



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 366 085**

51) Int. Cl.:  
**A01N 63/00** (2006.01)  
**A01N 65/00** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**C12N 5/074** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Número de solicitud europea: **03724136 .1**  
96) Fecha de presentación : **19.04.2003**  
97) Número de publicación de la solicitud: **1619949**  
97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

54) Título: **Células madre postnatales y usos de las mismas.**

45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.10.2011**

45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.10.2011**

73) Titular/es: **The Government of the United States of America as represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services Office of Technology Transfer National Institutes of Health Suite 325, 6011 Executive Boulevard Rockville, Maryland 20852-3804, US**

72) Inventor/es: **Shi, Songtao; Robey, Pamela, Gehron; Miura, Masako y Gronthos, Stan**

74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 085 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 postnatales y usos de las mismas.

### Declaración de los derechos gubernamentales

5 La presente invención se desarrolló con el apoyo del Departamento de Salud y Servicios Humanos. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

### Campo de la invención

10 La invención se refiere en líneas generales a células madre dentales postnatales y a sus usos. Más específicamente, la invención se refiere, en un aspecto, al uso de células madre postnatales de pulpa dentaria decidua, y, en otro aspecto a una célula madre aislada multipotente de pulpa dentaria decidua postnatal humana, en particular, para la preparación de un medicamento.

### Antecedentes de la invención

15 Las células madre postnatales (que significa aquellas presentes después del nacimiento) son células no especializadas que pueden renovarse a sí mismas de forma extensiva y desarrollarse a células más maduras que tienen funciones especializadas. Las células madre pueden inducirse en ciertas condiciones fisiológicas o experimentales para que se conviertan en células con funciones especiales, tales como las células de latido del músculo cardíaco, o las células productoras de insulina del páncreas. El proceso por el cual una célula madre se convierte en una célula con funciones especiales se conoce como diferenciación. La diferenciación puede inducirse a través del uso de múltiples señales que pueden incluir agentes químicos secretados por otras células, el contacto físico con células adyacentes, y ciertas moléculas en el microentorno. Por tanto, las células madre pueden tratarse con señales específicas para que se conviertan en tipos específicos de células que tienen funciones útiles. Estas células recién diferenciadas después pueden usarse para generar un remplazo para células que se pierden a través del envejecimiento y el desgaste normal, lesión, o enfermedad. Por ejemplo, las células madre se muestran prometedoras para el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson, la diabetes, y cardiopatía. Las células madre tienen múltiples aplicaciones en medicina y odontología. Por consiguiente, se necesitan nuevas fuentes de células madre, y procedimientos para su uso.

### Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona procedimientos y materiales que abordan las necesidades mencionadas anteriormente. La invención proporciona una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada, un procedimiento para implantar una célula inductora de hueso dentro de un organismo, un procedimiento para implantar una célula neural dentro de un organismo, un procedimiento para implantar un adipocito dentro de un organismo, y un procedimiento para generar dentina.

35 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada; en la que la célula madre se obtiene de un diente deciduo exfoliado; la célula madre puede diferenciarse en una célula neural, un adipocito, o un odontoblasto; la célula madre tiene una velocidad de proliferación y un número de divisiones de la población mayor que las células madre estromáticas de la médula ósea (BMSSC) y las células madre de la pulpa dentaria (DPSC); la célula madre expresa STRO-1, CD146, ALP, fosfogluco proteína extracelular de matriz LF155, factor de crecimiento de fibroblastos básico, endostatina, o una de sus combinaciones, y la célula madre puede proliferar hasta más de 140 divisiones de la población.

40 La invención proporciona una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada como se define anteriormente. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua puede diferenciarse en una célula neural, un adipocito, o un odontoblasto. Puede obtenerse una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua a partir de un diente deciduo no exfoliado. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la invención se obtiene de un diente deciduo exfoliado (SHED). Puede almacenarse una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua para su posterior uso. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua puede cultivarse en medio de cultivo tisular. Preferiblemente, el medio de cultivo tisular incluye suero. Más preferiblemente, el medio de cultivo tisular no incluye suero. El medio de cultivo tisular puede incluir uno o más factores de crecimiento. Preferiblemente, el factor de crecimiento es el factor de crecimiento de fibroblastos básico, el factor de crecimiento epidérmico, o ambos. El medio de cultivo tisular puede incluir un suplemento neuronal. Preferiblemente, el suplemento neuronal es suplemento B27.

55 La invención proporciona una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua como se define anteriormente para preparar un medicamento para generar hueso dentro de un organismo. Generalmente, esto implica implantar una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua en un organismo. Preferiblemente, el organismo es un mamífero. Más preferiblemente, el organismo es un ser humano. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua puede obtenerse de un ser humano e implantarse en un ser humano diferente. Preferiblemente, la célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria

decidua se obtiene de, y se implanta en el mismo ser humano. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua puede expandirse *ex vivo* antes de implantarse en el organismo. Preferiblemente, la célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua se induce antes de implantarse en el organismo. Preferiblemente, la célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua se induce con BMP-4 o inducción por mineralización. Puede implantarse en un organismo una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua que no esté en combinación con un vehículo. Puede implantarse en un organismo una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua que esté en combinación con un vehículo. Preferiblemente, el vehículo contiene hidroxiapatita. Más preferiblemente, el vehículo contiene fosfato tricálcico. Más preferiblemente, el vehículo contiene hidroxiapatita y fosfato tricálcico. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua puede inducir que una célula receptora se diferencie en células formadoras de hueso.

El medicamento puede usarse para promover la formación de hueso en un sitio de traumatismo dentro de un organismo. El traumatismo puede producirse por una lesión física. Preferiblemente, la lesión física es una lesión física accidental. Más preferiblemente, la lesión física es el resultado de un procedimiento médico o dental. Lo más preferiblemente, la lesión física es el resultado de cirugía. El traumatismo puede deberse a una enfermedad degenerativa. Preferiblemente, la enfermedad degenerativa es osteoporosis.

La invención proporciona una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua para la preparación de un medicamento para producir tejido neural en un organismo. Esto implica implantar el medicamento en un organismo.

Preferiblemente el organismo es un mamífero. Más preferiblemente el organismo es un ser humano. La célula madre dental puede implantarse en tejido presente dentro del organismo. Preferiblemente, el tejido es tejido neural. La célula madre dental puede expandirse *ex vivo* antes de implantarse en el organismo. Preferiblemente la célula madre dental se induce a neuronal antes de implantarse en el organismo. Puede implantarse en un organismo una célula madre dental que no esté en combinación con un vehículo. Puede implantarse en un organismo una célula madre dental que esté en combinación con un vehículo.

La invención proporciona una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua para la preparación de un medicamento para producir tejido adiposo dentro un organismo. Esto implica implantar el medicamento en un organismo.

Preferiblemente el organismo es un mamífero. Más preferiblemente el organismo es un ser humano. La célula madre dental puede expandirse *ex vivo* antes de implantarse en el organismo. Preferiblemente la célula madre dental se induce a adipogénesis antes de implantarse en el organismo. Puede implantarse en un organismo una célula madre dental que no esté en combinación con un vehículo. Puede implantarse en un organismo una célula madre dental que esté en combinación con un vehículo.

La invención proporciona una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua para la preparación de un medicamento para generar dentina implantando una célula madre dental dentro de un organismo. Alternativamente, el medicamento puede usarse para generar dentina sobre dentina pre-existente por contacto de la dentina preexistente con una célula madre dental y por incubación de la dentina pre-existente y la célula madre dental. La célula madre dental es una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua. Preferiblemente, la dentina pre-existente se pone en contacto con la célula madre dental *in vitro*. Más preferiblemente, la dentina pre-existente se pone en contacto con la célula madre dental *in vivo*. La dentina pre-existente puede estar contenida dentro de un diente. La célula madre dental se obtiene de un diente deciduo humano. La dentina pre-existente puede ser de un mamífero. Preferiblemente, la dentina pre-existente es de un ser humano. La dentina pre-existente y la célula madre dental pueden obtenerse de diferentes mamíferos. Más preferiblemente, la dentina pre-existente y la célula madre dental se obtienen del mismo mamífero. Lo más preferiblemente, la dentina pre-existente y la célula madre dental se obtienen del mismo ser humano. La dentina pre-existente puede ponerse en contacto con una formulación para producir dentina tratada. Preferiblemente, la dentina pre-existente se pone en contacto con una formulación después de que la dentina pre-existente se ponga en contacto con una célula madre dental. Más preferiblemente, la dentina pre-existente se pone en contacto con una formulación antes de que la dentina preexistente se ponga en contacto con una célula madre dental. Preferiblemente, la formulación es una solución básica. Más preferiblemente, la formulación es una solución ácida. Lo más preferiblemente, la formulación es una solución de ácido acético. La dentina tratada puede lavarse con un fluido. Preferiblemente, el fluido es un disolvente biológico. Más preferiblemente, el fluido es agua. Incluso más preferiblemente, el fluido es un tampón biológico. Lo más preferiblemente, el fluido es solución salina tamponada con fosfato. La dentina pre-existente puede ponerse en contacto con una célula madre dental que no esté en combinación con un vehículo. La dentina pre-existente puede ponerse en contacto con una célula madre dental que esté en combinación con un vehículo. Preferiblemente, el vehículo contiene hidroxiapatita. Más preferiblemente, el vehículo contiene fosfato tricálcico. Mucho más preferiblemente, el vehículo contiene hidroxiapatita y fosfato tricálcico. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la invención puede usarse para la preparación de un medicamento para generar dentina en respuesta a un traumatismo en un diente. Preferiblemente, el traumatismo es erosión del diente. Más preferiblemente, el traumatismo es el resultado de un tratamiento dental. Mucho más preferiblemente, el traumatismo es el resultado de un procedimiento de canal

radicular.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama que muestra la preparación de un armazón de dentina, el cultivo de DPSC, y el implante de un complejo dentina/DPSC en un ratón inmunocomprometido. (A) Se cortaron las puntas de las raíces de los terceros molares extraídos sobre la línea de corte indicada y la apertura de la raíz se selló con Gelfoam. (B) Se retiraron el tejido pulpar y una capa de dentina pulpar de la punta de la raíz y después se trataron con ácido acético al 1% durante 10 minutos. (C) Después de lavar con PBS, se cargaron las DPSC en la superficie de dentina de las cámaras pulpares y se cultivaron a 37°C durante 12 horas en placas de cultivo celular de 10 cm con 15 ml de medio de cultivo cubriendo las puntas de las raíces completas. (D) Se implantó el Complejo DPSC/dentina en ratones inmunocomprometidos por vía subcutánea.

La Figura 2 muestra la dentinogénesis de DPSC humanas *in vivo*. (A) Vehículo de dentina tratado con ácido, implantado, sin ninguna célula, había solamente tejido conectivo alrededor de la superficie de dentina. (B) Se cargaron fibroblastos cutáneos sobre la dentina tratada con ácido y se cultivaron durante 12 horas, después se implantaron los complejos fibroblasto/dentina en ratones inmunocomprometidos. Había tejido conectivo alrededor de la superficie de dentina sin nada de formación de dentina nueva ocho semanas después del implante. (C-E) La dentina recién formada (ND) se asoció con el armazón de dentina humana (Dentina) y el tejido tipo pulpa que contenía odontoblastos (triángulos vacíos) en los vasos sanguíneos (BV) ocho semanas después del implante de los complejos DPSC/dentina. La dentina recién formada puede contener componentes celulares atrapados (flechas blancas en C y D) o solamente odontoblastos responsables de una fina capa de formación de dentina (ND en E). El tejido tipo pulpa se definió como tejido conectivo rico en células que contenía vasos sanguíneos (BV), glóbulos rojos, y odontoblastos (flechas vacías) revistiendo la superficie de dentina recién formada, que era diferente del tejido conectivo habitual que contiene una cantidad limitada de células (C y D). (F) Se implantaron DPSC con HA/TCP como vehículo para mostrar que los odontoblastos (flechas vacías) eran responsables de la dentina recién formada (ND) con estructura tubular (flechas negras) sobre las superficies de HA/TCP (HA). Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. El aumento original es 40X.

La Figura 3 muestra la caracterización de un implante de DPSC/dentina. (A) La tinción inmunohistoquímica DSP sobre un implante de fibroblasto/dentina mostró una tinción positiva sobre la dentina peritubular (flechas negras). El tejido conectivo mostró una inmunotinción negativa para el anticuerpo DSP. (B) En implantes de DPSC/dentina, los odontoblastos (flechas vacías) y las células atrapadas en el interior de la dentina recién formada (triángulos vacíos en ND) eran inmunorreactivos para el anticuerpo DSP humano. El armazón de dentina humana (Dentina) mostró inmunotinción DSP sobre las estructuras peritubulares (flechas negras). El tejido tipo pulpa fue inmunonegativo a la tinción con anticuerpo DSP. (C) La tinción inmunohistoquímica de anticuerpo anti-mitocondria específico de seres humanos mostró DPSC humanas diferenciadas en odontoblastos (flechas vacías) revistiendo las superficies de dentina recién formada (ND) y también convertidas en células dentinogénicas (flechas vacías) atrapadas en el interior de la dentina recién formada (ND). (D) Control negativo de tinción inmunohistoquímica sobre un implante de DPSC/dentina sin anticuerpo primario. El aumento original es 60X.

