

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 964**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A61K 6/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2004** **E 12173266 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017** **EP 2527427**

54 Título: **Células madre multipotentes postnatales de ligamento periodontal humano y usos**

30 Prioridad:

**20.11.2003 US 523602 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.05.2017**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)  
National Institutes of Health Office of Technology Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325  
Rockville, MD 20852, US**

72 Inventor/es:

**MIURA, MASAKO;  
SHI, SONGTAO y  
SEO, BYOUNG-MOO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 610 964 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 multipotentes postnatales de ligamento periodontal humano y usos

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere, en términos generales, a las células madre del ligamento periodontal postnatal (PDLSC) y a sus métodos de uso. Más concretamente, la invención se refiere a las PDLSC, el uso de las células para la regeneración del tejido periodontal para el tratamiento de enfermedades periodontales, la diferenciación de las células y métodos de criopreservación de tejidos.

**Antecedentes de la invención**

10 Las células madre postnatales (es decir, aquellas presentes tras el nacimiento) son células no especializadas que se pueden renovar en gran medida y convertirse en células más maduras con funciones especializadas. Las células madre se pueden inducir bajo determinadas condiciones fisiológicas o experimentales para que se conviertan en células con funciones especiales, como células latentes del músculo cardíaco o células pancreáticas productoras de insulina. El proceso por el que una célula se  
15 convierte en una célula con funciones especiales se conoce como diferenciación. La diferenciación se puede inducir mediante el uso de múltiples señales que pueden incluir sustancias químicas secretadas por otras células, contacto físico con células vecinas y determinadas moléculas del microentorno. De este modo, las células madre se pueden tratar con señales específicas para que se conviertan en tipos de células específicas con funciones útiles. Estas nuevas células diferenciadas se pueden utilizar después para generar reemplazos para células que se pierden como consecuencia del deterioro y desgaste  
20 normales, de lesiones o enfermedades.

Las enfermedades periodontales (de las encías), entre las que se incluyen la gingivitis y la periodontitis, son infecciones graves que pueden provocar la pérdida de piezas dentales si no se tratan. En efecto, las enfermedades periodontales son una causa importante de pérdida de piezas dentales y suponen una carga sustancial para la sanidad pública. Las enfermedades periodontales se caracterizan por la  
25 destrucción del periodoncio (el tejido que soporta los dientes, es decir, las encías), incluyendo el ligamento periodontal (PDL), el cemento, el hueso alveolar y las encías. La enfermedad periodontal puede afectar a una o varias piezas dentales. Se han desarrollado múltiples métodos para el tratamiento de los defectos periodontales, incluyendo la regeneración de tejido guiada, el uso de factores de crecimiento y el uso de proteínas de la matriz del esmalte, pero ninguno de estos métodos ofrece un resultado uniformemente  
30 predecible. Por consiguiente, persiste la necesidad de encontrar nuevos métodos para el tratamiento de las enfermedades periodontales. Lekic et al., Anatomical Record, v262, n.º 2, 2001, pág. 193-202 divulga el trasplante de células de ligamento periodontal en heridas periodontales.

**Resumen de la invención**

35 La invención se define en las reivindicaciones. Se proporciona métodos y materiales en relación con las mencionadas necesidades. La presente invención se basa en una nueva población de células madre postnatales derivadas del ligamento periodontal (PDL) humano, denominadas células madre del ligamento periodontal (PDLSC). La invención proporciona una célula madre multipotente aislada del ligamento periodontal postnatal humano, un método para implante de una célula periodontal en un organismo, un  
40 método para implante de un adipocito en un organismo y un método para generar tejido periodontal, incluyendo cemento y ligamento periodontal, in vivo e in vitro.

Las células madre multipotentes de ligamento periodontal postnatal se pueden diferenciar en células formadoras de fibras de colágeno (fibroblastos), cementoblastos, cementocitos y adipocitos. Las células madre se pueden obtener del ligamento periodontal y se pueden almacenar para su posterior uso. La célula madre multipotente de ligamento periodontal se puede cultivar en un medio de cultivo tisular.  
45 Preferiblemente, el medio de cultivo tisular incluye suero. Preferiblemente, el medio de cultivo tisular no incluye suero. El medio de cultivo tisular puede incluir uno o más factores de crecimiento.

