



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 527**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/077** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05764069 .0**

96 Fecha de presentación : **27.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1773987**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Células madre obtenidas de pulpa de dientes temporales o permanentes y de germen dental, que pueden producir tejido óseo humano.**

30 Prioridad: **28.07.2004 IT NA04A0043**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.06.2011**

73 Titular/es: **TESLAB S.R.L.**  
**Via G. Porzio, 4 Is A7**  
**80143 Napoli, IT**

72 Inventor/es: **Carinci, Francesco;**  
**D'Aquino, Riccardo;**  
**De Rosa, Alfredo;**  
**Graziano, Antonio;**  
**Laino, Gregorio y**  
**Papaccio, Gianpaolo**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 527 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Células madre obtenidas de pulpa de dientes temporales o permanentes y de germen dental, que pueden producir tejido óseo humano

**Antecedentes de la invención**

5 La rehabilitación estética, morfológica y funcional del área oromaxilofacial ha alcanzado un alto nivel en las últimas décadas, debido al progreso de todas las disciplinas relacionadas con la odontología, tales como la anestesiología, la microcirugía y la farmacología.

10 Sin embargo, la pérdida ósea todavía es la etapa limitante para alcanzar una buena rehabilitación. La pérdida ósea se puede clasificar con respecto al sitio (es decir, relacionada con el área periodontal, mandibular, craneomaxilofacial, etc.), la calidad, el origen embrionario, las propiedades óseas mecánicas (relacionadas con la fuerza del hueso esponjoso; Trisi P. y Rao W. Bone classification: clinical-histomorphometric comparison. Clin. Oral Implants Res. 1999, 10:1-7) y la cantidad (que se puede definir como el volumen total de hueso perdido).

El hueso perdido puede implicar el área periodontal, las mandíbulas, el esqueleto craneofacial y sitios de diferentes partes del cuerpo. Son varias las causas implicadas:

15 1 - Déficit de estructuras anatómicas que fijan los dientes a las mandíbulas. Los dientes se fijan en el hueso alveolar por medio del periodonto, compuesto de encía, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Son muchas las enfermedades periodontales debidas a factores genéticos y ambientales. El signo clínico es una resorción ósea alveolar y una pérdida de la unión a los dientes. El grado de enfermedad se puntúa como la pérdida ósea vertical y el número de paredes alveolares implicadas. Como la longitud máxima de raíz dental es alrededor  
20 de 20 mm, la pérdida ósea vertical máxima con los dientes todavía en su sitio no puede ser mayor (Lindhe J., Parodontología, Edi-Ermes, Milán, 1991). Las enfermedades periodontales son epidémicas. En algunas áreas geográficas, más del 10% de la población tiene bolsas periodontales que se pueden examinar a más de 5 mm (Orozco A.H. y col., Periodontal treatment needs in a native island community in Columbia. Int. Dent. J. 2004, 54: 73-76). Todos estos pacientes necesitan una terapia específica para restaurar el hueso alveolar perdido.

25 2 - Déficit de hueso en las mandíbulas. Estos déficits tienen varias causas, tales como edentulismo parcial o total (que provoca la resorción ósea alveolar), traumatismo y tumores. Entre los tumores, el carcinoma de células escamosas oral es la enfermedad maligna más frecuente de la boca con aproximadamente 30.000 nuevos casos y 8.000 pacientes muertos por año en los EE.UU. (Greenlee R., y col. Cancer statistic. Cancer J. Clin. 2001, 51: 15-36). Con respecto a los traumatismos faciales, no está disponible aún ningún informe nacional, pero el número  
30 de pacientes tratados es muy alto si se considera que un único centro puede operar a más de 1.000 pacientes por año (Gassner R. y col. Cranio-maxillo-facial trauma: a 10 year review of 9,543 cases with 21,067 injures. J Craniomaxillofacial Surg. 2003, 31: 51-61).

35 3 - Déficit de hueso en el área craneofacial.  
Existen varias causas que determinan la pérdida ósea. Entre ellas están las secuelas postraumáticas, la resección craneofacial para la eliminación de tumor y las malformaciones. Ejemplos de malformaciones congénitas que requieren injertos óseos autólogos son el labio leporino y la fisura palatina (en este caso el injerto óseo autólogo se inserta en la hendidura del borde alveolar) y el síndrome de Treacher-Collins (en este caso se usa una costilla para restaurar la mandíbula).

40 4 - Déficit de tejido óseo fuera de la región craneal.  
Existen varias causas que determinan la pérdida ósea. Entre ellas están las secuelas postraumáticas, la resección ósea para la eliminación de tumor y las malformaciones. En todos estos casos, la disponibilidad del hueso autólogo para restaurar el déficit es la etapa limitante que tiene que superar la cirugía ortopédica en la práctica diaria.

45 Como se indica anteriormente, el déficit óseo se puede clasificar como secundario (como en la enfermedad periodontal) si el defecto de volumen óseo es de aproximadamente unos pocos milímetros por lado y principal si la pérdida ósea es más grande.

Actualmente para corregir defectos óseos existen varios biomateriales y diferentes técnicas quirúrgicas. Todas ellas tienen ventajas y desventajas.

50 En defectos óseos secundarios, existen varios procedimientos médicos y quirúrgicos para evitar y restablecer la enfermedad periodontal. Sin embargo, cuando las enfermedades periodontales son graves, se necesita restaurar el déficit óseo. Esto se puede lograr usando material aloplástico o heterólogo/xenoinjerto. Ambos pueden producir osteoinducción y/o osteoconducción. En los mismos casos, el odontólogo puede usar membranas que determinan una separación física entre el epitelio y el hueso subyacente.

En los defectos óseos principales existen tres posibilidades terapéuticas: 1) uso de material aloplástico (tal como malla para reconstruir la mandíbula o prótesis de cadera), 2) uso de injerto óseo autólogo (tal como injerto de cresta ilíaca para reconstruir el arco mandibular o colgajos libres recogidos de fíbula, antebrazo, cresta ilíaca, etc.), 3) osteogénesis por distracción.

- 5 En cualquier caso, el estándar establecido es el uso de hueso autólogo. El uso de hueso heterólogo o de xenoinjerto puede conducir a que no se produzca autorreacción y también a una transmisión de enfermedades desconocidas, mientras que el uso de materiales no aloplásticos no restaura el déficit y además tiende a inducir infecciones y reacciones a cuerpos extraños. Actualmente existen varios límites a un uso extensivo de injertos óseos autólogos: 1) la morbilidad en el sitio donante (es decir, fíbula, antebrazo, cresta ilíaca, etc.) no siempre es aceptable en su conjunto si se considera que algunas veces el injerto falla; 2) la estrategia quirúrgica tiene costes relevantes con respecto a los instrumentos y al equipo de entrenamiento; 3) la recogida del injerto del sitio donante aumenta el tiempo de operación; 4) no es posible recoger una gran cantidad de hueso del sitio donante puesto que puede provocar secuelas en él.