La Figura 4 muestra la expresión de receptores de FGF y VEGF en DPSC humanas. (A y B) Receptor 1 de FGF (A) y receptor 1 de VEGF (B) expresados en DPSC humanas cultivadas a 25 duplicaciones de la población. El gris claro (rojo en la foto en color) representa tinción positiva y el gris intermedio (azul en la foto en color) muestra la tinción de los núcleos de DAPI. (C) El análisis de transferencia de Western confirmó la expresión de estas moléculas en DPSC cultivadas. Los asteriscos representan bandas inmunopositivas. Se usó HSP90 para mostrar la carga de proteína por muestra. (D-E) Implantes de DPSC/dentina a las ocho semanas después del implante, las células dentinogénicas (flechas negras) atrapadas en el interior de la dentina recién formada (ND) eran inmunopositivas para el anticuerpo contra el receptor 1 de FGF (D) y el anticuerpo contra el receptor 1 de VEGF (E). Sin embargo, los odontoblastos fueron solamente inmunorreactivos para el anticuerpo contra el receptor 1 de FGF (flechas vacías en D). El aumento original es 40X para A-B y D-E.

La Figura 5 ilustra el aislamiento de SHED. (A) El incisivo primario exfoliado contenía pulpa dentaria como se muestra (triángulos). La línea discontinua muestra el borde de oclusión del incisivo. (B y C) La tinción con hematoxilina y eosina indicó dentina (D) y pulpa (pulpa) de los dientes deciduos exfoliados. La pulpa contenía odontoblastos (flechas), vasos sanguíneos (flechas vacías), y tejidos conectivos. Las líneas discontinuas recta y curvada en (B) representan las superficies radiculares de oclusión y reabsorbida, respectivamente. (D) Se formaron colonias individuales después de sembrar SHED a baja densidad y cultivar durante dos semanas. (E) Las SHED eran capaces de formar agrupaciones tipo esfera cuando se cultivaban en las condiciones descritas en los Procedimientos. (F) Las agrupaciones tipo esfera podían disociarse por su paso a través de agujas y posteriormente cultivarse en placas recubiertas con gelatina al 0,1%. (G) Se evaluaron las tasas de proliferación de SHED, BMSSC, y DPSC por incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 12 horas. Las SHED mostraron una tasa de proliferación significativamente mayor en comparación con las BMSSC y DPSC (\*P<0,05; ensayo t de Student). (H) Las SHED fueron capaces de proliferar hasta más de 140 divisiones, lo que era significativamente mayor (\*P<0,05; ensayo t de Student) que en las BMSSC y DPSC.

La Figura 6 muestra que las SHED tienen características de células madre. (A-E) La pulpa remanente mostró

immunotinción positiva para STRO-1 (flechas vacías en A) y CD146 (flechas vacías en B) para las células de las áreas perivasculares. El análisis FACS mostró que las SHED expandidas *ex vivo* contenían aproximadamente un 9% de células STRO-1 positivas (C). Las SHED expresaban STRO-1 (D) y CD146 (E) (flechas). (F-I) Las SHED expresaban los marcadores osteogénicos y angiogénicos ALP, MEPE, bFGF, y endostatina. (J y K) Las SHED se cultivaron con medio habitual (J) o se cultivaron con L-ascorbato-2-fosfato, dexametasona, y fosfato inorgánico durante 4 semanas (K). La tinción con rojo de alizarina mostró formación de nódulos mineralizados en la inducción (K). (L) El análisis de transferencia de Western mostró una expresión regulada positivamente de CBFA1, ALP, MEPE, BSP, y DSPP después de la inducción como se describe en este documento. Se usó HSP90 para evaluar la cantidad de proteína cargada por muestra. (M) Se añadió BMP-4 recombinante humana (300 ng/ml, 24 horas) para inducir una regulación positiva significativa de CBFA1, Osterix, y osteocalcina (OC) en SHED detectada por PCR semi-cuantitativa.

La Figura 7 muestra SHED implantadas en ratones inmunocomprometidos. (A y B) Ocho semanas después del implante, las SHED eran capaces de diferenciarse en odontoblastos (flechas vacías) que eran responsables de la formación de estructuras tipo dentina (D) sobre las superficies de hidroxiapatita tricálcica (HA) (A). Se muestra el mismo campo para la hibridación *in situ* de alu específico humano, que indica el origen humano de los odontoblastos (flechas vacías, B). La línea discontinua negra representa la superficie de contacto entre la dentina recién formada (D) y HA/TCP (HA). (C) La tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-DSPP muestra una tinción positiva sobre la dentina regenerada (flechas negras). (D) En contraste con los implantes de DPSC, el hueso recién generado (B) por las células hospedadoras en el mismo implante de SHED no muestra reactividad al anticuerpo DSPP. (E) De las 12 cepas SHED seleccionadas derivadas de colonias individuales, solamente tres (25%) fueron capaces de generar dentina *in vivo*. Se descubrió que la dentina recién formada (flechas) estaba adyacente a las superficies del vehículo HA/TCP (HA) y asociada con tejido conectivo (CT). (F) La hibridación *in situ* de alu específico humano mostró que las células humanas (flechas vacías) estaban asociadas con la formación de dentina (D) y estaban residiendo en el compartimiento de tejido conectivo (CT). (G) El 75% restante (9 de 12) de las cepas SHED derivadas de colonias individuales era incapaz de generar dentina *in vivo*. (H) La hibridación *in situ* demostró que las células humanas alu-positivas sobrevivían en el compartimiento de tejido conectivo (CT) en los implantes en que los que no había odontogénesis. También se descubrió que las células humanas rodeaban los vasos sanguíneos (flechas). (I) 7 de 12 (58,4%) líneas SHED derivadas de colonias individuales inducían una cantidad muy limitada de formación de hueso (B) sobre la superficie de HA/TCP (HA). (J) 5 de 12 (41,6%) líneas SHED derivadas de colonias 25 individuales eran capaces de inducir una cantidad significativa de formación de hueso (B) sobre las superficies de HA/TCP (HA). (K) La hibridación *in situ* de alu mostró células humanas (flechas) unidas a las superficies de HA/TCP (HA) en el sitio inicial de formación de hueso (B). Las líneas discontinuas negras representan la superficie de contacto entre el hueso recién formado (B) y HA/TCP (HA). (L) Los estudios de hibridación *in situ* demostraron que la sonda de ADN pf1 murino-específica reaccionaba con osteoblastos y osteocitos (flechas) asociados con la formación de hueso nuevo (B).

La Figura 8 ilustra la diferenciación neural de SHED. (A-H) La tinción inmunocitoquímica muestra SHED que expresan Nestina, GFAP, Neurofilamento M, CNPasa, Tubulina beta III, GAD, NeuN. (I) El análisis de transferencia de Western confirmó que las SHED expresaban marcadores neurales como se ha descrito anteriormente. Después de cuatro semanas de cultivo en presencia de suplemento B27, bFGF (40 ng/ml), y EGF (20 ng/ml) (Dif. neural +), los niveles de expresión de tubulina beta III, GAD, y NeuN estaban regulados positivamente en comparación con condiciones de cultivo habituales como se describe en los Procedimientos (Dif. neural -). Sin embargo, los niveles de expresión de Nestina, GFAP, CNPasa, y Neurofilamento permanecían iguales después del tratamiento. (J-O) Las SHED pueden co-expresar marcadores neuronales incluyendo tubulina beta III (J y L, verde en la foto en color)/GAD (K y L, rojo en la foto en color) y tubulina beta III (M y O, verde en la foto en color)/NFM (N y O, rojo en la foto en color). La morfología de las SHED mostró procesos celulares-citoplasmáticos alargados que a veces co-expresan marcadores neurales (triángulos) o solamente expresan marcadores neurales individuales (flechas vacías). (P-S) Tinción con azul de toluidina (0,1%) que señala la morfología alterada de SHED después de la inducción con medio de cultivo neural (P y O, flechas). Immunotinción positiva con anticuerpos anti MAP2 y Tau sobre las dendritas y el axón (R y S, flechas), respectivamente. También se detectaron experimentos de tinción doble que muestran células positivas a tubulina beta III en el mismo campo (R, triángulo, verde en la foto en color). (T-W) Las SHED también expresaban marcadores de células de la glía incluyendo Nestina (T, rojo en la foto en color), CNPasa (U, rojo en la foto en color), GFAP (V, rojo en la foto en color), y neurofilamento (W, verde en la foto en color) por inmunocitotinción.

La Figura 9 muestra el implante de SHED en el cerebro. (A) Diagrama que indica la inyección de SHED en el giro dentado del hipocampo. (B) Las SHED se cultivaron en el medio de diferenciación neural descrito en los Procedimientos durante una semana, después de lo cual se inyectaron 5.000 células en 0,5 µl de PBS en el giro dentado del hipocampo de ratones inmunocomprometidos. Después de 10 días, se fijó el cerebro y se preparó para la tinción por inmunofluorescencia con NFM y anticuerpo anti-mitocondria específico de seres humanos. La inmunotinción con anticuerpo anti-mitocondria mostró SHED humanas (flechas, panel central, verde en la foto en color) en el giro dentado del hipocampo con co-expresión de neurofilamento (flechas, panel de la izquierda, rojo en la foto en color). En imágenes combinadas, la co-expresión de mitocondrias humanas y NFM demostró la co-localización de la expresión del antígeno como se indica por las flechas (amarillo en la foto en color). Aumento 20X.

La Figura 10 ilustra la diferenciación adipogénica de SHED. Las SHED cultivadas formaban agrupaciones lipídicas

Oil red O (rojo oleoso) positivas después de cinco semanas de inducción en presencia de isobutilmetilxantina 0,5 mM, hidrocortisona 0,5  $\mu$ M, e indometacina 60  $\mu$ M (A). Se observó una regulación positiva significativa de PPAR $\gamma$ 2 y lipoproteína lipasa (LPL) en el grupo inducido con el cóctel adipogénico (Adip) en comparación con el grupo de control (Cont) por RT-PCR (B).

## 5 **Descripción detallada de la invención**

La invención incluye células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua. Se descubrió sorprendentemente que los dientes deciduos humanos contienen células progenitoras que pueden dar lugar a diversos tipos celulares (células madre multipotentes). Este descubrimiento fue sorprendente porque nunca antes se ha informado de la presencia de células madre multipotentes en dientes deciduos humanos. Más bien, se realizaron estudios en el pasado con modelos animales que tenían dientes de crecimiento continuo, o se realizaron con material fetal. Como los dientes humanos no crece de forma continua, se cree que son diferentes de los modelos animales basados en el crecimiento continuo de los dientes.

Las células madre aisladas de dientes deciduos humanos exfoliados se han abreviado en este documento como SHED (células madre de dientes deciduos humanos exfoliados). Las SHED se incluyen dentro del grupo de células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua. Las SHED se han caracterizado como células clonogénicas de alta proliferación capaces de diferenciarse en una diversidad de tipos celulares. Estos tipos celulares incluyen células neuronales, adipocitos, y odontoblastos. También se descubrió que las SHED eran capaces de inducir la formación de hueso, generar dentina, y sobrevivir en cerebro de ratón. También se ha descubierto que las SHED expresan marcadores neurales. Estas células madre derivadas de dientes deciduos exfoliados son completamente diferentes de cualquier célula madre previamente identificada. Aunque las células SHED se aislaron de dientes deciduos exfoliados, la invención también incluye células multipotentes obtenidas de dientes deciduos que no se han exfoliado.

Como se describe en este documento, las SHED representan una nueva población de células madre postnatales con capacidad de proliferación extensiva y diferenciación multi-potencial. Los dientes deciduos, por lo tanto, pueden ser una fuente ideal de células madre para reparar estructuras dentarias dañadas, inducir la regeneración ósea, y posiblemente para tratar una lesión tisular neural o enfermedades degenerativas, y para crear grasa cuando sea necesario.

También se divulgan en el presente documento procedimientos para generar dentina sobre dentina pre-existente. El procedimiento implica implantar células madre dentales sobre dentina pre-existente. Las células madre dentales pueden ser células madre de pulpa dentaria, o pueden ser células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua. Se ha descubierto que las células madre dentales implantadas son capaces de formar dentina reparadora directamente sobre la superficie de dentina humana pre-existente. El tejido tipo pulpa también se ha asociado con la dentina reparadora recién formada. Además, los odontoblastos y las células dentinogénicas atrapadas en el interior de la dentina reparadora recién formada eran inmunopositivos para un anticuerpo contra la sialoproteína de dentina humana (DSP), y se demostró por tinción anti-mitocondria específica de seres humanos que derivaban de las DPSC humanas implantadas. Las DPSC también expresaban marcadores angiogénicos (relacionados con los vasos sanguíneos) tales como el receptor 1 de FGF y el receptor 1 VEGF. La expresión de estos marcadores indica que las DPSC también pueden estar implicadas en la creación de un microentorno tipo pulpa para dar soporte a la dentina recién regenerada. Por consiguiente, la primera evidencia directa que indica que las células madre dentales son capaces de generar dentina reparadora sobre la superficie de dentina humana pre-existente se presenta en este documento.

La capacidad recién descubierta de generar dentina reparadora sobre la superficie de dentina pre-existente representa un gran avance técnico porque permite la generación restauradora de dentina dentro de un diente. Esto a su vez tiene gran valor práctico porque permite a un facultativo odontólogo o médico proporcionar mejores cuidados a un paciente que necesite dicho tratamiento. Por ejemplo, los protocolos actuales usados durante la realización de un conducto radicular dental requieren la eliminación de material, tal como dentina y pulpa, del interior de un diente para crear un hueco, y después el relleno del hueco con un material artificial. Un defecto principal en estos tipos de protocolos es que producen una superficie de contacto entre el material artificial y los tejidos naturales encontrados en el diente. Esta superficie de contacto puede conducir a infección y dolor, y puede requerir que el paciente tenga que experimentar un tratamiento doloroso posterior e incurra en costes adicionales. La aplicación de la invención a un procedimiento de conducto radicular permite colocar células madre humanas de pulpa dentaria en el hueco producido durante el procedimiento. Estas células producirán dentina regeneradora sobre la superficie de la dentina pre-existente, y por lo tanto evitarán tener que crear una superficie de contacto de un material artificial con la dentina pre-existente. Por tanto, se cree que el uso de la célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la invención puede reducir los costes y el dolor asociados con el tratamiento dental.