La divulgación también proporciona métodos para generar tejido periodontal, incluyendo ligamento periodontal y cemento, mediante la implantación en un sujeto de una célula madre de ligamento periodontal o una célula progenitora diferenciada de esta. Por lo general, el método implica la implantación  
50 de una célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal en un sujeto. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano. La célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal se puede obtener de un sujeto e implantarse en un sujeto diferente.

Preferiblemente, la célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal se obtiene del mismo sujeto en el que se implanta. La célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal se puede expandir ex vivo antes de ser implantada en el sujeto. La célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal se puede inducir para su diferenciación antes de ser implantada en el sujeto. Una célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal que no está combinada con un portador se puede implantar en un sujeto. Una célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal que está combinada con un portador se puede implantar en un sujeto. Preferiblemente, el portador contiene  
55 hidroxapatita. Más preferiblemente, el portador contiene fosfato tricálcico. Más preferiblemente, el portador contiene hidroxapatita y fosfato tricálcico. El método puede ser empleado para generar

células/tejido periodontal en respuesta a un traumatismo en el periodoncio.

Preferiblemente, el traumatismo es una erosión del periodoncio. Más preferiblemente, el traumatismo es el resultado de una enfermedad periodontal.

5 La divulgación proporciona un método para producir tejido adiposo en un sujeto. Por lo general, el método implica la implantación de una célula madre de ligamento periodontal en un organismo.

Preferiblemente, la célula madre de ligamento periodontal es una célula madre multipotente de ligamento periodontal.

10 Más preferiblemente, la célula madre de ligamento periodontal es una célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal humano. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano. La célula madre de ligamento periodontal se puede expandir *ex vivo* antes de ser implantada en el organismo. Preferiblemente, se induce la adipogénesis de la célula madre de ligamento periodontal antes de su implantación en el sujeto. Una célula madre de ligamento periodontal que no está combinada con un portador se puede implantar en un sujeto. Una célula madre de ligamento periodontal que está combinada con un portador se puede implantar en un sujeto.

15 La divulgación también proporciona un método para la criopreservación de tejido del que posteriormente se pueden aislar células madre periodontales funcionales, sumergiendo una porción de un ligamento periodontal aislada en suero que contiene aproximadamente entre un 1% y un 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) y congelando rápidamente el ligamento periodontal sumergido, criopreservando de este modo las células madre periodontales. En un método preferible, el suero incluye aproximadamente un 10% de DMSO. Preferiblemente, el ligamento periodontal es de mamífero. Más preferiblemente, el ligamento periodontal es un ligamento periodontal humano. Generalmente, el tejido criopreservado se descongela a una temperatura de entre 35°C y 39°C aproximadamente. Tras la descongelación, el ligamento se somete a digestión o disrupción mecánica para formar una suspensión de células individuales y esta suspensión de células individuales se siembra en un recipiente para el cultivo tisular (por ejemplo, un matraz de cultivo tisular) en presencia de un medio, como un medio de células madre.

20

25

La divulgación prevé asimismo el uso de las PDLSC en terapia médica, incluyendo, entre otros, el tratamiento de un traumatismo en el periodoncio. La divulgación prevé asimismo el uso de PDLSC en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un traumatismo en el periodoncio. El traumatismo puede estar causado, por ejemplo, por una enfermedad periodontal, un procedimiento dental o un traumatismo físico, como un accidente.

30

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra el aislamiento de PDLSC humanas. A) Tercer molar humano extraído en el que se muestra el PDL unido a la superficie de las raíces (flecha). B) Colonias individuales formadas después de colocar las PDLSC en placas a baja densidad y cultivarlas como se describe a continuación. C) Los grupos de células obtenidos del PDL formaron una única colonia teñida con azul de toluidina al 0,1%. D) La eficacia del marcado con bromodesoxiuridina (BrdU) de las PDLSC y DPSC fue evaluada incorporando BrdU durante 24 horas. El número de células BrdU positivas se expresó como un porcentaje del número total de células cuyo recuento se realizó en seis cultivos replicados como se muestra en el diagrama de caja.