- 10 Teniendo en cuenta lo que se indica anteriormente, se puede concluir que: 1) el déficit óseo es la etapa limitante en la reconstrucción odontológica, maxilofacial y ortopédica; 2) el hueso autólogo es el estándar establecido; 3) recoger hueso autólogo de un sitio diferente del mismo paciente conduce a riesgos adicionales para el paciente en sí, requiriendo un entrenamiento de equipo específico y tiene costes biológicos y económicos.

Una posible solución a estos factores adversos es el uso de un hueso autólogo producido *in vitro* usando citotipos específicos. Desde este punto de vista, el uso de células madre (que se pueden diferenciar en osteoblastos que producen hueso *in vitro*) puede ser una buena estrategia.

- 20 Las células madre son células caracterizadas por: 1) autorenovación (es decir, no hay límite con respecto al posible número de división celular); 2) compromiso y diferenciación en diferentes líneas celulares. En la bibliografía, se ha indicado la identificación de células madre derivadas de la médula ósea que se puede diferenciar en osteoblastos (Kuznetsov S.A., y col. Single-colony derived strains of human marrow fibroblasts from bone after transplantation in vivo. J. Bone Min. Res. 1997; 12, 1335-47; Pittenger M.F., y col. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999, 284, 143-147), pero no se describe la capacidad de estas células (denominadas células madre estromales de la médula ósea (BMSSC)) para producir hueso en una estructura tridimensional *in vitro*. Más recientemente, se ha descrito el aislamiento y la caracterización de células madre, derivadas de pulpa dental humana. (Gronthos S. y col., PNAS 2000, 97, 13625-13630; Gronthos S. y col., JDR 2002, 81, 531-535; Batouli S. y col., JDR 2003, 82, 976-981; patente de los EE.UU. n.º 20040058442 de Shi y col. Shi S y col., J. Bone Min, Res., 2003, 18, 696-703). Específicamente, la línea de células madre de pulpa dental (DPSC) es un precursor de osteoblastos y se caracteriza por: 1) la presencia de sialoproteína de la dentina específica; 2) la ausencia de producción ósea *in vitro*; 3) la producción de estructuras similares a la dentina *in vivo*, cuando las células se trasplantaron en ratones inmunodeficientes.

- 35 Miura M y col. (PNAS 2003; 100, 5807-5812) describen una clase adicional de células madre obtenidas a partir de la pulpa de dientes temporales, denominadas células madre de dientes temporales exfoliados humanos (SHED). Las células SHED se pueden diferenciar en osteoblastos *in vitro* pero necesitan la adición de BMP-4 al medio. Además las células SHED no se diferencian en osteoblastos cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes. Tanto las células SHED como DPSC no pueden producir tejido óseo *in vitro*.

- 40 Además tanto SHED como DPSC necesitan un vector cerámico para trasplantarse en el animal para obtener un tejido tridimensional.

- Son patentes adicionales, relacionadas con el estado de la técnica de la presente invención, la patente de los EE.UU. n.º 20020119180 (de Yelic y col.) y la patente de los EE.UU. n.º 20030068305 (de Sramek y col.). La patente de los EE.UU. n.º 20020119180 describe un procedimiento para producir germen dental en un modelo animal. Estos gérmenes dentales se pueden insertar potencialmente en encía humana para reemplazar los dientes perdidos. La patente de los EE.UU. n.º 20030068305 describe un procedimiento y una herramienta específica para recoger la pulpa dental.

### **Sumario de la invención**

La invención describe:

- 50 1) un procedimiento para el aislamiento de dos líneas de células madre y de origen mesenquimatoso y no hematopoyético, derivadas de pulpa dental humana. Estas líneas celulares, cuando derivan de la pulpa dental de dientes permanentes o gérmenes dentales, se denominan células productoras de hueso mesenquimatoso derivadas de células madre de pulpa dental (MBP-DPSC) y, cuando derivan de la pulpa de dientes temporales, se denominan células productoras de hueso mesenquimatoso derivadas de células madre de dientes temporales exfoliados humanos (MBP-SHED). Se pueden obtener usando un citofluorímetro con clasificador y los marcadores  
55 específicos CD34, STRO-1 y c-Kit.;

- 2) el cultivo, la expansión y la diferenciación de ambas líneas madre en osteoblastos pueden producir hueso. Esta nueva clase de material biológico vital se denomina hueso autólogo vivo (LAB). Es un hueso no laminar fibroso que contiene osteoblastos vitales derivados de MBP-DPSC y MBP-SHED. Estas células pertenecen a la pulpa de dientes temporales y permanentes humanos y de gérmenes dentales. Ambas MBP se pueden diferenciar en osteoblastos sin la adición de ningún fármaco osteogénico en el medio, y los osteoblastos derivados producen hueso *in vitro* e *in vivo*;
- 3) un procedimiento para la aplicación clínica del LAB en la práctica odontológica, maxilofacial y ortopédica;
- 4) un procedimiento para la producción extensiva de LAB.

### **Descripción de la invención**

10 La presente invención se refiere a un material biológico, vital que se puede usar para injerto óseo autólogo, y a un procedimiento para su producción a partir de células madre, derivadas de la pulpa de dientes temporales y permanentes humanos y de gérmenes dentales, que se pueden diferenciar en osteoblastos, produciendo *in vitro* un hueso fibroso. Este tejido vital se puede injertar como material autólogo en el paciente donante para la reparación de un defecto óseo. Específicamente, la invención describe un procedimiento para:

- 15 1) el aislamiento de células madre, derivadas de pulpa humana de dientes temporales y permanentes y de gérmenes dentales, denominadas respectivamente MBP-SHED y MBP-DPSC; 2) su expansión (es decir, el incremento en el número de clones); 3) su diferenciación en osteoblastos; 4) la producción *in vitro* de un tejido óseo fibroso producido por estos osteoblastos, que se denomina hueso autólogo vivo (LAB); 5) el almacenamiento del LAB bajo condiciones específicas que garantizan una vitalidad celular alta.

20 La presente invención muestra las siguientes ventajas con respecto a la técnica anterior, que usa osteoblastos derivados de células madre de la médula ósea (Kuznetsov SA y col., Single colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts from bone after transplantation in vivo. J. Bone Min. Res. 1997, 12, 1335-1347; Pittenger M.F. y col., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284, 143-147): 1) invasividad reducida, de hecho es posible evitar la extracción dental realizando una pulpectomía; 2) seguridad alta, ya que la recogida de muestras se realiza en un diente en lugar de la médula madre o de la cresta ilíaca; 3) cultivos primarios caracterizados por un número elevado de colonias, ya que las muestras no tienen células hematopoyéticas; 4) una organización tridimensional del LAB sin la adición de ningún fármaco osteogénico ni soporte, esto no se puede obtener usando osteoblastos derivados de las células madre de la médula.