## **Definiciones**

Abreviaturas: Células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED), células madre estromáticas de médula ósea (BMSSC), células madre de pulpa dentaria de un diente permanente (DPSC), solución salina tamponada con fosfato (PBS), proteína morfogénica ósea-4 (BMP-4), sialoproteína de dentina (DSP), factor de crecimiento del endotelio

vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), fosfatasa alcalina (ALP), glucoproteína extracelular de matriz (MEPE), ácido glutámico descarboxilasa (GAD), proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), neurofilamento M (NFM), núcleos neuronales (NeuN), nucleótido-2'-3'-cíclico-3'-fosfodiesterasa (CNPasa).

5 Una "solución ácida" se refiere a un líquido biocompatible que tiene un pH que es menor de 7,0. La concentración de ácido en una solución ácida puede tener un amplio intervalo. Generalmente, la solución ácida puede usarse para ponerse en contacto con la superficie de dentina pre-existente para retirar materiales que son inhibidores de la formación regeneradora de dentina por las células madre dentales. Por consiguiente, los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente la concentración de ácido que puede usarse en una solución ácida. Por ejemplo, la  
10 concentración puede estar entre el 0,01% y el 100%, el 1% y el 10%, el 1% y el 5%, el 0,5% y el 2%, y valores entre los intervalos mencionados anteriormente. Pueden prepararse soluciones ácidas dentro de estos intervalos basadas en volumen (ácido) a volumen (diluyente), masa (ácido) a volumen (diluyente), o masa (ácido) a masa (diluyente), dependiendo de los procedimientos usados en la técnica para preparar una solución de un ácido específico.

15 Una "solución básica" se refiere a un líquido biocompatible que tiene un pH que es mayor de 7,0. La concentración de base en una solución básica puede tener un amplio intervalo. Generalmente, la solución ácida puede usarse para entrar en contacto con la superficie de la dentina pre-existente para retirar materiales que son inhibidores de la formación regeneradora de dentina por las células madre dentales. Por consiguiente, los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente la concentración de ácido que puede usarse en una solución ácida. Por ejemplo, la  
20 concentración puede estar entre el 0,01% y el 100%, el 1% y el 10%, el 1% y el 5%, el 0,5% y el 2%, y valores entre los intervalos mencionados anteriormente. Puede prepararse soluciones básicas dentro de estos intervalos basadas en volumen (base) a volumen (diluyente), masa (base) a volumen (diluyente), o masa (base) a masa (diluyente), dependiendo de los procedimientos usados en la técnica para preparar una solución de una base específica.

25 Un "tampón biológico" se refiere a un fluido que contiene un componente tamponante que sirve para mantener un pH constante. Se conocen y se han descrito numerosos tampones biológicos en la técnica (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)). La solución salina tamponada con fosfato es un ejemplo de un tampón biológico.

30 Un "disolvente biológico" es un fluido biológicamente aceptable que puede usarse para retirar por lavado una formulación usada para preparar dentina tratada, y que permite que las células madre de pulpa dentaria crezcan sobre la dentina tratada. Un ejemplo de un disolvente biológicamente aceptable podría ser una solución de etanol. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente los disolventes biológicos lavando dentina pre-existente con un disolvente biológico candidato, y determinando si las células madre de pulpa dentaria son capaces de crecer sobre la dentina pre-existente lavada.

35 El término "vehículo" se refiere a un medio con el que puede mezclarse una célula madre antes de implantarse en un organismo. Los ejemplos de vehículos incluyen, aunque sin limitación, gelatina, esponjas de polivinilo, matrices de colágeno, y cerámica de hidroxiapatita/fosfato tricálcico. Los vehículos pueden prepararse en numerosas formas. Por ejemplo, los vehículos pueden formarse en bloques, polvos, tiras, y similares. Los vehículos son conocidos en la técnica y se han descrito (Krebsbach et al., *Transplantation*. 63:1059 (1997)).

Una "célula madre dental" se refiere a una célula madre postnatal que se aísla de un diente humano. Las células madre dentales pueden aislarse de un diente permanente o un diente deciduo.

40 El término "formulación" se refiere a una composición que puede usarse para preparar una superficie de dentina pre-existente, o una región en la que se implantarán células madre, para permitir el implante de células madre de pulpa dentaria. Dicha formulación puede usarse para retirar materiales de una superficie o región que puede interferir con el implante de una célula madre. Los ejemplos de materiales interferentes incluyen células, moléculas de señalización celular, péptidos, y similares. En una realización, una formulación puede ser una solución de ácido acético al 1% (p/v). Una formulación puede determinarse fácilmente aplicando una formulación de ensayo a la  
45 superficie de dentina pre-existente y determinando si las células madre de pulpa dentaria son capaces de adherirse y crecer.

50 Una "célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua" se refiere a una célula madre que se aísla de un diente deciduo humano. Las células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua puede aislarse de un diente deciduo antes de la exfoliación, o después de la exfoliación.

El término "aislada" significa que una célula de la invención no está en el estado encontrado en la naturaleza. Por ejemplo, la célula está suficientemente libre de contaminantes u otros tipos celulares con los que se encuentra de forma natural una célula de la invención. Además, una célula aislada de la invención puede estar presente en una forma que es suficientemente pura para usarse de forma terapéutica o para investigación. El término aislada no  
55 requiere que una célula de la invención está libre de todos los contaminantes.

La expresión "inducción de la mineralización" se refiere a la incubación de una célula madre en un medio de cultivo que promueve la acción de la célula madre sobre otros tipos celulares, que causa que los otros tipos celulares formen hueso. Aunque sin limitarse a ninguna teoría particular, se cree que las células madre inducidas secretan

factores que actúan sobre otros tipos celulares y promueven la formación de hueso por los otros tipos celulares. Por ejemplo, una célula madre de un diente deciduo (es decir SHED) que ha experimentado inducción de la mineralización puede estimular a una célula receptora para producir hueso. Un ejemplo de un medio que puede usarse para la inducción de la mineralización incluye L-ascorbato-2-fosfato, dexametasona, y fosfato inorgánico.

- 5 La expresión "inducción neural" se refiere a la incubación de una célula madre en un medio de cultivo que promueve la diferenciación de la célula madre en una célula neural. Un ejemplo de un medio que puede usarse para la inducción neural incluye Neurobasal A, suplemento B27, penicilina al 1%, factor de crecimiento epidérmico, y factor de crecimiento de fibroblastos.

- 10 Una "célula receptora" es una célula dentro de un organismo que llega a estar próxima a una célula madre cuando la célula madre se implanta en el organismo. Una célula receptora puede estar en contacto directo con una célula madre implantada, o no en contacto directo con la célula implantada pero estar aún influida por la célula implantada. Por ejemplo, una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua implantada puede causar que una célula receptora forme hueso sin entrar en contacto realmente con la célula receptora.

- 15 El término "traumatismo" se refiere a un acontecimiento que causa que una célula experimente un cambio perjudicial. Los ejemplos de traumatismos incluyen, lesión física resultante de un accidente o tratamiento médico, enfermedad, degeneración, y similares.

#### I. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada

- 20 La invención proporciona células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua aisladas. Estas células y procedimientos para aislarlas se describen en este documento. Las células pueden aislarse de dientes deciduos que están exfoliados, o no exfoliados.

- 25 Las células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua pueden cultivarse en un medio de cultivo tisular que incluye suero. Estas células también pueden cultivarse en medio de cultivo tisular sin suero que contiene bFGF. El medio sin suero puede contener opcionalmente EGF, y puede contener opcionalmente suplemento B27 (GIBCO, Gaithersburg, MD). Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente los medios adicionales en los que pueden cultivarse y mantenerse las células de la invención.

- 30 Las células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua pueden recogerse y guardarse para su uso futuro a través de técnicas de conservación, tales como congelación en nitrógeno líquido. Los procedimientos para conservar células son habitualmente usados en la técnica. Se prevé que dichas células puedan recogerse de los dientes deciduos de un ser humano, guardarse, e implantarse en el mismo ser humano en un momento posterior. Dicho protocolo sería útil para reemplazar células perdidas debido a la edad o a un traumatismo. Por ejemplo, las células guardadas podrían usarse durante procedimientos de reconstrucción dental posteriormente en la vida. Además, las células pueden tratarse con factores para inducir que formen diferentes fenotipos. Además, las células podrían transfectarse con una construcción de ácido nucleico que causaría que las células expresaran un producto deseado. Estas células entonces podrían implantarse en el ser humano para administrar el producto deseado a ese ser humano. Los ejemplos de productos deseados incluyen, aunque sin limitación, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, quimioquinas, factores relacionados con la hemofilia, y similares. Se cree que la obtención y el implante de células del mismo individuo evita muchas complicaciones resultantes del rechazo inmune. Dicho procedimiento también puede aplicarse a otras células madre dentales, tales como células madre de pulpa dentaria.

- 40 Los procedimientos para preparar construcciones de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica y se han descrito (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)).

- 45 Los procedimientos para transfectar células son bien conocidos en la técnica e incluyen co-precipitación con fosfato cálcico, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido incluido en liposomas, o vectores virales, así como otros conocidos en la técnica.

Por consiguiente, una célula madre dental, tal como una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua o una célula madre de pulpa dentaria, puede transfectarse de modo que la célula exprese un producto deseado. La célula después puede implantarse en un organismo como se describe a continuación de modo que la célula implantada exprese el producto deseado dentro del organismo.

- 50 II. Un procedimiento para producir hueso, tejido neural, dentina, y tejido adiposo dentro de un organismo

- 55 Se divulga un procedimiento para producir hueso, tejido neural, dentina, y tejido adiposo dentro de un organismo. El procedimiento para producir hueso implica implantar una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua en el organismo de modo que la célula madre postnatal sea capaz de inducir que las células receptoras produzcan hueso. Los procedimientos para producir tejido neural, tejido adiposo, o dentina implican implantar una célula madre dental postnatal en el organismo de modo que se forme el producto deseado. La célula madre dental postnatal puede ser una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua o una

célula madre de pulpa dentaria como se describe en este documento.

Las células madre postnatales pueden expandirse *ex vivo* antes de implantarse en un organismo. Además, una célula madre postnatal de la invención puede implantarse en combinación, o no en combinación con un vehículo. Se conocen numerosos vehículos en la técnica y están disponibles. Un ejemplo de un vehículo que puede usarse de acuerdo con la invención es hidroxapatita/fosfato tricálcico. Las células madre dentales de la invención también pueden implantarse en combinación con un fármaco. Por ejemplo, las células pueden implantarse con un antibiótico, un antifúngico, y similares. Se conocen numerosos de dichos fármacos en la técnica (Merck Index, 13<sup>a</sup> edición, Whitehouse Station, NJ, 2001). Los procedimientos para conservar e implantar células son bien conocidos en la técnica.

- 10 Se cree que el tipo de célula en el que se diferencia la célula madre postnatal depende del entorno celular en el que se implanta la célula. Por ejemplo, se cree que el implante de una célula madre postnatal de la invención en tejido neural causa que la célula se diferencie en una célula neural. Como alternativa, una célula madre postnatal de la invención puede cultivarse en condiciones inductoras para causar que la célula madre postnatal se diferencie en un tipo celular deseado. Este cultivo puede realizarse antes del implante de la célula diferenciada o parcialmente diferenciada, en un organismo. Por ejemplo, una célula madre postnatal de la invención puede someterse a inducción de la mineralización, inducción con BMP-4, inducción neuronal, o inducción de adipocitos.

- 15 Las células madre postnatales de la invención pueden implantarse en un organismo para prevenir o reducir numerosas enfermedades. Por ejemplo, una célula madre postnatal de la invención puede implantarse en un hueco producido durante un procedimiento de conducto radicular para promover la formación de dentina dentro de un diente. En otro ejemplo, una célula madre postnatal de la invención puede implantarse en tejido neural contenido dentro de un organismo, tal como un ser humano, para el tratamiento de una enfermedad degenerativa neural o el tratamiento de una lesión neural. Las enfermedades degenerativas neurales son conocidas en la técnica y se ejemplifican por la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. En otro ejemplo, una célula madre postnatal de la invención puede implantarse en el sitio de una lesión neural física para reducir la gravedad de la lesión, o para promover la curación de la lesión. Se cree que la actividad protectora y curativa de las células madre postnatales de la invención que se diferencian en células neurales se debe a la expresión de factores neurotrópicos por las células diferenciadas neurales. En otro ejemplo, una célula madre postnatal de la invención puede implantarse en un organismo para crear grasa cuando se necesite. Dicha creación de grasa puede usarse para reducir o mejorar trastornos graves (lipodistrofia) donde la grasa está ausente en diferentes o en todas las partes del cuerpo. Estos pacientes muchas veces experimentan problemas graves relacionados con el metabolismo energético, que depende en gran medida de la grasa.

- 20 Las células madre postnatales de la invención pueden transfectarse con construcciones de ácido nucleico que permitan que las células transfectadas expresen un producto deseado, como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, estas células transfectadas pueden implantarse en un organismo antes de, o después de diferenciarse, de modo que las células coincidan con el tipo celular de las células del sitio del implante.

### III. Un procedimiento para generar dentina sobre dentina pre-existente

- Se describe en el presente documento un procedimiento para generar dentina sobre dentina pre-existente. Generalmente, el procedimiento implica poner en contacto la dentina pre-existente con células madre dentales e incubar la dentina pre-existente con las células madre dentales en condiciones en las que las células madre dentales crezcan y produzcan dentina. La célula madre dental postnatal puede ser una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua o una célula madre de pulpa dentaria como se describe en este documento.

- 40 Dichas condiciones de incubación se describen en este documento (Ejemplo 1). Además, los especialistas en la técnica pueden poner en contacto fácilmente la dentina pre-existente con células madre dentales en diversas condiciones de ensayo para determinar las condiciones de incubación en las que las células madre dentales producen dentina.