35

40 Las PDLSC demostraron un mayor índice de absorción que las DPSC, aunque no se produjo una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,294$ ). Las líneas horizontales son los valores medios.

Las barras muestran los valores máximos y mínimos. E-F) La tinción inmunocitoquímica demostró que las PDLSC cultivadas expresaban STRO-1 (Figura E) y CD146/MUC18 (Figura F), dos marcadores de progenitores mesenquimales tempranos. G-H) El tejido de PDL fue positivo al anticuerpo STRO-1 con tinción inmunohistoquímica (Figura G) y fluorescencia (Figura H).

45

I) Se hicieron reaccionar suspensiones de células individuales recién aisladas de PDL humano con el anticuerpo STRO-1 tras inmunoselección con perlas magnéticas Dynal, tal como se describe a continuación. Posteriormente se realizaron ensayos clonogénicos con fracciones de células no fraccionadas (en bruto), STRO-1 negativas (STRO-1-) y STRO-1 positivas (STRO-1+). Los datos obtenidos de cinco muestras de PDL individuales se muestran en el diagrama de caja.

50

Las líneas horizontales resaltadas en los diagramas de caja son los valores medios. J) La RT-PCR (izquierda) y el análisis Northern Blot (derecha) demostraron que las PDLSC cultivadas (P) expresaron unos niveles superiores de escleraxis, un factor de transcripción que se expresa específicamente en las células del tendón, en comparación con las DPSC (D) y BMSSC (B). GAPDH = gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa (control).

55

La Figura 2 muestra la expresión del fenotipo cementoblástico/osteoblástico en las PDLSC. La tinción con rojo alizarina demostró unas cantidades limitadas de formación de nódulos mineralizados en los cultivos de PDLSC (A). En comparación con los cultivos de DPSC inducidas (B), los cultivos de PDLSC acumularon una menor cantidad de calcio que las DPSC ( $p = 0,0026$ , C). D) La tinción inmunocitoquímica demostró que las PDLSC expresaban marcadores cementoblásticos/osteoblásticos, incluyendo fosfatasa

60

alcalina (ALP), proteína extracelular de la matriz (MEPE), sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OSC) y receptor de TGF tipo I (TGFβR1). E). El análisis de Western blot confirmó la expresión de los marcadores cementoblasticos/osteoblasticos;

se utilizó HSP90 para valorar la cantidad de proteína cargada por muestra.

5 La Figura 3 demuestra la diferenciación adipogénica de las PDLSC. A)

Las PDLSC cultivadas formaron grupos de lípidos positivos en aceite rojo O después de tres semanas de inducción, en presencia de 0,5 μM isobutilmetilxantina, 0,5 μM hidrocortisona y 60 μM indometacina. B) El medio de cultivo estándar no indujo ningún grupo de lípidos positivos en aceite rojo O. C) Se observó una importante regulación al alza de los marcadores adipogénicos PPARγ2 y lipoproteinlipasa (LPL) en el grupo inducido con el cóctel adipogénico (Adipo) en comparación con el grupo de control (Cont) mediante RT-PCR.

10 La Figura 4 demuestra la generación de estructuras similares a cemento y PDL in vivo por las PDLSC. A) Ocho semanas después del trasplante, las PDLSC se diferenciaron en células similares a cementoblastos (flechas) que formaron una estructura similar al cemento (C) sobre la superficie del portador de fosfato tricálcico de hidroxiapatita (HA); también se generaron células similares a cementocitos (triángulos) y tejido similar a PDL (PDL). B) Se utilizó el trasplante de BMSSC como control, para mostrar la formación de una estructura de hueso/médula que contiene osteoblastos (flechas), osteocitos (triángulos) y elementos de hueso (B) y médula hematopoyética (HP). B) El trasplante de DPSC también se utilizó como control, para mostrar una estructura similar a dentina/pulpa que contiene odontoblastos (flechas) y tejido similar a la dentina (D) y similar a la pulpa (Pulp). D) La tinción inmunohistoquímica demostró que las PDLSC generaron una estructura similar al cemento (C) y se diferenciaron en células similares a cementoblastos (flechas) y células similares a cementocitos (triángulos) que mostraron una tinción positiva para el anticuerpo mitocondrial específico humano. Parte del tejido similar a PDL (PDL) también mostró una tinción positiva para el anticuerpo mitocondrial específico humano (dentro de la línea discontinua). E) De 13 cepas seleccionadas de PDLSC obtenidas de una única colonia, ocho (61%) generaron estructuras similares a cemento/PDL in vivo, tal como se muestra en el aumento inferior (aproximadamente 20x). Se formó una nueva estructura similar a cemento (C) adyacente a las superficies del portador (HA) y asociada con el tejido similar a PDL (PDL). F) Las otras cinco cepas no generaron tejidos similares a PDL ni mineralizados in vivo.