30 Además, la presente invención muestra algunas otras ventajas con respecto a la técnica anterior relacionadas con las células DPSC ya conocidas (Gronthos S. y col., PNAS 2000, 97, 13625-13630; Gronthos S. y col., JDR 2002, 81, 531-535; Batouli S. y col., JDR 2003, 82, 976-981; patente de los EE.UU. n.º 20040058442 de Shi y col.) y con las células SHED (Miura M y col., PNAS 2003, 100, 5807-5812) aisladas de la pulpa dental humana. Las MBP-DPSC descritas, derivan del tejido mesenquimatoso y no del sanguíneo (como fue el caso de las DPSC indicadas previamente). Además, las MBP-DPSC se diferencian en osteoblastos que pueden producir hueso *in vitro* mientras que las DPSC no. Las DPSC pueden producir estructuras similares al hueso sólo cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes.

40 La célula MBP-SHED es diferente de la SHED, debido a que éstas: 1) necesitan la adición de BMP-4 al medio, para diferenciarse en osteoblastos *in vitro*; 2) no pueden producir tejido similar al hueso *in vitro*; 3) si se trasplantan en ratones inmunodeficientes, no se pueden diferenciar en osteoblastos, pero inducen la formación de un tejido similar a la dentina.

Una diferencia adicional entre la presente invención y la técnica anterior está relacionada con el procedimiento empleado para el aislamiento de células madre de pulpa humana de dientes temporales y permanentes y de gérmenes dentales (es decir, el uso de clasificador FAC).

45 Además, las células DPSC y SHED necesitan el uso de un vector cerámico para trasplantarse en el modelo animal, mientras que el LAB se puede trasplantar solo.

50 De manera similar, existen muchas diferencias entre la presente invención y el documento de los EE.UU. n.º 20020119180 de Yelic y col., y la patente de los EE.UU. n.º 20030068305 de Sramek y col. El documento de los EE.UU. n.º 20020119180 describe un procedimiento para producir germen dental en un modelo animal. Estos gérmenes dentales se pueden trasplantar potencialmente en encía humana para reemplazar los dientes perdidos. El documento de los EE.UU. n.º 20030068305 describe un procedimiento y una herramienta específica para recoger la pulpa dental y aislar supuestas células madre, que son completamente diferentes de aquellos descritos en la presente invención.

**Descripción del procedimiento para obtener MBP-SHED y MBP-DPSC a partir de pulpa humana de dientes temporales y permanentes y de gérmenes dentales.**

Las células madre aisladas de pulpa dental humana derivan de células mesenquimatosas producidas por crestas neurales.

5 Para aislar células madre de la pulpa dental humana es necesario que los dientes estén sanos y sin ninguna comunicación entre la pulpa y la cavidad oral. El paciente debería tener una higiene oral profesional una semana antes de la extracción dental (o pulpectomía) y comenzar una profilaxis antimicrobiana con enjuagues bucales de solución de clorhexidina al 0,12% dos veces al día. Con respecto a la preparación de los dientes justo antes de la toma de muestras, existen diferentes procedimientos. Se cubre la corona con un gel de clorhexidina al 0,2% durante varios minutos. Después, se retira cuidadosamente el diente con un fórceps estéril y, manteniendo el diente con el fórceps, se retira la pulpa usando una cureta Gracey. Inmediatamente después, se sitúa la pulpa en la solución digestiva (véase a continuación).

15 Si se tiene que usar un diente permanente existen dos procedimientos. El primer procedimiento es una extracción dental. Se cubre la corona con un gel de clorhexidina al 0,2% durante varios minutos. Después, se retira cuidadosamente el diente con un fórceps estéril, se sitúa en un campo estéril, se lava con una solución de clorhexidina al 0,12% y se corta en dos con un cincel o con un taladro bajo irrigación. Se recoge la pulpa usando una cureta Gracey. Inmediatamente después, se sitúa la pulpa en la solución de digestión (véase a continuación).

20 El segundo procedimiento es la pulpectomía, dejando el diente en su lugar. Para el procedimiento, no se debe usar el taladro para exponer la cámara pulpar, ya que podría dañar la pulpa. Se recoge la pulpa usando una cureta Gracey. Después, se sitúa la pulpa en la solución de digestión (véase a continuación).

Con respecto a la recogida de la pulpa a partir de los gérmenes dentales, el procedimiento es similar al descrito en el caso de la extracción dental permanente.

25 En cualquier caso, se sitúa la pulpa dental en una solución digestiva que contiene: 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 500 µg/ml de claritromicina en 4 ml de PBS 0,1M, pH 7,4, añadido de 3 mg/ml de colagenasa tipo I, 4 mg/ml de dispasa. El volumen de solución es dependiente del volumen de la pulpa que se va a digerir y varía desde 2 hasta 4 ml en el caso de dientes temporales y desde 2 hasta 5 ml en el caso de dientes permanentes o de gérmenes dentales. Se mantiene la pulpa en la solución de digestión durante 1 h a 37°C, con una agitación suave, para facilitar la disociación de tejido. Una vez digerida, se sumerge la solución en un volumen de 10 veces de medio de cultivo α-MEM, añadido con FBS al 20%, ácido ascórbico 2P 100 µM, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen, Milán, Italia). Después se centrifuga la suspensión celular (10 min a 140 g), se resuspende el fondo del tubo en 12 ml del mismo medio de cultivo, se filtra sobre filtros Falcon de 70 µm (Becton & Dickinson, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Después de la filtración, se sitúan las células en matraces de 25 cm<sup>2</sup>. Se incuban los matraces a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% y se cambia el medio dos veces por semana.

35 Las observaciones microscópicas muestran que, el día uno del cultivo, se pueden observar dos citotipos: a) células pequeñas y redondeadas, formando agregados de 10 a 30 células (colonias pequeñas); b) células adherentes y alargadas, con forma de araña, formando agregados de 30 a 80 células (colonias más grandes). Hasta el día 5 del cultivo, las células no muestran una proliferación significativa, y el material necrótico presente se pierde durante los cambios del medio. Después de 10-15 días del cultivo, cuando se observaron hasta 40 clones en cada pulpa, se realizan las siguientes operaciones: se retira el medio dentro del matraz; se lavan las células dos veces con PBS 0,1 M estéril; se desprenden las células del matraz con 0,3 ml de tripsina 0,1 M durante 1 min a 37°C; se suspenden las células en 3 ml del medio de cultivo (descrito previamente); se transfieren 1,5 ml de esta suspensión a un segundo matraz; se añade en ambos matraces medio de cultivo hasta el volumen final de 6 ml. Esta última etapa es importante para estimular la proliferación celular.