- Los procedimientos para aislar células madre dentales se han descrito (Ejemplo 1) (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13625-13630 (2000); Gronthos et al., J. Dent. Res., 81:531-535 (2002)). Las células madre dentales pueden obtenerse de un organismo, tal como un ser humano, que sea diferente del organismo en que se implantarán las células. Como alternativa, las células madre dentales pueden obtenerse del mismo organismo, tal como un ser humano, en que se implantarán. El rechazo inmune de las células implantadas puede evitarse obteniendo células del mismo organismo en el que se implantarán las células.

- El procedimiento puede ponerse en práctica *in vitro* en condiciones de cultivo tisular. En resumen, la dentina puede sembrarse en medio de cultivo tisular, ponerse en contacto con células madre dentales, e incubarse en condiciones en las que las células madre dentales producirán dentina. El medio de cultivo tisular que es capaz de dar soporte a las células madre dentales se ha descrito en la sección de Ejemplos de este documento, y en la técnica (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13625-13630 (2000); Gronthos et al., J. Dent. Res., 81:531-535 (2002)). Dichos procedimientos *in vitro* pueden ser útiles para preparar un implante que contenga dentina en asociación con células madre dentales vivas. Dicho implante puede insertarse en un hueco que se produce durante un procedimiento de

conducto radicular para promover la formación de dentina regeneradora.

El procedimiento puede ponerse en práctica en condiciones *in vivo*. En resumen, las células madre dentales pueden cultivarse en condiciones de cultivo tisular y después recogerse. Las células recogidas después pueden ponerse en contacto con dentina pre-existente contenida dentro de un organismo de modo que las células madre dentales produzcan dentina. Por ejemplo, las células recogidas pueden insertarse en un hueco que se produce durante un procedimiento de conducto radicular. El diente que contiene el hueco en el que se insertaron las células después puede sellarse a través del uso de muchos procedimientos reconocidos en la técnica, tales como el uso de una resina epoxi, y como se describe en este documento (Ejemplo 2).

Las células madre dentales pueden ponerse en contacto con dentina pre-existente en combinación con un vehículo, o no en combinación con un vehículo. Se conocen numerosos vehículos en la técnica y se describen en este documento. Un ejemplo de un vehículo que puede usarse es hidroxapatita/fosfato tricálcico.

La dentina pre-existente puede ponerse en contacto con una formulación antes de ponerse en contacto con las células madre dentales. Dicha formulación puede eliminar células y otros materiales que pueden interferir con la interacción de las células madre dentales con la dentina pre-existente, o que actúan inhibiendo el crecimiento de las células madre dentales. Un ejemplo de una formulación que puede usarse es una solución acuosa al 1% (v/v) de ácido acético. Pueden usarse otras formulaciones para preparar dentina pre-existente antes de poner en contacto la dentina con células madre dentales. Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen soluciones ácidas y soluciones básicas. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente formulaciones que promueven el crecimiento de células madre dentales sobre dentina pre-existente poniendo en contacto la dentina con una formulación de ensayo, incubando las células madre dentales con dentina, y determinando si las células madre dentales producen dentina.

La dentina pre-existente puede ponerse en contacto con una formulación, y después lavarse con un fluido. El fluido puede retirar por lavado la formulación así como los desechos celulares y otros materiales que pueden interferir con la interacción de las células madre dentales con la dentina pre-existente, o que actúan inhibiendo el crecimiento de las células madre dentales. Pueden usarse numerosos fluidos para lavar la dentina pre-existente. Los ejemplos de dichos fluidos incluyen, aunque sin limitación, agua, disolventes biológicos, y tampones biológicos. Un ejemplo de un tampón biológico específico es solución salina tamponada con fosfato.

La producción de dentina regeneradora permite reemplazar material biológico con material biológico recién formado en oposición a los materiales artificiales. Esto puede evitar una reacción inmune o alérgica a un material artificial que se implanta en un organismo. Además, los materiales biológicos pueden mantenerse mejor en el tiempo que los materiales artificiales debido a la renovación celular continua.

### Ejemplo 1

#### Obtención de células madre de pulpa dentaria (DPSC) y cultivo celular de las mismas.

Se recogieron los terceros molares impactados humanos de adultos (19-29 años de edad) en la clínica dental del National Institute of Dental & Craniofacial Research según las directrices aprobadas expuestas por la NIH Office of Human Subjects Research. Las DPSC humanas se aislaron y se cultivaron como se ha descrito previamente (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:13625-13630 (2000); Gronthos et al., J. Dent. Res., 81:531-535 (2002)). En resumen, el tejido pulpar se separó de la corona y la raíz y después se digirió en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I (Worthington Biochem, Freehold, NJ) y 4 mg/ml de dispasa (Boehringer Mannheim, GMBH, Alemania) durante una hora a 37°C. Se sembraron  $2 \times 10^4$  células en placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA) con medio de Eagle con modificación alfa (GIBCO BRL, Grand Island, NY) suplementado con suero de ternera fetal al 15% (Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX), ácido L-ascórbico 2-fosfato 100  $\mu$ M (WAKO, Tokyo, Japón), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomocina (Biofluids Inc, Rockville, MD), después se incubaron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%.

### Ejemplo 2

#### Implante de células madre de pulpa dentaria.

Se cortó la raíz de los terceros molares para exponer la cámara pulpar, se retiró una fina capa de dentina pulpar superficial usando una fresa de carburo, la superficie expuesta se trató con ácido acético al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después se lavó tres veces con PBS. La capa fina de dentina pulpar se retiró para eliminar cualquier posible tejido pulpar restante, especialmente odontoblastos. Se cargaron aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  DPSC a 25-35 divisiones de la población sobre la superficie de dentina tratada con ácido/lavada con PBS y se incubaron en el medio de cultivo celular a 37°C durante 12 horas (Figura 1). La apertura de la raíz se selló con Gelfoam (esponja de gelatina absorbible, Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo, MI) y el medio de cultivo se retiró antes del implante. Los complejos dentina/DPSC después se implantaron por vía subcutánea bajo la piel dorsal de ratones beige inmunocomprometidos de 10 semanas de edad (NIH-bg-nu-xid, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) (Figura 1). Se usaron implantes de dentina-DPSC no tratados con ácido y dentina tratada con ácido/lavada con PBS cultivada con fibroblastos cutáneos ( $2,0 \times 10^6$ ) como controles. Estos procedimientos se

realizaron de acuerdo con las especificaciones del protocolo aprobado de animales pequeños (NIDCR n° 00-113). Los implantes se recuperaron a las 8 semanas después del implante, se fijaron con formalina al 4%, se descalcificaron con EDTA al 10% tamponado (pH 8,0), y después se impregnaron en parafina. Las secciones (5 µm) se desparafinizaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

- 5 El almacén de dentina humana tratado con ácido, como control negativo, no indujo ningún componente celular significativo del hospedador *in vivo* (Figura 1A). Además, los fibroblastos cutáneos no lograron generar ningún tejido mineralizado sobre la superficie del almacén de dentina humana (Figura 2B). En contraste, las DPSC fueron capaces de generar dentina reparadora directamente sobre la superficie de dentina humana cuando se co-implantaron en ratones inmunocomprometidos después de tratamiento con ácido y 12 horas de pre-incubación (Figura 2C-E). La formación de dentina reparadora se inició sobre la superficie de dentina humana tratada con ácido que proporcionó un almacén para la dentinogénesis de las DPSC. La dentina reparadora recién formada pudo generarse por los odontoblastos solamente (Figura 2E) o formarse por los odontoblastos con células dentinogénicas atrapadas en el interior de la dentina reparadora (Figura 2C-D). La dentina reparadora recién formada se asoció con un tejido tipo pulpa rico en células que contenía vasos sanguíneos y, en algunas áreas, una cantidad significativa de glóbulos rojos (Figura 2C-D), que es distintivo del tejido conectivo que no tiene asociación con la formación de dentina reparadora (Figura 2A-D). Como la mayor parte de la dentina regeneradora, la dentina recién formada no formaba una estructura organizada de túbulos dentinales, un resultado diferente del mostrado en implantes de DPSC/HA/TCP (Figura 2F). Se implantaron nueve complejos DPSC/dentina en ratones inmunocomprometidos, 3 de 8 (37,5%) complejos DPSC/dentina implantados mostraron claramente formación de dentina reparadora en las secciones examinadas. La tasa de formación de dentina reparadora se estima en más del 37,5% si se examinaban todos los implantes a través de una serie de secciones histológicas.

### Ejemplo 3

#### Inmunohistoquímica de las células madre de pulpa dentaria.

- 25 Se subcultivaron DPSC primarias en portaobjetos de 8 cámaras (2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) (NUNC Inc, Naperville, IL). Después de 5 días de cultivo a 25 divisiones de la población, las células se fijaron en formalina recién preparada al 4% durante 15 minutos, después se lavaron en PBS. Las muestras posteriormente se bloquearon con suero de cabra no inmune al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con anticuerpos primarios en suero de cabra no inmune al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos usados eran contra: Flg (dilución 1:200; de conejo anti-receptor 1 de FGF, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y Flt1 (dilución 1:200; de conejo anti-receptor 1 de VEGF, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Después del lavado, las muestras se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-rojo rodamina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), durante 45 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se montaron en un montaje para fluorescencia VECTASHELD.

- 35 Las secciones del implante de DPSC se trataron con peróxido de hidrógeno para eliminar la peroxidasa endógena. Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos primarios usados eran contra: mitocondria (dilución 1:100; de conejo anti-humano-específico, Chemicon, Temecula, CA); sialoproteína de dentina (dilución 1:400; LF-151, de conejo anti-DSP humana) (Gronthos et al., J. Dent. Res., 81:531-535 (2002)). Se usaron kits Histostain SP para los anticuerpos secundarios biotinilados y la incubación del conjugado enzimático de acuerdo con las instrucciones (Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, CA).

- 40 Para caracterizar la dentina reparadora recién regenerada sobre la superficie de dentina humana pre-existente, se usó tinción inmunohistoquímica para mostrar que el almacén de dentina y las células dentinogénicas de la dentina reparadora recién formada eran positivos para la tinción con anticuerpo DSP (Figura 3A y 3B). El tejido tipo pulpa y el tejido conectivo no lograron mostrar inmunotinción positiva para el anticuerpo DSP (Figura 3A y 3B). Solamente la estructura de dentina peritubular del almacén de dentina era inmunorreactiva al anticuerpo DSP. Por lo tanto, la matriz de dentina reparadora recién formada sin estructura de dentina tubular no logró mostrar una inmunotinción positiva para el anticuerpo DSP (Figura 3B). Se usó inmunohistoquímica anti-mitocondria específica de seres humanos para identificar las células humanas y su patrón de distribución en los implantes de DPSC/dentina. Después de 8 semanas, las DPSC humanas eran capaces de diferenciarse en odontoblastos y convertirse en células dentinogénicas atrapadas en el interior de la dentina reparadora recién formada (Figura 3C y 3D).

- 50 Se cree que las DPSC interactúan con células hospedadoras para iniciar la formación de la dentina y el tejido tipo pulpa. En la regeneración de un complejo dentina/tipo pulpa, se cree que las células donantes estimulan a las células hospedadoras para crear un microentorno, una parte del cual es la vasculatura. Por lo tanto, se examinó si las DPSC expresaban algo de angiogénesis asociada a los receptores celulares. Se determinó que las DPSC expresaban el receptor 1 de FGF y el receptor 1 de VEGF por tinción inmunohistoquímica (Figura 4A-B). La mayoría de las DPSC cultivadas expresaban el receptor 1 de FGF (Figura 4A) y, en contraste, la cantidad de DPSC positivas al receptor 1 de VEGF estuvo limitada (Figura 4B). Además, las células dentinogénicas en los implantes de DPSC/dentina mostraron inmunotinción positiva para el receptor 1 de FGF y el receptor 1 de VEGF (Figura 4D y 4E).

**Ejemplo 4****Transferencia de Western de células madre de pulpa dentaria**

Los lisados preparados a partir del cultivo de DPSC a 25-35 divisiones de la población se separaron en un gel de SDS-PAGE de Tris-Glicina al 12% (Novex, San Diego, CA). Las proteínas después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa BA-S 85 (Schleicher & Schuell, Keene, NH) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en BSA al 3% (p/v) y suero de cabra normal al 3%. Los anticuerpos primarios contra Flg (dilución 1:500) y Flt (dilución 1:500) fueron los mismos que los usados para la tinción inmunohistoquímica. Se usó HSP90 (dilución 1:100, de conejo anti-HSP90, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) como control para confirmar la carga de proteína. Los filtros se lavaron, después se incubaron con una dilución 1:50.000 de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del inmunomarcaje, las membranas se lavaron y se hicieron reaccionar con sustrato quimioluminiscente de HRP Super Signal (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y después se analizaron usando una película Kodak X-Omat (Kodak, Rochester, NY).

El análisis de transferencia de Western indicó que las DPSC expresaban el receptor de FGF y el receptor de VEGF (Figura 4C).

**Ejemplo 5****Anticuerpos usados para caracterizar células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua (incluyendo SHED)**

Los anticuerpos de conejo incluían anti-HSP90, bFGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); anti-CBFA1 (Oncogene Research Product, Cambridge, MA); anti-endostatina, mitocondria específica humana, GAD (Chemicon, Temecula, CA); anti-fosfatasa alcalina (LF-47), sialoproteína ósea (LF-120), MEPE (LF-155), sialofosfoproteína de dentina (LF-151) de NIDCR/NIH. Los anticuerpos de cabra incluían anti-MAP2 y Tau (Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos de ratón incluían anti-STRO-1, CD146 (CC9); GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía), Nestina, Neurofilamento M (NFM), NeuN, CNPasa (Chemicon, Temecula, CA); y anti-tubulina  $\beta$ III (Promega, Madison, WI). También se usaron anticuerpos de control negativo de conejo y murinos de isotipo coincidente (Caltag Laboratories, Burlingame, CA).