15 La Figura 5 ilustra la generación de fibras de colágeno por las PDLSC in vivo. A) Tinción con hematoxilina y eosina de tejido de PDL humano que muestra fibras de colágeno (flechas). B) Las fibras de colágeno de PDL humano fueron positivas para la tinción con anticuerpo anti-colágeno de tipo I (flechas). C) Las PDLSC trasplantadas generaron fibras de colágeno (flechas) junto con la estructura similar a cemento de reciente formación (C). D) Estas fibras fueron positivas para la tinción con anticuerpo anti-colágeno de tipo I (flechas), similar al PDL humano. E) Las PDLSC trasplantadas formaron estructuras similares a cemento (C) que conectaron con las fibras de colágeno de reciente formación (líneas discontinuas amarillas) similares a la estructura de las fibras de Sharpey. F) Las PDLSC generaron una cantidad importante de fibras de colágeno (flechas). G) Estas fibras de colágeno fueron positivas para la tinción de anticuerpos antimitocondriales específicos humanos. H) Se utilizó preinmunosuero como control negativo del trasplante de PDLSC para el anticuerpo antimitocondrial específico humano.

20 La Figura 6 ilustra PDLSC en la reparación de tejido periodontal en ratas inmunosuprimidas. La tinción inmunohistoquímica del tejido de trasplante recuperado con anticuerpos antimitocondriales específicos humanos demostró que las PDLSC humanas: A) estaban ubicadas en el compartimento del PDL (triángulos); B) participaban en la unión del PDL a la superficie del diente (flechas); y C) participaban en la reparación del hueso alveolar (flechas) y del PDL (triángulo).

La Figura 7 demuestra el aislamiento de C-PDLSC. A) Las PDLSC recuperadas de PDL criopreservado durante seis meses eran capaces de formar grupos de una sola colonia heterogénea tras ser tratadas en placas a baja densidad y se cultivaron con un medio de cultivo habitual durante 10 días, tal y como se describe en los métodos.

25 El número de colonias individuales obtenidas del PDL criopreservado (CP) se redujo notablemente (\*p < 0,05) en comparación con el PDL fresco no congelado (P) cuando se colocaba el mismo número de células (5000) en las placas. B) Las tasas de proliferación se valoraron por incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 12 horas. Las C-PDLSC (CP) mantienen un elevado índice de proliferación, similar a las PDLSC habituales (P), lo que demuestra que no existe ninguna diferencia significativa entre las PDLSC habituales y las C-PDLSC. C) Tinción con hematoxilina y eosina (H-E) de tejido de PDL humano no congelado. D y E) Tinción con H y E de PDL criopreservado durante seis meses. La mayoría de las áreas del tejido de PDL mostraban una estructura histológica normal. Sin embargo, en el PDL congelado se observó cierta anisocariosis nuclear (E, flecha), lo que indica que la criopreservación puede generar algunos daños tisulares. F-M) Las C-PDLSC expresaron STRO-1, uno de los marcadores de los progenitores tempranos de las células madre mesenquimales. Las C-PDLSC pueden expresar conjuntamente STRO-1 con sialoproteína ósea (BSP) y receptor de TGFβ de tipo I (TGFβR1), tal y como se muestra en las figuras fusionadas. Algunas C-PDLSC pueden expresar STRO-1 y BSP por separado.