45 El día 20-21, cuando el número total de las células es suficiente para realizar la clasificación FAC, se sedimentan las células (10 min a 140 g), se lavan en BSA al 0,1% en PBS 0,1 M a 4°C y se incuban durante 10 minutos a 4°C para la exposición a anticuerpos en una solución que contenía 1 µl de la solución madre de anticuerpos y 9 µl de BSA al 0,1% en PBS. Se prepara la solución madre de anticuerpos con 200 µg del anticuerpo en 1 ml de PBS 0,1 M. Después de la incubación, se lavan las células con 0,1% de BSA en PBS, para retirar los anticuerpos que no reaccionan o no reaccionan específicamente, y se analizan para determinar la positividad para los siguientes anticuerpos monoclonales (marcados con FITC, PE y Cychrome) frente a: c-Kit, CD34, STRO-1, CD45 (Santa Cruz). Las células mostraron una positividad del 11% para c-Kit, una positividad del 8% para CD34 y una positividad del 30% para STRO-1. En particular, las células que fueron positivas para c-kit también fueron positivas para CD34 y STRO-1, mientras que siempre fueron negativas para CD45. Por lo tanto, se puede recalcar un origen no hemático de estas células. Sólo se han recogido estas células positivas para c-Kit CD34 y STRO-1, para obtener una diferenciación. c-Kit es una membrana de tirosina-cinasa que reconoce selectivamente el factor de las células madre (SCF). Esto se realiza para aislar las células madre de la pulpa de dientes temporales y permanentes y de gérmenes dentales, con la única diferencia de que las células madre obtenidas a partir de dientes temporales y gérmenes dentales se obtienen constantemente y en un número bastante alto, mientras que las obtenidas a partir de dientes permanentes son de

número inferior, aunque suficiente, pero no de manera constante. Estas células, llamadas MBP-SHED y MBP-DPSC, son una subpoblación de células madre de dientes temporales (SHED) y permanentes (DPSC), tanto erupcionados como de gérmenes. MBP-SHED y MBP-DPSC se diferencian, bajo condiciones de cultivo específicas, en progenitoras osteogénicas, después en osteoblastos, como sigue: CÉLULAS MADRE (identificadas como células positivas para c-Kit, CD34 STRO-1) → CÉLULAS PROGENITORAS/PRECURSORAS (identificadas por positividad de RUNX-2 → CÉLULAS TERMINALMENTE DIFERENCIADAS (identificadas por positividad de osteocalcina y CD44). Esta diferenciación se describe a continuación.

Se plaquean las células positivas para c-Kit, CD34 y STRO-1. Proliferan en cada matraz. El día 30 del aislamiento, las células comienzan a producir una matriz orgánica extracelular que, el día 40, dentro de los matraces, produce un hueso fibroso (LAB), en el que se observan las mismas células responsables de su formación.

La formación de LAB se caracteriza por estas etapas: 1) inicialmente, grupos de células forman un área central redondeada, en la que segregan cristales inorgánicos, fibras de colágeno y glucoproteínas; 2) después, esta estructura adquiere una organización 3D debido a la nueva aposición de matriz; 3) el día 40, la matriz se convierte en un tejido mineralizado 3D, que es un hueso fibroso (hueso no laminar); 4) el día 50, dentro de los matraces, se observan pequeños cubos de tejido óseo, cuyas dimensiones son dependientes de la altura del medio. Este procedimiento permite obtener pequeños cubos de hueso fibroso, que tienen 1 cm de grosor y un volumen de hasta 1 cm<sup>3</sup>, que son adecuados para implantes quirúrgicos, debido también a que son ricos en osteoblastos vivos, en actividad sintética, pueden tener deposición ósea.

Cuando las células se vuelven confluentes, no proliferan más pero, si algunas de ellas se apartan y se colocan en otro matraz, vuelven a proliferar y a producir LAB. Por lo tanto, el sistema desarrollado permite realizar un biorreactor que puede producir LAB, sin limitaciones. Después, tras la diferenciación celular, el día 35 desde su aislamiento, se realiza la caracterización celular, usando anticuerpos monoclonales: HLA-1, CD14, CD44, CD45, CD54, SSEA-1, RUNX-2, CD34, OSTEOCALCINA (OC) y flk-1. Las células obtenidas con esta invención muestran una positividad del 100% para HLA-1 y CD44, una positividad del 70% para RUNX-2 y una positividad del 30% para OC, CD54 y flk-1, mientras que son completamente negativas para los otros anticuerpos que se usan. RUNX-2 es un factor de transcripción, que identifica un citotipo pre-osteoblástico, mientras que OC identifica osteoblastos. Las células madre, que durante el procedimiento de diferenciación expresan flk-1 (receptor VEGF, o factor de crecimiento vasculo-endotelial), son responsables de la angiogénesis, que se puede producir dentro de la parte central del LAB. De hecho, las células que están dentro del LAB neoformado no se degeneran y producen indefinidamente hueso fibroso, que se puede usar para trasplantes autólogos. El LAB conserva sus características y vitalidad después del almacenamiento a +4°C durante muchos días. Además, el LAB se puede criopreservar y almacenar a temperaturas < 0°C durante mucho tiempo, manteniendo su capacidad de osteogeneración, usando técnicas de crioconservación convencionales para células y tejidos.

En resumen, el procedimiento para obtener LAB es el siguiente: 1) extracción, en esterilidad, de la pulpa de dientes temporales y permanentes o de gérmenes dentales, digestión y cultivo; 2) tripsinización y amplificación de cultivos primarios; 3) clasificación FAC y reinicio del cultivo; 4) diferenciación celular con formación de tejido y su uso para incrementar la formación de tejido a través de su diseminación en varios matraces con el uso de nuevo medio de cultivo.

En la siguiente tabla se indica el tiempo de todo el proceso, lo que permite obtener continuamente producción de LAB (dependiendo del tratamiento del paciente):

Fase	Día
Extracción dental	0
Recogida de pulpa de dientes temporales y permanentes o de germen dental	0
Digestión de pulpa	0
Punto de partida del cultivo	0
Proliferación celular	1-15(21)
Clasificación	15-21
Diferenciación osteogénica	16-22 a 35
Caracterización (RUNX-2 y OC)	35
Producción de LAB	40-a voluntad
Trasplante de LAB	Después de 50
Cicatrización de defecto óseo	Dentro de 60 días desde el trasplante

### Caracterización de LAB.

El hueso fibroso autólogo vivo mineralizado obtenido *in vitro* (LAB) muestra características que son similares a las de un hueso humano durante la mineralización; de hecho, las imágenes son perfectamente superimponibles a las del hueso humano en la osificación directa o membranosa.

