rights and content](#)

### Background

Periodontal disease (PD) is a chronic disease of the tooth supporting tissues, characterized by gingival bleeding, periodontal pocket formation, destruction of connective tissue attachment and alveolar bone loss. In this sense, it has been pointed out that oxidative stress (OxS) is involving in the pathogenesis of PD. A therapeutic option to regenerate tissues for loss due to PD is the placement of mesenchymal stem cells derived from tooth pulp (MSC). MSCs generate a protective environment against OxS, *in vitro*, where respiratory burst is regulated downwards, thereby protecting the surrounding tissues from this damage. Experimental reports in animal models suggest that MSCs have antioxidant potential and, consequently, the ability to reduce OxS. In light of these findings, a decrease in oxidative damage in periodontal tissues can be expected after application of dental pulp MSC.

### Objective

To determine the effect of Dental Pulp MSC on OxS and PD.

## Methods

It was carried out a cases series of 10 patients with PD. Clinical measurements and saliva samples were collected before and after 3 and 6-months of Dental Pulp MSC application. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), superoxide dismutase (SOD) and total antioxidant capacity (TAC) were spectrophotometrically assayed in saliva.

## Results

Application of Dental Pulp MSC showed a decreased in mean of clinical parameters at 6 months ( $4.6\pm 0.9$  to  $3.8\pm 0.8$  mm). It was also found a statistically significant decrease in TBARS at 6 months ( $0.0826\pm 0.018$  to  $0.0381\pm 0.042$   $\mu\text{mol/L}$ ). Salivary SOD levels were significantly higher at 3 months ( $1.500\pm 0.777$  to  $2.754\pm 1.32$  U/l) ( $p>0.05$ ).

## Conclusions

Our findings suggest that the treatment with DPMSC for periodontal disease has effect antioxidant.

Trial registry: ISRCTN 12831118