La Figura 8 ilustra la caracterización in vitro de las C-PDLSC. A y B) La tinción con rojo alizarina demostró la formación de nódulos mineralizados (A). En condiciones regulares de cultivo, las C-PDLSC no fueron capaces de formar nódulos mineralizados (B). C y D) Las C-PDLSC fueron capaces de formar grupos de lípidos positivos en aceite rojo O (C). El medio de cultivo habitual no podría inducir ningún grupo de lípidos positivo en aceite rojo O en las C-PDLSC (D). E) Cuando las PDLSC se cultivaron con 10 ng/ml de TGFβ1 durante cuatro semanas formaron distintas fibras de colágeno in vitro (flechas abiertas). F) Las fibras generadas in vitro fueron positivas para la tinción del anticuerpo anti-colágeno tipo I (flechas abiertas). G) Por el contrario, las DPSC no fueron capaces de formar fibras de colágeno in vitro en las mismas condiciones de cultivo. H) Las C-PDLSC también fueron capaces de generar agregados de colágeno in vitro cuando se cultivaron con 10 ng/ml de TGFβ1 durante cuatro semanas. I) Los agregados de reciente formación fueron positivos para la tinción del anticuerpo anti-colágeno tipo I. J) Control de pre-inmunsuero negativo para la tinción inmunohistoquímica del anticuerpo anti-colágeno tipo I.

La Figura 9 ilustra la caracterización in vivo de las C-PDLSC. A) Ocho semanas después del trasplante, las CPDLSC fueron capaces de formar una estructura similar al cemento (C) en las superficies del portador de tricalcio e hidroxapatita (HA) que estaba conectado al tejido similar al PDL (PDL). B) Las células responsables de la formación de cemento (C) fueron positivas para la tinción del anticuerpo antimitocondrial específico humano (flechas negras). Los datos de la tinción inmunohistoquímica indicaron que las C-PDLSC trasplantadas se diferenciaron en cementoblastos/cementocitos y generaron cemento in vivo. C y D) Las C-PDLSC trasplantadas fueron capaces de formar cemento (C) sobre las superficies de las partículas de HA/TCP (HA) y fueron capaces de generar fibras de Sharpey (flechas negras) insertadas en el cemento y que fueron continuas con el tejido similar a PDL (PDL), tal como muestra la tinción con H-E (C) y tricrómica (D). E y F) De seis cepas seleccionadas de C-PDLSC obtenidas de una única colonia, cuatro (67%) fueron capaces de generar una estructura similar a cemento/PDL (E). El cemento de reciente formación (C) se encontraba adyacente a las superficies del portador de HA/TCP (HA) y estaba conectado con el tejido similar al PDL (PDL) a través de fibras de Sharpey (flechas negras). El 33% restante (2 de 6) de las cepas de C-PDLSC obtenidas de una única colonia no fueron capaces de generar cemento in vivo (F). G y H) El cemento de reciente formación (C) fue positivo para la tinción del anticuerpo anti-colágeno tipo I (G) y las células cementogénicas fueron positivas para la tinción del anticuerpo anti-BSP (flechas abiertas en H). I) Control de preinmunsuero negativo para la tinción inmunohistoquímica de anticuerpos anti-colágeno tipo I y anti-BSP.

La Figura 10 demuestra la recuperación de células madre funcionales de tejido estromal de médula ósea humana criopreservado. Las células formadoras de colonias también se pueden recuperar del tejido estromal de médula ósea congelado obtenido de fragmentos de hueso facial, tal como se describe en los métodos. A-D) Las BMSSC obtenidas de tejidos estromales de médula ósea criopreservados unidos a los fragmentos de hueso, similares a las BMSSC habituales, expresaron STRO-1 y ALP en el cultivo. E y F) Tras el trasplante de BMSSC obtenidas de tejido estromal de médula ósea criopreservada, las BMSSC se diferenciaron en osteoblastos (flechas negras) y formaron hueso (B) y elementos de médula hematopoyética asociados (BM), tal como demostró la tinción con H-E (E) y la hibridación in situ de la secuencia Alu específica humana (F).

#### 40 Descripción detallada de la invención

La invención incluye células madre multipotentes de ligamento periodontal postnatal humano que pueden dar lugar a diversos tipos de células. En una realización preferible, las células son aisladas de tejido humano. Como se expone más adelante, por primera vez se demuestra que el PDL contiene células madre postnatales que son capaces de diferenciarse en cementoblastos, cementocitos, adipocitos y células formadoras de fibras de colágeno (fibroblastos). Tal y como se demuestra en los ejemplos siguientes, las PDLSC son capaces de formar una estructura de cemento/PDL in vivo. Por tanto, las PDLSC son útiles para generar PDL y cemento para el tratamiento de la enfermedad periodontal. Adicionalmente, las PDLSC son útiles para generar adipocitos para la formación de grasa. Asimismo, las PDLSC también pueden ser útiles para el tratamiento del ictus y defectos óseos, incluyendo fracturas y osteoporosis.