- 5 Las características de la producción de LAB: 1) las células con expresiones madre características y específicas se obtienen por medio del procedimiento reivindicado de la pulpa de dientes temporales y permanentes humanos, o gérmenes dentales. En el caso de células madre de dientes permanentes, también se han obtenido de individuos de edad no joven; 2) las células madre, por medio de tratamientos apropiados, se diferencian en un citotipo osteogénico, que comienza a producir una matriz mineralizada y, posteriormente, un hueso vivo mineralizado autólogo, mostrando
- 10 las mismas características del hueso humano durante la osificación; 3) las observaciones histológicas, histoquímicas, (rojo de alizarina S, ALP, Schmorl, H & E), de inmunofluorescencia (positividad para calceína y anticuerpos dirigidos contra osteonectina, osteopontina, fibronectina, colágeno de tipo III y fosfatasa alcalina ósea), y de difracción de rayos X demuestran claramente la similitud entre el LAB y el hueso humano durante la mineralización; 4) las células presentes en el LAB crecen y producen hueso sin modificaciones citológicas; 5) el hueso vital obtenido *in vitro* (LAB) se puede transferir fácilmente en un matraz de cultivo secundario, en el que continúa creciendo en el medio de cultivo; 6)
- 15 después de la tripsinización, las células óseas obtenidas pueden producir hueso en un matraz de cultivo secundario; 7) el LAB y las células en él permanecen vitales si se mantiene a +4°C durante 24-36 horas; 8) el LAB y las células en él se pueden criopreservar a temperaturas < 80°C durante años, usando las técnicas convencionales para la crioconservación de material celular.
- 20 En conclusión, la presente invención difiere de la técnica anterior; en particular de la de Miura y Gronthos, por lo siguiente: 1) la técnica de extracción de pulpa tanto de dientes temporales como permanentes es diferente; 2) el uso de pulpa de gérmenes dentales para aislar células madre; 3) la selección de los tipos celulares basados en el clasificador FAC; 4) la población madre aislada es positiva para c-Kit, CD34 y STRO-1, pero negativa siempre y constantemente para CD45, lo que indica que las células no son hematopoyéticas, a diferencia de lo indicado por Gronthos y Miura; 5)
- 25 el porcentaje de positividad y el número de células que se pueden obtener son más elevados respecto a la técnica anterior; 6) las células aisladas producen hueso mineralizado autólogo vivo (LAB) *in vitro*, mientras que los trabajos de Gronthos y Miura no describen esa capacidad, sino sólo el hecho de que las células aisladas, inyectadas en ratas inmunodeprimidas estimulan la producción fibrosa de un material similar de la dentina; 7) las células aisladas de Gronthos y Miura son una población "heterogénea", aunque la metodología que se describe en la presente invención coincide en la selección de una población celular homogénea; 8) a diferencia de lo indicado por Gronthos, los procedimientos coinciden en aislar células madre en un número suficiente, también en el caso de dientes permanentes de individuos de más de 32 años de edad; 9) el LAB crece sin límites, si no, es debido a la superficie y al medio de cultivo disponible; 10) las células descritas son altamente estables y producen hueso, que es superimponible a lo visto en seres humanos durante la mineralización y no simplemente cristales, como se describe por Gronthos y Miura; 11)
- 30 las células son osteoblastos y no células similares a odontoblastos, como se indica por Gronthos y Miura. El microscopio electrónico de transmisión de MBP-SHED y MBP-DPSC muestra un tráfico vesicular manifiesto, desde y hacia la célula y se han observado numerosas peculiaridades ultraestructurales en el nivel de las estructuras nucleares. Es frecuente, de hecho, la presencia de células plurinucleadas, en algunos casos los núcleos resultan irregulares con más de un nucleolo. Una característica común de todos los los núcleos es la presencia de un filamento
- 35 o de una extensión, posiblemente un lóbulo nuclear. Estas características son típicas de células madre indiferenciadas. El análisis TEM de osteoblastos diferenciados y del hueso fibroso obtenido ha mostrado que las
- 40

células poseen una citoplasma rico en vesículas, típico de osteoblastos humanos, un RER particularmente abundante, un núcleo con un nucleolo, todos signos de una síntesis proteica activa. La matriz extracelular parece rica en fibras y en proteoglucanos, y en vesículas exocitóticas. Estas características son típicas de células diferenciadas que segregan matriz, similar a las características observadas en el hueso humano en formación.

- 5 Para dirigir mejor la forma del hueso fibroso neoforzado en 3D, se hacen crecer las células en un polímero de ácido poliláctico-coglicólico reabsorbible (85:15 p/p). Esta matriz polimérica se ha tomado para su examen por su facilidad de manipulación y por el tiempo de resorción, lo que permite la dirección morfológica del hueso fibroso, pero al mismo tiempo no inhibe el crecimiento. Este polímero, una vez modelado, con una técnica CAD/CAM, muestra en la superficie poros con un diámetro de 100-140  $\mu\text{m}$ , en los que las células penetran, y poros de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, a los que MBP-SHED o MBP-DPSC se unen perfectamente, con una adhesión completa entre células y polímero.

El comportamiento de MBP-SHED o MBP-DPSC es análogo cuando estas células se hacen crecer en superficies grabadas de titanio.

- 15 La eficacia de la interacción célula-polímero o célula-titanio se ha demostrado con estudios histológicos, histoquímicos (rojo de alizarina S, ALP, Schmorl, H & E), de inmunofluorescencia (positividad para la calceína, para anticuerpos dirigidos contra osteonectina, osteopontina, fibronectina, colágeno de tipo III y fosfatasa alcalina ósea), de difracción de rayos X y de microscopía (confocal, TEM y SEM).

### **Ejemplo 1**

#### **Producción de LAB de dientes temporales.**

##### **a) Fase quirúrgica**

1) Selección del paciente - Todos los sujetos estaban sanos de enfermedades sistémicas y orales. Se ha obtenido la producción de LAB de dientes temporales de tres pacientes de sexo masculino de 2, 6 y 8 años de edad.

- 2) Preparación del paciente para el estudio - Los tres pacientes, la semana antes de la extracción, se han sometido a una higiene profesional y a tratamiento con clorhexidina al 0,12%. En cuanto al tratamiento del diente en el momento de la retirada, se ha cubierto la corona clínica con un gel de clorhexidina al 0,2%, durante algunos minutos antes de provocar la exfoliación.

- 3) Procedimiento de extracción de pulpa - Para la extracción del diente temporal se ha realizado una avulsión delicada usando una pinza estéril para extracción dental. Manteniendo el diente entre los brazos de la pinza, ex-oris, se ha limpiado el diente con una solución de clorhexidina al 0,12%, antes de provocar la exfoliación. Después, se ha expuesto la pulpa y la pulpa extraída usando una cureta Gracey. Después, se situó la pulpa en un tubo de ensayo con 5 ml de solución digestiva de PBS que contenía 3mg/ml de colagenasa de Tipo I, 4mg/ml de dispasa, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, 500 mg/ml de claritromicina. Se sumergió la pulpa en la solución y se mantuvo durante 1 hora a 37°C, bajo agitación moderada para facilitar la disociación de la pulpa. Al final, se ha diluido 10 veces la mezcla digerida con medio de cultivo (tipo  $\alpha$ -MEM, añadido de suero fetal bovino al 20%, ácido ascórbico 2P 100 mM, L-glutamina 2mM, 100 U/l de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin) y se ha centrifugado durante 10 min a 140 g. Después de la centrifugación, se tomaron 12 ml de la suspensión del fondo del tubo de ensayo y se filtró usando un filtro Falcon de 70  $\mu\text{m}$ .