**Ejemplo 6****Recogida y cultivo celular de células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua**

Se recogieron incisivos deciduos humanos exfoliados normales de niños de 7-8 años de edad según las directrices aprobadas establecidas por el National Institute of Health Office of Human Subjects Research. La pulpa se separó de la corona remanente y después se digirió en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I (Worthington Biochem, Freehold, NJ) y 4 mg/ml de dispasa (Boehringer Mannheim, GMBH, Alemania) durante una hora a 37°C. Se cultivaron suspensiones celulares individuales en un medio habitual como se ha presentado previamente (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13625-13630 (2000)). Estas técnicas produjeron una población que se ha llamado SHED (células madre de dientes deciduos exfoliados humanos).

Aquí se demuestra que la corona que queda de los dientes deciduos exfoliados contiene un remanente de pulpa viva compuesto de una pulpa dentaria normal que incluye tejido conectivo, vasos sanguíneos, y odontoblastos (Figura 5A-C). Para aislar las células madre, se obtuvieron suspensiones celulares individuales de la pulpa remanente y se pusieron a baja densidad en cultivo líquido. Aproximadamente de 12 a 20 células de cada incisivo exfoliado fueron capaces de formar colonias adherentes (Figura 5D), características de las poblaciones de células madre estromáticas (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13625-13630 (2000)).

Cuando se comparan con células madre estromáticas de médula ósea adulta (BMSSC) y células madre de pulpa dentaria (DPSC), las SHED mostraban una tasa mayor de proliferación (Figura 5G) y una cantidad mayor de divisiones de la población (Figura 5H).

Se descubrió que las SHED expandidas *ex vivo* expresaban las moléculas de superficie celular STRO-1 y CD146 (MUC18), dos marcadores de células madre mesenquimáticas tempranas que previamente se habían encontrado presentes en BMSSC y DPSC (Figura 6D y 6E). Se descubrió que las células STRO-1 y CD146 positivas estaban localizadas alrededor de los vasos sanguíneos de la pulpa remanente por tinción inmunohistoquímica (Figura 6A y 6B), lo que implica que las SHED pueden haberse originado a partir de un microentorno perivascular. Una proporción minoritaria (9%) de SHED expandidas *ex vivo* se teñían positivas para el anticuerpo STRO-1 usando análisis FACS (Figura 6C). Un análisis inmunohistoquímico adicional demostró que las SHED cultivadas expresaban los marcadores estromáticos y vasculares relacionados ALP, MEPE, bFGF, y endostatina (Figura 6F-6I).

Las condiciones para la inducción de la acumulación de calcio fueron las que se han presentado previamente (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13625-13630 (2000)), y se usó BMP-4 humana recombinante (R&D systems, Minneapolis, MN) para inducir la diferenciación osteogénica. La acumulación de calcio se detectó por

tinción con rojo de alizarina S al 2% (pH 4,2). La concentración de calcio se midió usando un kit disponible en el mercado (kit de calcio Sigma nº 587-A).

Para investigar el potencial de las SHED de diferenciarse en tejido mineralizado, se suplementaron cultivos de SHED secundarios establecidos con L-ascorbato-2-fosfato, dexametasona, y fosfato inorgánico como se ha descrito previamente (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13625-13630 (2000)). Se formaron nódulos positivos para el rojo de alizarina en los cultivos de SHED después de cuatro semanas de inducción (Figura 6J y 6K), lo que indica acumulación de calcio *in vitro*. Por consiguiente, el análisis de transferencia de Western reveló que diversos marcadores óseos CBFA1, ALP, MEPE y BSP estaban regulados positivamente en la inducción (Figura 6L). Además, se indujo DSPP por la inducción de la mineralización (Figura 6L). Además, el tratamiento con BMP-4 fue capaz de inducir una expresión regulada positivamente de CBFA1, Osterix, y Osteocalcina (OC) por RT-PCR semi-cuantitativa (Figura 6M). Estos datos indicaron que las SHED tenían la capacidad de diferenciarse en células tipo odontoblasto funcionales *in vitro*.

Las células SHED se indujeron a la adipogénesis con procedimientos usados con diferentes células (Gimble et al., J. Cell. Biochem., 58:393-402 (1995)). Después de cinco semanas de cultivo con un cóctel inductor adipogénico, se descubrió que aproximadamente el 5% de las SHED cultivadas tenían el potencial de desarrollarse en células cargadas de lípido Oil red O-positivas (Figura 10A). Esto se correlacionaba con una regulación positiva en la expresión de dos transcritos específicos de adipositos, PPAR72 y lipoproteína lipasa (LPL), detectados por RT-PCR semi-cuantitativa (Figura 10B).

Para la diferenciación neural, se usaron Neurobasal A (Gibco-BRL), suplemento B27 (Gibco-BRL), penicilina al 1%, 20 ng/ml de EGF (BD Bioscience), 40 ng/ml de FGF (BD Bioscience) para cultivar células adheridas a placas recubiertas con gelatina al 0,1% (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canadá). Para la formación de agrupaciones celulares tipo esfera, se añadieron suero de rata al 3% y B27.

Cuando se cultivaban en condiciones de diferenciación neuronal o en suero de rata al 3% con suplemento B27, estas células formaban agrupaciones tipo esfera (Figura 5E) en las que las células de elevada proliferación se agregaban en agrupaciones que se adherían a la placa de cultivo o flotaban libremente en el medio de cultivo. Después de separar las agrupaciones tipo esfera, las células eran capaces de crecer como células fibroblásticas individuales (Figura 5F).

Se determinó el potencial de las SHED de desarrollarse en células neurales. Para dilucidar el potencial de diferenciación neural de las SHED, se examinó la expresión de los marcadores neurales en SHED. Se determinó que las SHED cultivadas expresaban una diversidad de marcadores celulares neurales incluyendo Nestina, tubulina beta III, GAD, NeuN, GFAP, NFM, y CNPasa medidos por tinción inmunocitoquímica (Figura 8A-8H) y análisis de transferencia de Western (Figura 8I). Después de cuatro semanas de cultivo inductor neural, se aumentaron los niveles de expresión de los marcadores neuronales incluyendo tubulina beta III, GAD, y NeuN, mientras que los niveles de Nestina, GFAP, NFM, y CNPasa permanecían inalterados (Figura 8I). Cuando se cultivaban en estas condiciones, las SHED perdían su morfología fibroblástica y desarrollaban procesos multi-citoplasmáticos que se correlacionaban con la expresión de 30 tubulina beta III/GAD o tubulina beta III/NFM (Figura 8J-8O). Los largos procesos celulares pudieron verse mejor después de la tinción con azul de toluidina y eran inmunorreactivos a anticuerpos contra MAP2 y Tau (Figura 8P-8S). Después del cultivo inductor neural, las SHED siguieron expresando marcadores celulares de la glía tales como Nestina, CNPasa, GFAP, y NFM (Figura 8T-8W).

#### 40 Ejemplo 7

##### Implante de células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua

Se mezclaron aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  SHED con 40 mg de polvo cerámico de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) (Zimmer Inc, Warsaw, IN) y después se implantaron por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos (NIH-bg-nu-xid, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) como se ha descrito previamente (Krebsbach et al., Transplantation, 63: 1059-1069 (1997)).

Para validar la capacidad de las SHED de formar odontoblastos, se implantaron SHED expandidas *ex vivo* en ratones inmunocomprometidos (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13625-13630 (2000); Gronthos et al., J. Dent. Res., 81:531-535 (2002)). Los implantes produjeron odontoblastos alu-positivos específicos humanos directamente asociados con una estructura tipo dentina (Figura 7A y 7B). La dentina regenerada era inmunorreactiva al anticuerpo DSPP específico para dentina (Figura 7C). Estos hallazgos indicaron que las SHED humanas satisfacen un atributo importante de las células madre; la capacidad de diferenciarse en odontoblastos *in vivo*. Sin embargo, las SHED eran incapaces de regenerar un complejo dentina-tipo pulpa completo como DPSC *in vivo* (Figura 7A y 7E). Además, las SHED eran capaces de inducir que las células murinas receptoras se diferenciaron en células formadoras de hueso como se aprecia por la hibridación *in situ* de pf1 específico murino (Figura 7L), y la expresión ausente de DSPP (Figura 7D). Los fibroblastos cutáneos en ningún momento fueron capaces de inducir la formación de hueso después del implante *in vivo*. Por consiguiente, se cree que las SHED son distintivamente diferentes de las DPSC con respecto a la diferenciación odontogénica y la inducción osteogénica.

Después se determinaron las características de las cepas celulares clonales, que se originan cada una de una única

célula de pulpa decidua. Cuando se implantaron doce clones SHED derivados de colonias individuales en ratones inmunocomprometidos, solamente una cuarta parte (3/12) de los clones mostró potencial para generar tejido tipo dentina ectópico en el vehículo HA/TCP equivalente al generado por SHED derivadas de múltiples colonias (Figura 7E y 7G). Se descubrió que las SHED de colonias individuales o de múltiples colonias formaban tejido tipo dentina (Figura 7F) y que sobrevivían en el tejido fibroso dentro de los implantes (Figura 7H) como se demuestra por la hibridación *in situ* de alu específico humano. Estos resultados infieren que las SHED pueden contener subpoblaciones de células, que se diferencian en odontoblastos o que residen en los compartimientos de tejido conectivo. Sorprendentemente, todos los clones SHED derivados de colonias individuales implantados fueron capaces de inducir la formación de hueso en ratones inmunocomprometidos. Aproximadamente el 40% de las cepas celulares clonales (5/12) inducía una cantidad significativa de hueso nuevo, mientras que el 60% restante (7/12) inducía una cantidad limitada de hueso (Figura 7I y 7J). Se descubrió que las SHED se localizaban sobre las superficies de HA/TCP pero no participaban en la formación de hueso como se indica por la hibridación *in situ* de alu específico humano (Figura 7K). En contraste, se descubrió que las células hospedadoras murinas se diferenciaban en osteoblastos y osteocitos como se muestra por la reactividad a hibridación *in situ* de pf1 específico murino (Figura 7L).

Se inyectaron SHED en el cerebro de ratones inmunocomprometidos de acuerdo con las especificaciones de un protocolo aprobado de animales pequeños (NIDCR n° 01-185). Las coordenadas para los sitios diana se determinaron por referencia a un atlas de cerebro murino (Paxinos G et al., 2ª E, 2001) (véase la Figura 9A). Las coordenadas anteroposterior (AP), mediolateral (ML), y dorsoventral (DV) se computaron con relación a Bregma. Se infundieron SHED expandidas *ex vivo* (10.000 células/μl) en el giro dentado del hipocampo (Benedetti et al., Nat. Med., 6:447-450 (2000); Seri et al., Neurosci., 21:7153-7160 (2001)). Las células (0,5 μl/lado) se infundieron en las coordenadas (AP, ML, DV, respectivamente: -1,5 mm, +/-0,8 mm, y -2,0 mm) usando una jeringa Hamilton de 1 μl.

El potencial de desarrollo neural se estudió adicionalmente *in vivo* inyectando SHED en el giro dentado del hipocampo de ratones inmunocomprometidos (Figura 9A). El examen histológico mostró que las SHED sobrevivían durante más de 10 días dentro del microentorno cerebral del ratón como se observa por la tinción con anticuerpo anti-mitocondria específico de seres humanos y continuaban expresando marcadores neurales tales como NFM (Figura 9B).

### Ejemplo 8

#### Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa usada para caracterizar las células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua

Los cebadores de PCR incluían: PPARγ2 con sentido, 5'-CTCCTATTGACCCAGAAAGC-3' (SEC ID N° 1) (114-133), antisentido, 5'-GTAGAGCTGAGTCTTCTCAG-3' (SEC ID N° 2) (441-460, número de acceso a Genbank: XM\_003059); LPL con sentido, 5'-ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC-3' (SEC ID N° 3) (175-195), antisentido, 5'-GTTAGGTCCAGCTGGATCGAG-3' (SEC ID N° 4) (718-738, número de acceso a Genbank: XM\_044682); factor de unión a Core, dominio runt, subunidad alfa 1 (CBFA1) con sentido, 5'-CAGTTCCCAAGCATTTCATCC-3' (SEC ID N° 5) (880-900), antisentido, 5'-TCAATATGGTCGCCAAACAG-3' (SEC ID N° 6) (1304-1323, número de acceso a Genbank: L40992); Osterix con sentido, 5'-GCAGCTAGAAGGGAGTGGTG-3' (SEC ID N° 7) (821-840), antisentido, 5'-GCAGGCAGGTGAACTTCTTC-3' (SEC ID N° 8) (1160-1179, número de acceso a Genbank: XM\_062600); Osteocalcina con sentido, 5'-CATGAGAGCCCTCAC-3' (SEC ID N° 9) (18-33), antisentido, 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3' (SEC ID N° 10) (316-332, número de acceso a Genbank: X53698); GAPDH con sentido, 5'-AGCCGCATCTTCTTTGCGTC-3' (SEC ID N° 11) (12-32), antisentido, 5'-TCATATTTGGCAGGTTTTCT-3' (SEC ID N° 12) (807-827, número de acceso a Genbank: M33197). El aislamiento del ARN total, la síntesis del ADNc de primer cadena y los procesos de PCR fueron como se ha descrito previamente (Gronthos et al, J. Dent. Res., 81:531-535 (2002)).