El ligamento periodontal (PDL) se ha caracterizado como un tejido conectivo blando y especializado que conecta el cemento de la pieza dental con el hueso alveolar del maxilar y la mandíbula para mantener la pieza dental en su posición, contribuir a la función de las piezas dentales y preservar la homeostasis del tejido. Se ha dado por supuesto que el PDL es un tejido altamente renovable con una sólida capacidad para la regeneración tisular, al tiempo que mantiene el espacio necesario para la función normal de las piezas dentales. Tal como se describe en el presente, las células madre multipotentes fueron aisladas del ligamento periodontal humano. Se descubrió que las células madre de ligamento periodontal (PDLSC) aisladas expresan marcadores de las células madre mesenquimales, incluyendo STRO-1 y MUC18, junto con un elevado nivel de un marcador específico del tendón, escleraxis (SCX). Estos marcadores se pueden utilizar para distinguir las PDLSC de las células madre adyacentes, tales como las células madre de la pulpa dental (DPSC) y las células madre de tejido estromal de la médula ósea (BMSSC).

Las células madre aisladas del ligamento periodontal son capaces de diferenciarse en diversos tipos de células. Estos tipos de células incluyen cementoblastos, cementocitos, adipocitos y fibroblastos. También se descubrió que las células madre de ligamento periodontal son capaces de generar tejido periodontal.

Por ejemplo, cuando se trasplantaron en ratones inmunosuprimidos, las PDLSC generaron una estructura similar a cemento, junto con un tejido conectivo similar al ligamento periodontal. Por tanto, la presente divulgación proporciona un método para la regeneración de tejidos mediada por células madre, para reparar lesiones de la región periodontal, incluyendo las lesiones resultantes de enfermedades periodontales (que se caracterizan por la destrucción del periodoncio (el tejido que sujeta el diente)), como la periodontitis, una infección crónica del ligamento periodontal y los tejidos adyacentes.

Tal como se describe en el presente, las células madre multipotentes de ligamento periodontal representan una nueva población de células madre postnatales con capacidad de proliferación extensiva y diferenciación multipotencial, incluyendo diferenciación en cementoblastos, cementocitos, adipocitos y fibroblastos. Por tanto, el ligamento periodontal puede ser un recurso ideal de las células madre para reparar el tejido periodontal dañado o para crear grasa cuando sea necesario.

Por consiguiente, la divulgación incluye métodos para generar tejido periodontal. El método implica trasplantar células madre de ligamento periodontal en un sujeto. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Las células madre de ligamento periodontal pueden ser células madre multipotentes de ligamento periodontal postnatal humano. Preferiblemente, las células madre de ligamento periodontal (PDLSC) expresan marcadores de células madre mesenquimales, incluyendo STRO-1 y MUC18, junto con un elevado nivel de un marcador específico del tendón, escleraxis (SCX).

Esta nueva capacidad descubierta para generar tejido periodontal reparativo representa un gran avance técnico, porque permite la generación restaurativa del periodoncio perdido, es decir, cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal. Esto, a su vez, tiene un gran valor práctico, porque permite al odontólogo o al médico proporcionar una mejor atención al paciente que precisa este tratamiento. Por ejemplo, el protocolo actual para el tratamiento de la enfermedad periodontal implica el uso de cirugía para la reparación del traumatismo. Esto puede provocar dolor y requerir que el paciente se someta a otro tratamiento doloroso e incurra en costes adicionales. La aplicación de los métodos de la invención a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad periodontal o para otra lesión en el periodoncio permite colocar las células madre de ligamento periodontal en la región traumatizada mediante un procedimiento mínimamente invasivo para producir tejido periodontal regenerativo. Por tanto, se cree que el uso del método puede reducir los costes y el dolor asociados al tratamiento dental.