##### **b) Fase de laboratorio**

1) Preparación de cultivos primarios - Se situó la solución filtrada en un matraz y se colocó en un incubador (37°C y CO<sub>2</sub> al 5%), realizando cambios del medio dos veces por semana.

2) Expansión de los cultivos - Se hicieron proliferar las células en el matraz, dejándolo en cultivo al menos durante 15 días.

- 3) Caracterización de los diversos clones - Cuando se creyó que el número de células era suficiente (aproximadamente 500.000 células), se han seleccionado las células a través de clasificación FAC, usando marcadores para las células madre incluyendo CD34, STRO-1 y c-Kit.

4) Aislamiento de la reserva específica llamada MBP-SHED - A partir del cultivo, se seleccionaron células positivas para CD34, STRO-1 y c Kit y se usaron para la posterior expansión y diferenciación.

5) Expansión de clones de MBP-SHED específicos *in vitro*. Se hicieron crecer las células en el medio de cultivo, descrito previamente en el punto a3).

- 6) Producción del LAB - Después de varios pasos, se ha obtenido hueso fibroso autólogo vivo colonizado de osteoblastos (LAB). Esta fase duró aproximadamente 40 días, para tener una diferenciación completa de células madre con respecto a osteoblastos.



7) Expansión del LAB - Comenzando con 100.000 MBP-SHED, la producción de LAB requiere de 10 a 15 pasos en un matraz de 25 ml, cada uno con 6 ml de medio; se llevaron a cabo tales pasos aproximadamente en 8 semanas, obteniendo aproximadamente 2 cm<sup>3</sup> de hueso.

8) Uso del LAB para estudios histológicos.

## 5 Ejemplo 2

### Producción de LAB de dientes permanentes.

#### a) Fase quirúrgica

1) Selección del paciente - La selección de los pacientes se llevó a cabo considerando parámetros clínicos y afección patológica. Todos los sujetos estaban sanos de enfermedades sistémicas y orales. Se realizó la producción de LAB a partir de dientes permanentes de 5 pacientes de sexo masculino de 30, 32, 34, 35 y 37 años de edad. En esta fase, se identificaron sitios donantes dentales: todos los terceros molares, dos superiores y tres inferiores.

2) Preparación del paciente - Una semana antes de la extracción dental, los pacientes se sometieron a una higiene dental profesional y a un enjuague con una solución de clorhexidina al 0,12% dos veces al día durante toda la semana en la que se produjo la extracción.

3) Procedimientos de extracción de pulpa - Después de anestesia local, se realizó la extracción dental con una palanca y/o pinza. Para disminuir este procedimiento se precedió por un acceso quirúrgico a través de la ejecución de un colgajo de mucoperiostio. Manteniendo el elemento extirpado entre los brazos de la pinza, extra oris, se situó el elemento dental en un tejido quirúrgico estéril y se limpió con una solución de clorhexidina al 0,12%. Por lo tanto, se expuso la cámara de la pulpa a través de la separación entre la corona y la raíz anatómica, usando un alicate estéril montado en un micromotor quirúrgico, con irrigación de agua estéril. Se recoge la pulpa usando una cureta Gracey y/o herramientas endodóncicas, como limas, y se sumerge en 5 ml de solución digestiva (en 4 ml de PBS) 1M que contenía 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 500 µg/ml de claritromicina, 3 mg/ml colagenasa de tipo I, 4mg/ml de dispasa durante 1 hora a 37°C. Durante la digestión, se mantuvo la pulpa en agitación lenta para facilitar la disociación del tejido. Al final de la digestión, se añadió medio de cultivo (medio de cultivo α-MEM, añadido con FCS al 20%, ácido ascórbico 2P 100 µM, L-glutamina 2mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin) hasta un volumen de 50 ml y se centrifugaron las muestras durante 10 min a 140 g. Después, se recogieron del fondo del tubo 12 ml de solución y se filtró sobre un filtro de 70 µ.

#### b) Fase de laboratorio.

1) Preparación de cultivo celular primario - Se situó la solución filtrada en un matraz y se incubó a 37°C y con CO<sub>2</sub> al 5%;

2) Proliferación de cultivo celular - Se cambió dos veces por semana el medio de cultivo durante al menos 15 días;

3) Caracterización celular - Cuando el número de células fue aproximadamente de 500.000, se realizó una clasificación FAC usando marcadores madre CD 34, STRO-1 y c Kit.

4) Aislamiento de MBP-DPSC - Después de la clasificación FAC se recogieron las células positivas y se cultivaron.

5) Proliferación de MBP-DPSC *in vitro* - Se cultivaron células con medio de cultivo previo.

6) Producción de LAB - Se realizaron diversos pasos a partir de células madre para la producción de LAB de osteoblastos diferenciados. Esta fase experimental tardó aproximadamente 40 días.

7) Expansión de LAB - Después de 10-15 pasos de osteoblastos diferenciados, para obtener suficientes células, se obtuvo LAB plaqueando muestras de 100.000 células en matraces de 25 ml con 6 ml de medio de cultivo. Esta fase se llevó a cabo en aproximadamente 8 semanas, hasta que se obtuvo una astilla ósea en cada matraz. Las astillas óseas alcanzan el volumen de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de volumen.

8) Recogida del LAB del matraz para análisis histológicos.

## 45 Ejemplo 3

### Producción de LAB a partir de gérmenes dentales

#### a) Fase quirúrgica.

1) Selección del paciente - La selección de los pacientes se llevó a cabo considerando parámetros clínicos y afección patológica. Todos los sujetos estaban sanos de enfermedades sistémicas y orales. Se realizó la

producción de LAB a partir de gérmenes dentales de ocho pacientes de sexo masculino y femenino de 15, 16, 17, 17, 18, 20, 20 y 22 años de edad. En esta fase, se identificaron sitios donante dentales (todos con germen dental aún sin salir): todos los terceros molares, tres superiores y cinco inferiores.

5 2) Preparación del paciente - Una semana antes de la extracción dental, los pacientes se sometieron a una higiene dental profesional y a un enjuague con una solución de clorhexidina al 0,12% dos veces al día durante toda la semana en la que se produjo la extracción.