### Ejemplo 9

#### Hibridación *in situ* usada para caracterizar las células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua

Se usaron secuencias alu específicas humanas y pf1 específicas murinas marcadas con digoxigenina como sondas para la hibridación *in situ* como se ha descrito previamente (Gronthos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13625-13630 (2000)). Los cebadores incluían: alu humano, con sentido, 5'TGGCTCACGCCTGTAATCC-3' (SEC ID N° 13) (90-108), antisentido, 5'-TTTTTTGAGACGGAGTCTCGC-3' (SEC ID N° 14) (344-364, número de acceso a Genbank: AC004024); y pf1 murino, con sentido, 5'-CCGGCAGTGGTGGCGCATGCCTTTAAATCCC-3' (SEC ID N° 15) (170-201), antisentido, 5'-GTTTGGTTTTGAGCAGGGTCTCTGTGTAGC-3' (SEC ID N° 16) (275-306, número de acceso a Genbank: X78319).

**Ejemplo 10****Inmunohistoquímica usada para caracterizar las células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua**

Las SHED se subcultivaron en portaobjetos de 8 cámaras ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) (NUNC Inc, Naperville, IL). Las células se fijaron en formaldehído al 4% durante 15 minutos y después se bloquearon y se incubaron con anticuerpos primarios (dilución 1:200 a 1:500) durante 1 hora, respectivamente. Las muestras se incubaron posteriormente con anticuerpos secundarios de cabra de IgG-rojo rodamina o IgG-CyTM2 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), durante 45 minutos. Para la tinción inmunohistoquímica enzimática, se usó el kit de AEC de inmunoperoxidasa de amplio espectro Zymed (Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

**10 Ejemplo 11****Análisis de transferencia de Western usado para caracterizar las células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua**

Los anticuerpos primarios fueron los mismos que los usados en la tinción inmunohistoquímica a diluciones que variaban de 1:200 a 1:1000. La transferencia de Western se ha presentado previamente (Shi et al., Bone, 29:532-539 (2001)).

**Ejemplo 12****Clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) usada para caracterizar las células madre multipotentes postnatales humanas de pulpa dentaria decidua**

Se recogieron SHED de cultivo y se incubaron con anticuerpos STRO-1 (IgM) o anticuerpos de control negativo de isotipo coincidente durante una hora en hielo. El análisis FACS fue el mismo que el descrito previamente (Gronthos et al., J. Dent. Res., 81:531-535 (2002)).

**Documentos**

- About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA (2000). Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 258(1):33-41.
- 25 About I, Murray PE, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ (2001). Pulpal inflammatory responses following non-carious class V restorations. *Oper Dent* 5 26(4):336-42.
- Azizi, S. A., Stokes, D., Augelli, B. J., DiGirolamo, C. & Prockop, D. J. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3908-13.
- Bacigalupo A, Frassoni F, Van Lint MT (2000). Bone marrow or peripheral blood as a source of stem cells for allogeneic transplants. *Curr Opin Hematol* 7(6):343-7.
- 30 Baum BJ, Mooney DJ (2000). The impact of tissue engineering on dentistry. *J Am Dent Assoc* 131(3):309-18.
- Benedetti, S., Pirola, B., Pollo, B., Magrassi, L., Bruzzone, M. G., Rigamonti, D., Galli, R., Selleri, S., Di Meco, F., De Fraja, C., Vescovi, A., Cattaneo, E. & Finocchiaro, G. (2000) *Nat Med* 6, 447-50.
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. & Vescovi, A. L. (1999) *Science* 283, 534-7.
- 35 Bouma-ter Steege JC, Mayo KH, Griffioen AW (2001). Angiostatic proteins and peptides. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 11(4):319-34.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. & Blau, H. M. (2000) *Science* 290, 1775-9.
- Brock DP, Marty-Roix R, Spector M (2002). Alpha-smooth-muscle actin in and contraction of porcine dental pulp cells. *J Dent Res* 81(3):203-8.
- 40 Buchaille R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F (2000). A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells. *Matrix Biol* 19(5):421-30.
- Butler WT, Ritchie HH, Bronckers AL (1997). Extracellular matrix proteins of dentine. *Ciba Found Symp* 205(107-15).
- Buurma B, Gu K, Rutherford RB (1999). Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds. *Eur J Oral Sci* 107(4):282-9.
- 45 Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Jr., Han, J., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. & Sucov, H. M. (2000) *Development* 127:1671-9.

- D'Amour, K. A. & Gage, F. H. (2002) *Nat Med* 8: 213-4.
- Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M (2000). Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* 4(2): 110-9.
- 5 Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. & Mavilio, F. (1998) *Science* 279: 1528-30.
- Gage, F. H. (2000) *Science* 287:1433-8.
- Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M. G., Bjornson, C, Coletta, M., Mora, M., De Angelis, M. G., Fiocco, R., Cossu, G. & Vescovi, A. L. (2000) *Nat Neurosci* 3: 986-91.
- 10 Gimble, J. M., Morgan, C, Kelly, K., Wu, X., Dandapani, V., Wang, C. S. & Rosen, V. (1995) *J Cell Biochem* 58: 393-402.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81(8): 531-5. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13625-30.
- 15 Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G. & Shi, S. (2002) *J Dent Res* 81: 531-5.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G. & Shi, S. (2000) *Proc Natl Acad Sci US A* 97: 13625-30.
- Kaigler D, Mooney D (2001). Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 65(5):456-62.
- 20 Kettunen P, Karavanova I, Thesleff I (1998). Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet* 22(4):374-85.
- Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S. A., Satomura, K., Emmons, R. V., Rowe, D. W. & Robey, P. G. (1997) *Transplantation* 63: 1059-69.
- 25 Kuo MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn LJ (1992). Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol* 37(II):945-52.
- LaBonne, C. & Bronner-Fraser, M. (1999) *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:81-112.
- Mann LM, Lennon DP, Caplan AI (1996). Cultured rat pulp cells have the potential to form bone, cartilage, and dentin in vivo. In *Biological Mechanisms of Tooth Movement and Craniofacial Adaptation*. Editado por Davidovitch Z y Norton LA. Boston, MA. Harvard Society for the Advancement of Orthodontics, pág. 7-16. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, Nagaoka S, Abeyama K, Maruyama I, Torii M (2000). The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res* 79(8): 1596-603.
- 30 Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. (2000) *Science* 290: 1779-82.
- Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. & Marshak, D. R. (1999) *Science* 284: 143-7.
- 35 Murray PE, About I, Lumley PJ, Smith G, Franquin JC, Smith AJ (2000). Postoperative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc* 131(3):321-9.
- Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH (1994). Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol* 162(1): 18-28.
- 40 Nosrat, I. V., Widenfalk, J., Olson, L. & Nosrat, C. A. (2001) *Dev Biol* 238: 120-32.
- Onishi T, Kinoshita S, Shintani S, Sobue S, Ooshima T (1999). Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum-free culture medium by insulin-like growth factor. *Arch Oral Biol* 44(4):361-71.
- Ornitz DM, Marie PJ (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16(12): 1446-65.
- 45 Parner, E. T., Heidmann, J. M., Kjaer, I., Vaeth, M. & Poulsen, S. (2002) *J Dent Res* 81: 451-4.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C, Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. & Goff, J. P. (1999) *Science* 284: 5 1168-70.

- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Prockop, D. J. (1997) *Science* 276: 71-4.
- Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT (2002). The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 81(6):392-4.
- 5 Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S. & Alvarez-Buylla, A. (2001) *J Neurosci* 21: 7153-60.
- Shi S, Robey PG, Gronthos S (2001). Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 29(6):532-9.
- Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y (1998). Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 174(2): 194-205.
- 10 Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H, Noshiro M, Kamihagi K, Katayama M, Kato Y (1995). Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Dev Biol* 170(2):457-66.
- 15 Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ (2000). Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Arch Oral Biol* 45(2):173-7. Sloan AJ, Smith AJ (1999). Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol* 44(2): 149-56.
- Smith AJ, Lesot H (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med* 12(5):425-37.
- 20 Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. & Kai, T. (2001) *Nature* 414: 98-104.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. & Scott, E. W. (2002) *Nature* 416: 542-5.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R. & Miller, F. D. (2001) *Nat Cell Biol* 3: 778-84.
- 25 Traver D, Zon LI (2002). Walking the walk: migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell* 108(6):731-4.
- Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, Mori M (1992). Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol* 37(12):1045-55.
- Weissman, I. L. (2000) *Science* 287:1442-6.
- 30 Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. & Smith, A. G. (2002) *Nature* 416: 545-8.
- Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, Fujieda K, Katayama I, Matsuoka T, Katayama T (2000). Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif Tissue Int* 66(2):139-44.

## REIVINDICACIONES

1. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada; en la que:
 

la célula madre es de un diente deciduo exfoliado humano; la célula madre puede diferenciarse en una célula neural, un adipocito, y un odontoblasto; la célula madre tiene una tasa de proliferación mayor y una cantidad mayor de divisiones de población que las células madre estromáticas de médula ósea adulta (BMSSC) y las células madre de pulpa dentaria (DPSC); la célula madre expresa STRO-1, CD146, ALP, glucoproteína extracelular de matriz LF155, factor de crecimiento de fibroblastos básico, endostatina, o una combinación de los mismos; y la célula madre puede proliferar hasta más de 140 divisiones de la población.
2. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula madre puede expresar CBFA1, ALP, MEPE, BSP, DSPP, o cualquier combinación de los mismos después de inducción de la mineralización.
3. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula madre puede expresar CBFA1, Osterix, Osteocalcina, o cualquier combinación de los mismos después de inducción con BMP-4.
4. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula madre puede expresar nestina, tubulina  $\beta$ III, ácido glutámico descarboxilasa, núcleos neuronales, proteína ácida fibrilar de la glía, neurofilamento M, nucleótido-2',3' cíclico-3'-fosfodiesterasa, o cualquier combinación de los mismos después de inducción neural.
5. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento para generar hueso, producir tejido neural humano o producir tejido adiposo humano en un organismo.
6. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento para generar dentina en un organismo.
7. La célula madre de la reivindicación 6, en la que el procedimiento comprende (a) poner en contacto la dentina pre-existente con la célula madre, y (b) incubar la dentina pre-existente y la célula madre.
8. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para generar hueso en un organismo implantando el medicamento que contiene al menos una de las células madre en el organismo.
9. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 8, en la que la célula madre se implanta después de inducción de la mineralización o inducción con BMP-4.
10. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 8, en la que la célula madre induce a una célula receptora a producir hueso.
11. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 10, en la que la célula receptora es un osteoblasto o un osteocito.
12. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 8, en la que la célula madre se implanta para reducir o mejorar un traumatismo dentro del organismo.
13. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 12, en la que el traumatismo es una enfermedad degenerativa ósea, preferiblemente osteoporosis.
14. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 12, en la que el traumatismo es una lesión física, preferiblemente debida al remplazo de una articulación, el remplazo de una cadera, o un conducto radicular.
15. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para producir tejido neural humano en un organismo implantando el medicamento que contiene al menos una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua en el organismo.
16. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 15, en la que la célula madre dental se implanta después de inducción neural.
17. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 15, en la que la célula madre dental se implanta en tejido neural contenido dentro del organismo.
18. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 15, en la que la célula madre dental se implanta para reducir o mejorar un traumatismo neural dentro del organismo.
19. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 18, en la que el traumatismo neural es una enfermedad degenerativa neural, preferiblemente enfermedad de Alzheimer o

enfermedad de Parkinson.

20. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 18, en la que el traumatismo neural es una lesión física.
- 5 21. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para producir tejido adiposo humano implantando el medicamento que contiene al menos una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua en un organismo.
22. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 21, en la que la célula madre dental se implanta después de inducción de adipocitos.
- 10 23. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para generar dentina implantando el medicamento que contiene una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua en un organismo.
- 15 24. Una célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para generar dentina por un procedimiento que comprende (a) poner en contacto la dentina pre-existente con una célula madre dental, y (b) incubar la dentina pre-existente y la célula madre dental.
25. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 24, en la que la dentina pre-existente se pone en contacto con la célula madre dental *in vivo* o *in vitro*.
26. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 24, en la que la dentina pre-existente está contenida dentro de un diente.
- 20 27. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 24, en la que la dentina pre-existente es dentina humana pre-existente.
28. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 24, que comprende adicionalmente poner en contacto la dentina pre-existente con una formulación para producir dentina tratada.
- 25 29. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 28, que comprende adicionalmente lavar la dentina tratada con un fluido, preferiblemente agua, un disolvente biológico, o un tampón biológico.
- 30 30. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 28, en la que la formulación es una solución ácida, preferiblemente ácido acético, ácido fosfórico, ácido fórmico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, o ácido bromhídrico.
31. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 30, en la que la solución ácida tiene una concentración entre el 0,01% y el 100% de ácido, preferiblemente entre el 1% y el 10% de ácido, más preferiblemente entre el 1% y el 5% de ácido, más preferiblemente entre el 0,5% y el 2% de ácido.
- 35 32. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 28, en la que la formulación es una solución básica, preferiblemente hidróxido sódico, hidróxido potásico, o hidróxido de amonio.
33. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 32, en la que la solución básica tiene una concentración entre el 0,01% y el 100% de base, preferiblemente entre el 1% y el 10% de base, más preferiblemente entre el 1% y el 5% de base, más preferiblemente entre el 0,5% y el 2% de base.
- 40 34. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 24, en la que la dentina se genera en respuesta a un traumatismo en el diente.
35. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de la reivindicación 34, en la que el traumatismo es un conducto radicular.
- 45 36. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8, 15, 21 o 23, en la que el organismo es un mamífero, preferiblemente un ser humano.
37. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8, 15, 21, 23 o 24, en la que la célula madre se expande *ex vivo*.
38. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8, 15, 21, 23 o 24, en la que la célula madre se implanta en combinación con un vehículo.
- 50 39. La célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua de acuerdo con la reivindicación 38,

en la que el vehículo comprende hidroxiapatita, fosfato tricálcico, o hidroxiapatita y fosfato tricálcico.

40. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula se transfecta con un segmento de ácido nucleico.
41. Uso de pulpa dentaria decidua postnatal humana para obtener una célula madre multipotente postnatal humana decidua aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho uso es *ex vivo*.
- 5 42. El uso de la reivindicación 41 que comprende las etapas de:
- separar la pulpa de la corona remanente de un diente deciduo humano,
- formar una suspensión de células individuales a partir de la pulpa,
- cultivar la suspensión de células individuales en un medio líquido en cultivo tisular; y
- aislar las colonias adherentes del cultivo tisular;
- 10 produciendo de este modo la célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada.
43. El uso de la reivindicación 41 o 42, que comprende adicionalmente congelar la célula madre multipotente postnatal humana de pulpa dentaria decidua aislada.
44. El uso de la reivindicación 42, en la que el medio comprende suero.
- 15 45. El uso de la reivindicación 42, en la que el medio es un medio sin suero que contiene bFGF, opcionalmente contiene EGF, y opcionalmente contiene suplemento B27.
46. El uso de la reivindicación 42, en la que la formación de una suspensión de células individuales a partir de la pulpa comprende digerir la pulpa con colagenasa tipo I y dispasa.
47. El uso de la reivindicación 42, en la que el diente deciduo humano es un incisivo.
48. El uso de la reivindicación 47, en la que el diente deciduo humano es de niños de 7 a 8 años de edad.