Una realización de la invención prevé la criopreservación de tejido humano y la recuperación de células madre funcionales (por ejemplo, mesenquimales) del tejido humano criopreservado (por ejemplo, ligamento periodontal o tejido estromal de los huesos). Por tanto, proporciona un planteamiento práctico para la preservación de tejidos, como tejido humano, para el posterior aislamiento de células madre postnatales y la regeneración del tejido.

#### Definiciones:

Abreviaturas: Ligamento periodontal (PDL), célula madre de ligamento periodontal (PDLSC), escleraxis (SCX), células madre de piezas dentales deciduas exfoliadas (SHED), célula madre estromal de médula ósea (BMSSC), célula madre de pulpa dental de una pieza dental permanente (DPSC), solución salina fosfatada (PBS), proteína morfogenética ósea 4 (BMP-4), sialoproteína de dentina (DSP), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), fosfatasa alcalina (ALP), fosfoglicoproteína extracelular de la matriz (MEPE), ácido glutámico descarboxilasa (GAD).

"Postnatal" se refiere a cualquier momento posterior al nacimiento, incluyendo inmediatamente después del nacimiento y cualquier momento posterior.

Para los fines del presente, "célula madre" se refiere a una célula relativamente no diferenciada que se puede inducir para que prolifere y que puede producir una progenie que posteriormente se diferencia en uno o más tipos de células maduras. En múltiples ejemplos biológicos, las células madre son "multipotentes" porque pueden producir una progenia de más de un tipo de células distintas, aunque esto no es necesario para su condición de células madre. La autorrenovación es la otra característica clásica de la definición de célula madre. En teoría, la autorrenovación se puede producir por cualquiera de dos mecanismos importantes. Las células madre se pueden dividir de forma asimétrica, de forma que una célula resultante conserva la condición de célula madre, mientras que la otra expresa algún otro fenotipo o una función específica distinta. Alternativamente, algunas de las células madre de una población se pueden dividir de forma simétrica en dos células madre, manteniendo así algunas células madre en el conjunto de la población, mientras que otras células de la población dan lugar únicamente a una progenie diferenciada. Además, es posible que las células que comienzan siendo células madre evolucionen hacia un fenotipo diferenciado, para después "invertir" el proceso y reexpresar el fenotipo de la célula madre.

Para los fines del presente, "diferenciación" se refiere al proceso evolutivo por el que las células asumen un fenotipo especializado, es decir que adquieren una o más características o funciones distintas de las que presentan otros tipos de células.

Los términos "implante" y "trasplante" son intercambiables y se refieren a un injerto de tejido o de una

célula o células en un sujeto. El tejido o la célula puede proceder del mismo sujeto al que se va a trasplantar la célula o el tejido, o bien puede proceder de un sujeto diferente (es decir, tejido o célula trasplantado de un donante a un receptor; en algunos casos el sujeto puede ser tanto donante como receptor).

5 El término "portador" se refiere a un vehículo con el que se puede mezclar una célula madre antes de ser implantada en un sujeto. Entre los ejemplos de portadores se incluyen, entre otros, gelatina, esponjas de polivinilo, matrices de colágeno y cerámica de hidroxiapatita/fosfato tricálcico. Los portadores se pueden preparar de múltiples formas. Por ejemplo, se pueden formar portadores en forma de bloques, en polvo, en tiras y similares. Los portadores son conocidos en la técnica y han sido descritos (Krebsbach et al.,  
10 Transplantation, 63: 1059 (1997)).

Una "célula madre de ligamento periodontal" se refiere a una célula madre postnatal que es aislada del ligamento periodontal. Una "célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal humano" se refiere a una célula madre que es aislada del ligamento periodontal humano.

15 El término "aislada" significa que una célula de la invención no está en el estado en el que se encuentra naturalmente. Por ejemplo, la célula está libre de uno o más contaminantes o uno o más tipos de células con los que se encuentra naturalmente una célula de la invención. Por otra parte, una célula aislada de la invención puede estar presente de una forma que es suficientemente pura como para ser utilizada con fines terapéuticos o para la investigación. El término "aislada" no requiere que una célula de la invención esté libre de todos los contaminantes.

20 "Expansión" se refiere a la propagación de una célula o células sin diferenciación.