10 3) Procedimientos de extracción de pulpa - Después de anestesia local, se realizó la extracción dental con una palanca y/o pinza. Para disminuir este procedimiento se precedió por un acceso quirúrgico a través de la ejecución de un colgajo de mucoperiostio. Manteniendo el elemento extirpado entre los brazos de la pinza, extra oris, se situó el elemento dental en un tejido quirúrgico estéril y se limpió con una solución de clorhexidina al 0,12%. Por lo tanto, se expuso la cámara de la pulpa a través de la separación entre la corona y la raíz anatómica, usando un alicate estéril montado en un micromotor quirúrgico, con irrigación de agua estéril. Se recoge la pulpa usando una cureta Gracey y/o herramientas endodóncicas, como limas, y se sumerge en 5 ml de solución digestiva (que contenía en 15 4ml de PBS 1M: 100 U/ml, 100 µg/ml de estreptomina, 500 µg/ml de claritromicina, 4 ml de PBS 1M, añadido de 3 mg/ml de colagenasa de tipo I, 4mg/ml de dispasa) durante 1 h a 37°C. Durante la digestión, se mantuvo la pulpa en agitación lenta para facilitar la disociación del tejido. Al final de la digestión, se añadió medio de cultivo (medio de cultivo α-MEM, añadido con FCS al 20%, ácido ascórbico 2P 100 µM, L-glutamina 2mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina) hasta un volumen de 50 ml y se centrifugaron las muestras durante 10 min a 140 g. Después, se recogieron del fondo del tubo 12 ml de solución y se filtró sobre un filtro de 70 micrómetros.

## 20 b) Fase experimental.

1) Preparación de cultivo celular primario - Se situó la solución filtrada en un matraz y se incubó a 37°C y con CO<sub>2</sub> al 5%;

2) Proliferación de cultivo celular - Se cambió dos veces por semana el medio de cultivo durante al menos 15 días.

25 3) Caracterización celular - Cuando el número de células fue aproximadamente de 500.000, se realizó una clasificación FAC usando marcadores madre CD34, STRO-1 y c-Kit.

4) Aislamiento de MBP-DPSC - Después de la clasificación FAC se recogieron las células positivas y se cultivaron.

5) Proliferación de MBP-DPSC *in vitro* - Se cultivaron células con medio de cultivo previo:

6) Producción de LAB - Se realizaron diversos pasos a partir de células madre para la producción de LAB de osteoblastos diferenciados. Esta fase experimental requirió aproximadamente 40 días.

30 7) Expansión de LAB - Después de 10-15 pasos de osteoblastos diferenciados, para obtener suficientes células, se obtuvo LAB plaqueando muestras de 100.000 células en matraces de 25 ml con 6 ml de medio de cultivo. Esta fase se llevó a cabo en aproximadamente 8 semanas, hasta que se obtuvo una astilla ósea en cada matraz. Las astillas óseas alcanzaron un volumen de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>.

8) Recogida del LAB del matraz para análisis histológicos.

## 35 Ejemplo 4

### Caracterización de LAB

Las muestras de LAB obtenidas en los ejemplos 1-3 se sometieron a los análisis siguientes:

40 1) Evaluación del número de LAB - Se ha evaluado la formación de hueso autólogo vivo. Se contó el número de nódulos calcificados por matraz y se realizó una comparación entre sujetos jóvenes y mayores. Se dieron los datos como promedio ± DE.

45 2) Histología, histoquímica e inmunofluorescencia - Se retiraron las células diferenciadas y la matriz calcificada de los matraces usando una solución 50/50 de tripsina 1M y EDTA al 0,5%, después se fijó en formaldehído al 4% en PBS 0,1 M durante 48 h a 4°C pH 7,4, se lavó en PBS 0,1 M pH 7,4 a 4°C, después se deshidrató, se incrustó en parafina y se seccionó (5 µm de grosor). Se tiñeron los cubreobjetos con hematoxilina-eosina, rojo de alizarina y nitrato de plata Schmorl.

50 Para la histoquímica y la inmunofluorescencia, se lavaron las células en PBS y 0,1 M y se fijaron en formaldehído al 4% en 0,1 M PBS, con Tritón X100 al 0,2% durante 30 minutos a 4°C, después se lavó dos veces en BSA al 0,1% en PBS 0,1 M a temperatura ambiente durante 10 minutos cada una. Se cubrieron las células usando solución patrón de fosfatasa alcalina (ALP), se incubó en oscuridad durante 8 h. Se realizó la actividad ALP usando 100.000 muestras celulares, se desprendió por medio de PBS/EDTA al 0,02% y se centrifugó durante 10 min a 140 g. Se incubó el sedimento con 1 ml de solución BMPurple (Roche, Segrate, Milán, Italia) durante 8 horas en oscuridad.

Se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro a 615 nm. Como control, se usaron células c-kit<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>. Los valores se expresaron como la proporción entre la muestra y la solución madre BMPurple. El disolvente BMPurple se usó como blanco.

Para la inmunofluorescencia, se lavaron dos veces las células en PBS 0,1 M a temperatura ambiente durante 10 min, se fijó en formaldehído al 4% en PBS 0,1 M durante 48 h a 4°C pH 7,4, se lavó en PBS 0,1 M pH 7,4 a 4°C, después se incubó durante toda una noche a 4°C con anticuerpos. Se embebieron las muestras de LAB en TBS (medio de congelación de tejido, Triangle Biomedical Sciences, Durham, N.C., EE.UU.) y se crioseccionaron (Cryostat 1720 Digital MGW Lauda, Leika, Alemania), se fijaron en etanol al 100% durante 30 minutos a 4°C, se lavaron en PBS 0,1 M, después se dejaron durante 60 minutos en PBS/leche al 6% y se incubaron con anticuerpos a 4°C toda una noche.

Los anticuerpos para células o LAB fueron los siguientes: osteonectina, fibronectina (Novo Castra, Newcastle, Reino Unido), BSP (sialoproteína ósea) (BIODESIGN International, EE.UU.), BAP (fosfatasa alcalina ósea) (US Biological, EE.UU.), todas anti-humano de ratón; osteocalcina y colágeno III (Santa Cruz, CA, EE.UU.) fueron anti-humano de cabra. Los anticuerpos secundarios fueron anti-ratón de cabra (FITC) y anti-cabra de ratón (PE conjugados) (Santa Cruz, CA, EE.UU.). Se observaron las células y el LAB bajo el microscopio de fluorescencia (microscopio de fluorescencia Axiovert 100, Zeiss, Alemania).

3) Análisis de reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa - Se extrajo el ARN total de aproximadamente 1.000.000 células a tiempos diferentes (día 22 para células no diferenciadas y día 40 y día 60 para células diferenciadas), mediante homogeneización en reactivo TRI (SIGMA, Milán, Italia), siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenó a -70°C hasta los ensayos. Se llevó a cabo la síntesis de ADNc a partir del ARN total usando transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen Celbio Italia, San Giuliano Milanese, Milán, Italia), usando oligo (dT)<sub>12-18</sub> y transcriptasa inversa de virus de la leucemia Moloney murina (10U / $\mu$ l) en 20  $\mu$ l a 42°C durante 50 minutos.