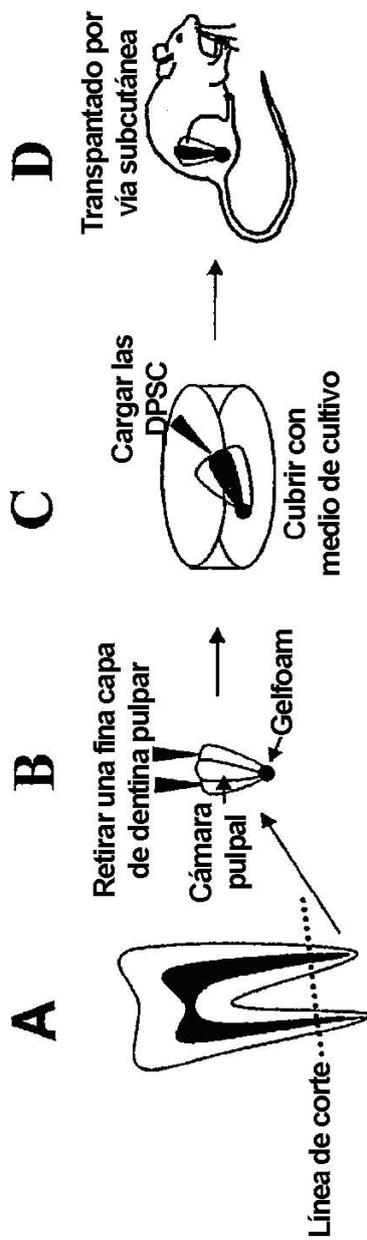


Fig. 1

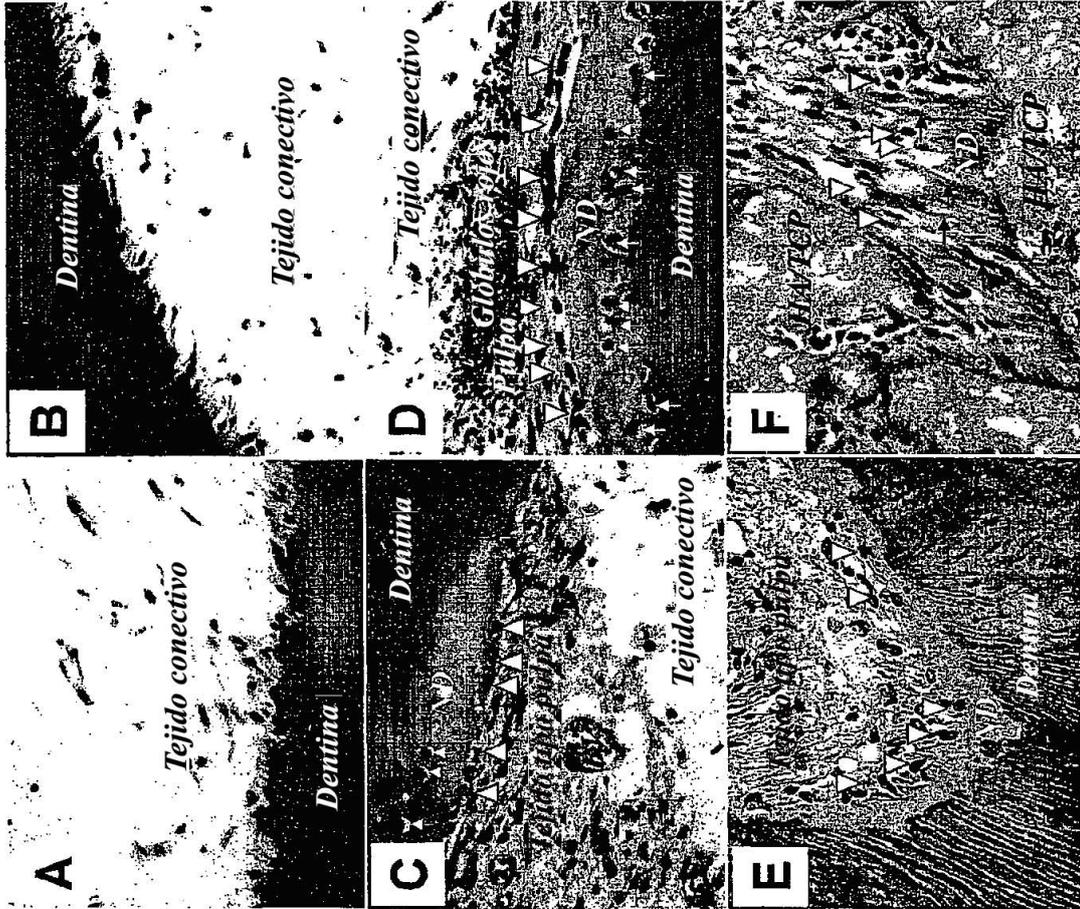


Fig. 2

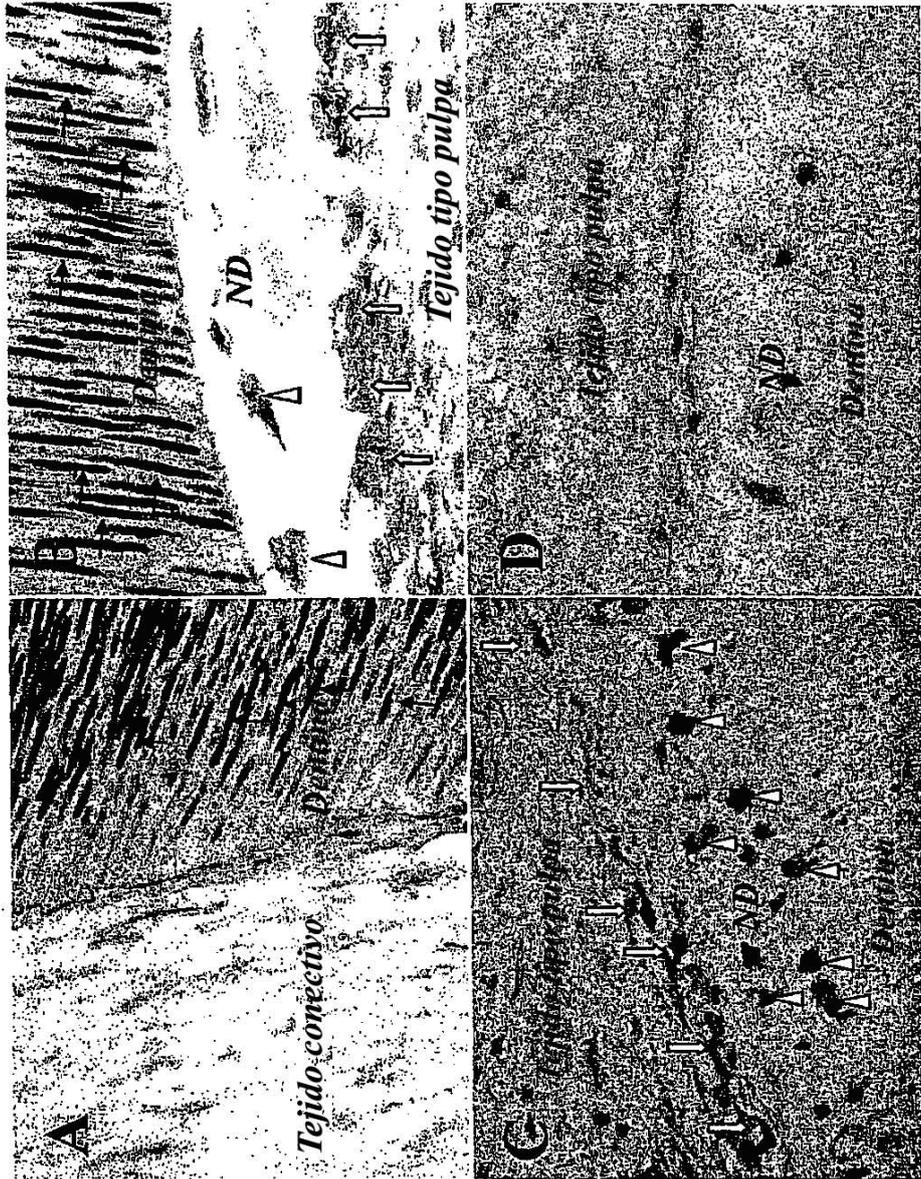


Fig. 3

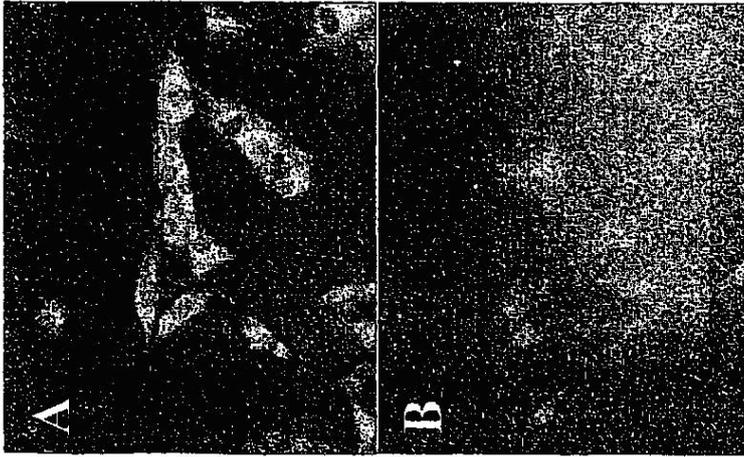


Fig. 4Ay 4B

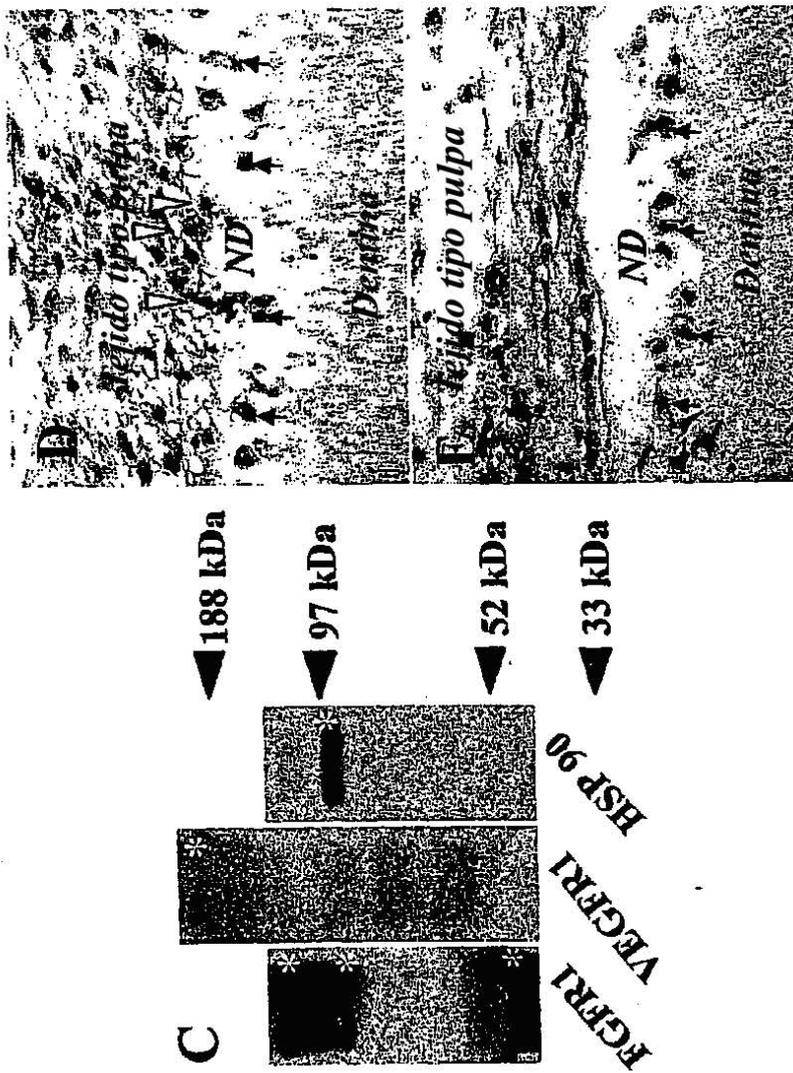


Fig. 4C, 4D, y 4E

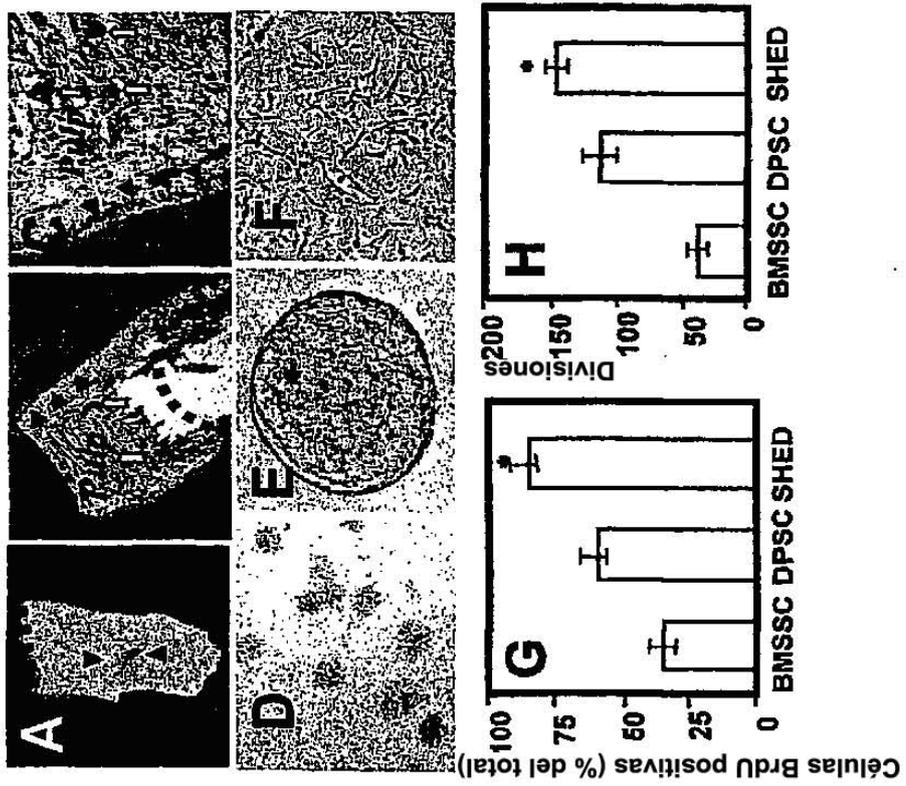


Fig. 5

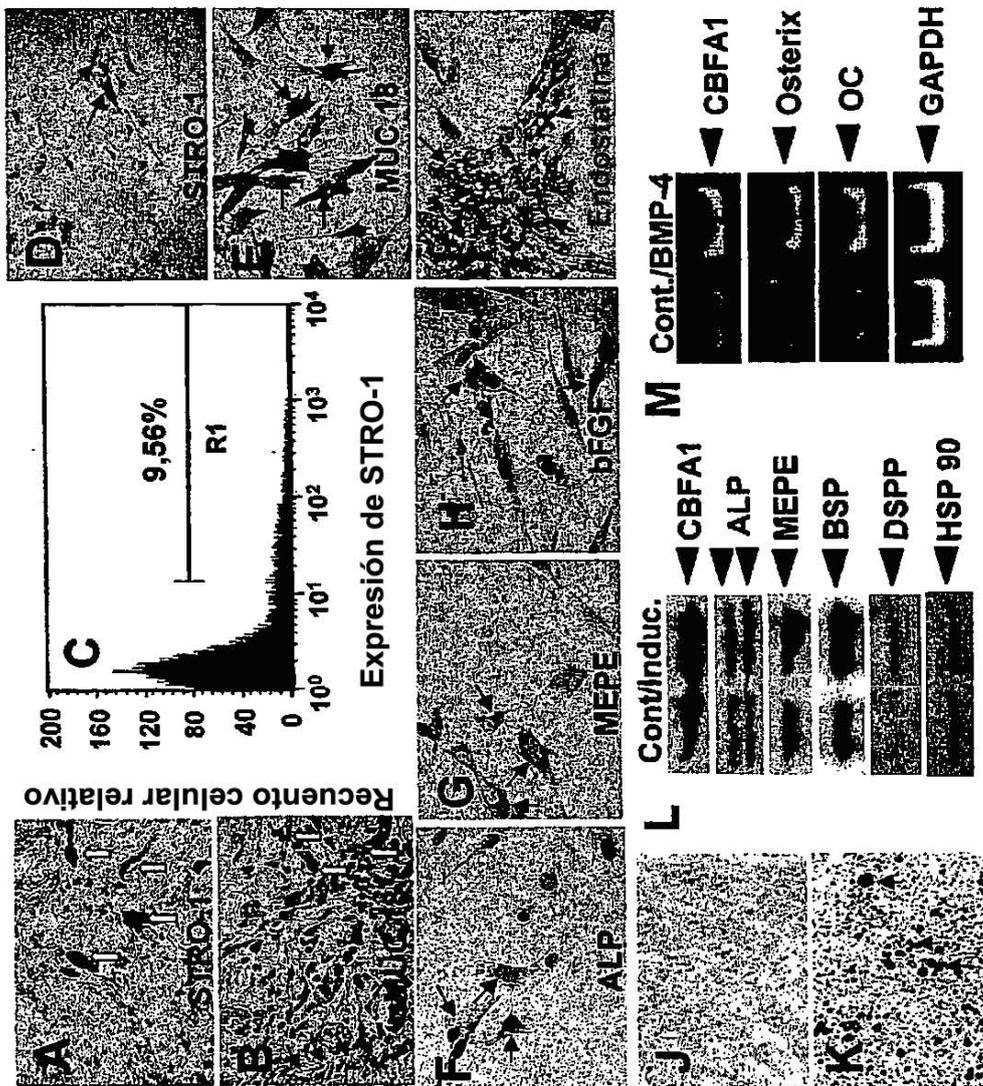


Fig. 6

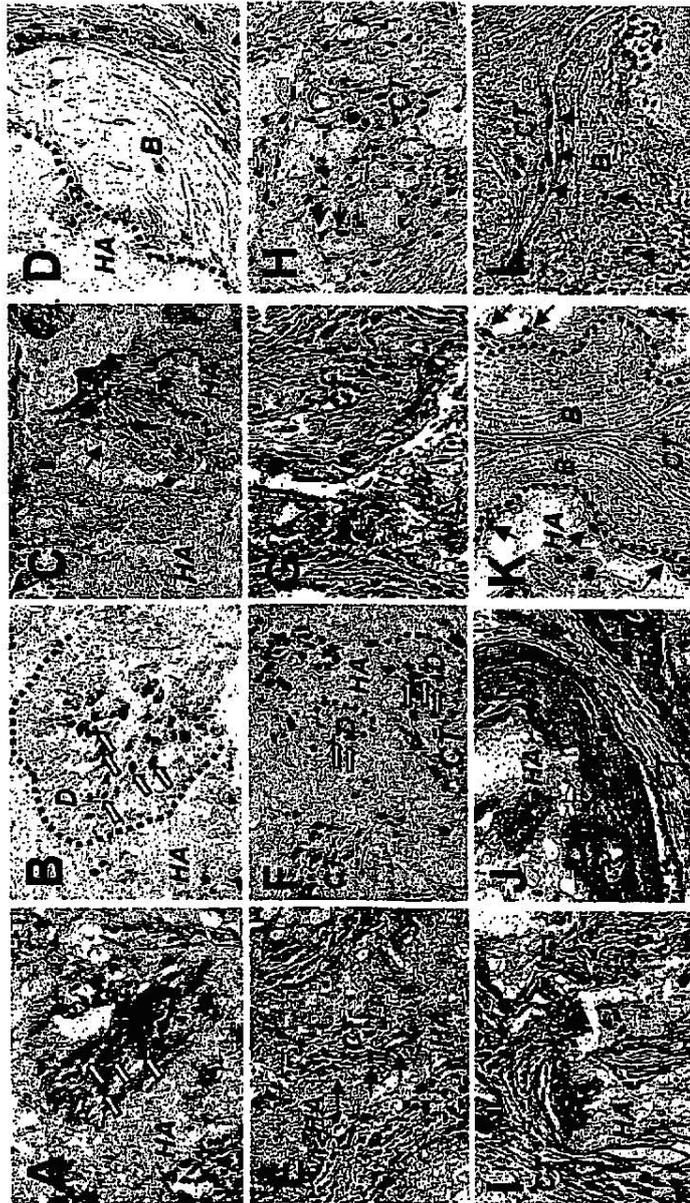


Fig. 7

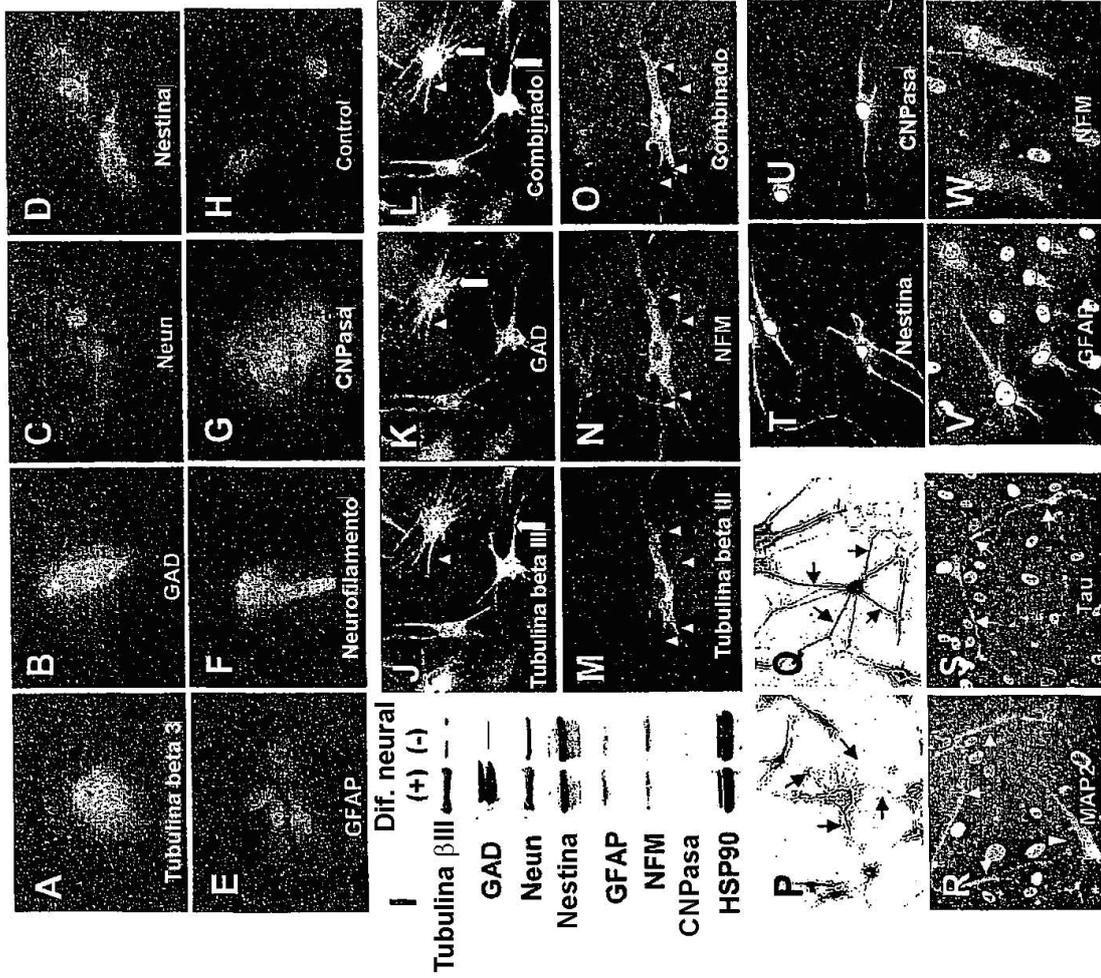


Fig. 8

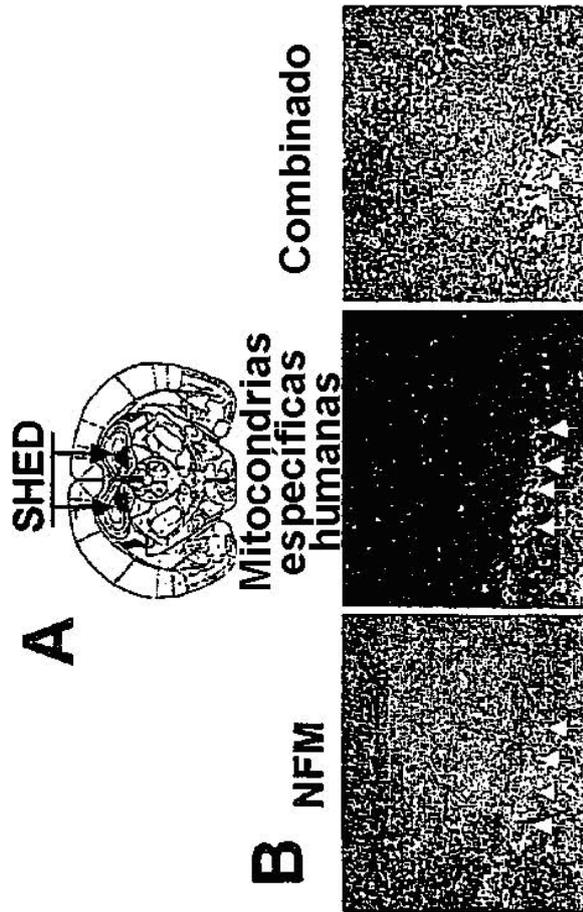


Fig. 9

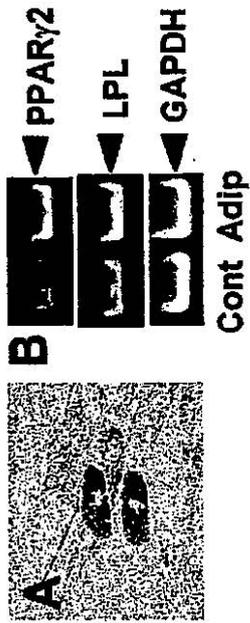


Fig. 10