Se realizaron análisis de PCR por triplicado usando un termociclador TC-312 (Techne, Burlington, NJ, EE.UU.), en el que las muestras sufrieron una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 54°C durante 45 s, 72°C durante 1 min y una etapa de extensión final a 72°C durante 4 min. La mezcla de PCR contenía 0,2 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 1,5 M, 0,2  $\mu$ M de cada cebador. Las secuencias de cebadores fueron: directa RUNX-2 5'-CAC TCA CTA CCA CAC CTA CC-3'; inversa RUNX-2 5'- TTC CAT CAG CGT CAA CAC C-3'; directa P-actina 5'-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3'; inversa P-actina 5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3'. Se separaron los productos de la amplificación sobre gel de agarosa al 2% en tampón Tris acetato EDTA (TAE). Se realizaron las PCR en muestras negativas-RT para excluir la contaminación de ADN.

Mediante inmunofluorescencia, el LAB fue en gran parte positivo para marcadores para tejido óseo fibroso tal como fibronectina, colágeno I y III, BSP (sialoproteína ósea) y BAP, osteonectina y osteocalcina: en particular, los osteoblastos que forman la monocapa que rodea a las nuevas trabéculas formadas del LAB fueron intensamente positivas para osteocalcina, indicando además que estas células eran osteoblastos implicados en el procedimiento de osificación. Los resultados mostraron que las células clasificadas y cultivadas, en el día 50 aunque no fueron más positivas para marcadores de células madre, fueron positivas para CD44 (100%), para RUNX-2 (68,65%  $\pm$  2,0) y osteocalcina (28,45%  $\pm$  1,7). El análisis RT-PCR para RUNX-2 ha demostrado que los transcritos de ARNm de este factor de transcripción estuvieron presentes en células diferenciadas los días 40 y 60 pero no en células clasificadas ni en células aún no diferenciadas, el día 22.

## **Ejemplo 5**

### **Formación y desarrollo del LAB en el polímero de soporte**

Las muestras de células de acuerdo con los ejemplos 1-3, se sitúan en el interior de un recipiente cilíndrico en el que se introduce un fragmento preformado de polímero de ácido láctico-coglicólico 85:15 p/p (en la práctica clínica la forma elegida trazará el defecto óseo esquelético para corregir el donante de sujeto). La colonización celular tridimensional del soporte preformado se obtiene usando un incubador rotatorio (aparato rotatorio Weaton) a una velocidad de 6 vueltas/minuto. Después de aproximadamente 7 días, las células colonizan la totalidad del soporte, originando un LAB 3D con la misma forma del polímero, que digiere, en parte la matriz polimérica. En este punto, el complejo soporte+células se puede trasplantar *in vivo*, donde restaurará la continuidad anatómico-funcional del cuerpo esquelético. *In vivo*, el procedimiento de biodegradación de la matriz polimérica continuará, gradualmente reemplazada por la nueva matriz ósea segregada a partir de las células colonizantes. La matriz polimérica desaparece y, en el centro del sistema, se puede observar el hueso vital que se va encontrando gradualmente hasta que se remodela y se vuelve indistinguible del viejo hueso esquelético próximo. Se evalúa la nueva formación de hueso de acuerdo con el ejemplo 4 con microscopía confocal (las muestras lavadas en PBS se fijan en formaldehído al 4%/solución de PBS con Tritón X100 al 0,2% durante 30 minutos a 4°C). Se lava dos veces la muestra en BSA al 0,1% en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Se analizaron las muestras celulares con faloidina-FITC y Hoechst azul para determinar la coloración nuclear y después se incuban durante 1 hora a +4°C.

**Ejemplo 6**

**Formación y desarrollo del LAB fibroso en implantes de titanio**

5 De manera similar a lo que se muestra en el ejemplo 5, el LAB puede colonizar, por ejemplo, superficies no reabsorbibles como implantes dentales de titanio o prótesis femorales. Usando el mismo protocolo para el ejemplo 5, la superficie de material protésico está cubierta por células dentro de 7 días: se produce la osteointegración entre los biomateriales y el hueso fibroso humano *in vitro*, limitando el periodo de sanación, complicaciones y riesgos de fallo. La eficacia del procedimiento de formación óseo se evalúa como en el ejemplo 5.

## REIVINDICACIONES

1. Una población de células madre de origen mesenquimatoso y no hemático, que se puede obtener a partir de pulpa de dientes temporales humanos, o de pulpa de dientes permanentes humanos o de gérmenes dentales y **caracterizada por:**
- 5        i) expresión de marcadores c-Kit, STRO-1 y CD34;
- ii) diferenciación en progenitores osteogénicos que expresan RUNX2, a partir de los que se derivan osteoblastos que expresan HLA1, CD44, RUNX2, CD54 y osteocalcina;
- iii) capacidad para producir una matriz ósea fibrosa *in vitro* e *in vivo*;
2. Un procedimiento para aislar la población de células madre de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 10        - digestión enzimática de pulpa dental;
- recuperación de la fracción celular mediante centrifugación y/o filtración;
- obtención de cultivo primario y expansión del mismo;
- selección de clasificación FAC usando marcadores CD34, STRO-1 y c-Kit y expansión en medio de cultivo.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la digestión enzimática de la pulpa se lleva a cabo usando 3 mg/ml de colagenasa de tipo I, 4 mg/ml de dispasa, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 500 µg/ml de claritromicina en PBS, durante 1 hora a 37°C, bajo agitación.
- 15        4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la expansión celular se obtiene usando medio de cultivo específico para la proliferación de células madre.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el medio de cultivo para la expansión celular se prepara de: medio de cultivo αMEM, añadido de suero fetal bovino al 20%, ácido ascórbico 2P 100 µM, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y la incubación se realiza en matraces de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C y con CO<sub>2</sub> al 5%, realizando cambios del medio dos veces por semana.
- 20        6. Procedimiento para la producción de una matriz ósea tejida, que comprende inducir la proliferación de la población de células madre de la reivindicación 1 durante 5-10 días, hasta que las células sean confluentes, en matraces que contienen los siguientes medios de cultivo: medio de cultivo αMEM añadido de suero fetal bovino al 20%, ácido ascórbico 2P 100 µM, L-glutamina 2mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina,
- 25        de modo que la población de células madre de la reivindicación 1 se diferencia en una línea celular osteoblástica.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha matriz ósea fibrosa contiene osteoblastos vivos.
- 30        8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la matriz ósea tejida consiste en fragmentos con un espesor mayor de 1 cm y un volumen mayor de 1 cm<sup>3</sup>, para usarse para implante quirúrgico.
9. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 6-8, en el que el material biológico se almacena a 44°C o a una temperatura inferior a 0°C.
- 35        10. El uso de una población de células madre de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de biomateriales autólogos, para el tratamiento de defectos óseos relacionado con problemas odontológicos, maxilofaciales y ortopédicos.