Una "célula receptora" es una célula en un sujeto que pasa a estar próxima a una célula madre cuando se implanta esta última en el sujeto. Una célula receptora puede estar en contacto directo con una célula madre implantada o no estar en contacto directo con la célula implantada pero aun así verse influida por la célula implantada. Por ejemplo, una célula madre multipotente de ligamento periodontal postnatal humano  
25 implantada puede provocar que una célula receptora forme cemento sin estar realmente en contacto con la célula receptora.

30 El término "traumatismo" se refiere a un evento que provoca que una célula experimente un cambio perjudicial. Entre los ejemplos de traumatismo se incluyen lesiones físicas resultantes de un accidente o tratamiento médico, incluyendo la cirugía, una enfermedad (como una enfermedad periodontal), una degeneración y similares.

Para los fines del presente, "sujeto" se refiere a cualquier vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Entre los mamíferos se incluyen, entre otros, los seres humanos, animales de granja, animales que participan en competiciones deportivas y mascotas.

35 Para los fines del presente, "tratar" o "tratamiento" incluye tratar, prevenir, mejorar o inhibir un daño físico o relacionado con una enfermedad y/o un síntoma de un daño físico o relacionado con una enfermedad de un sujeto.

Para los fines del presente, por lo general una "cantidad efectiva" significa una cantidad que ofrece el rendimiento o efecto sistémico o local deseado. Por ejemplo, una dosis efectiva es una cantidad suficiente para provocar un resultado clínico beneficioso o deseado.

40 El término "comprende" o "contiene" y similares puede tener el significado que se le atribuye en la Ley de Patentes USA y puede significar "incluye", "incluyendo" o similares. Para los fines del presente, "incluyendo" o "incluye" o similares significa incluyendo, entre otros.

I. Una célula madre multipotente aislada de ligamento periodontal postnatal humano

45 La invención se refiere a células madre multipotentes aisladas de ligamento periodontal postnatal. Estas células y los métodos para aislarlas se divulgan en detalle en el presente documento.

(a) Un cultivo de PDLSC

50 Las PDLSC se pueden mantener y se puede dejar que se expandan en un medio de cultivo consolidado en la técnica y comercializado por American Type Culture Collection (ATCC). Entre estos medios de cultivo se incluyen, entre otros, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), DMEM F12 medium®, Eagle's Minimum Essential Medium®, F-12K medium, Iscove's Modified Dulbecco's Medium®, RPMI-1640 medium®.

55 También se contempla la posibilidad de complementar el medio de cultivo celular con suero de mamífero. A menudo los sueros contienen factores celulares y componentes que son necesarios para la viabilidad y expansión. Entre los ejemplos de sueros se incluyen suero bovino fetal (FBS), suero bovino (BS), suero de ternero (CS), suero de ternero fetal (FCS), suero de ternero recién nacido (NCS), suero de cabra (GS), suero de caballo (HS), suero humano, suero de pollo, suero porcino, suero de oveja, suero de conejo, sustitutos de suero, y fluido embrionario bovino. Los sueros se pueden inactivar por calor a 55-65°C si se considera necesario inactivar los componentes de la cascada del complemento.

También se pueden utilizar suplementos adicionales para suministrar a las células oligoelementos para su óptimo crecimiento y expansión. Entre estos suplementos se incluyen insulina, transferrina, selenito de sodio y combinaciones de ellos. Estos componentes se pueden incluir en una solución salina, como por ejemplo, entre otras, Hanks' Balanced Salt Solution® (HBSS), Earle's Salt Solution®, suplementos antioxidantes, suplementos MCDB- 201®, solución salina fosfatada (PBS), ácido ascórbico y ácido ascórbico-2-fosfato, así como otros aminoácidos. Muchos medios de cultivo de células ya contienen aminoácidos; sin embargo, a algunos es necesario añadir suplementos antes de cultivar las células. Estos aminoácidos incluyen, entre otros, L-alanina, L- arginina, ácido L-aspártico, L-asparagina, L-cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-glicina, L-histidina, L-iso-leucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina.

Los antibióticos también se utilizan típicamente en el cultivo de células para mitigar la contaminación por bacterias, micoplasmas y hongos. Típicamente, los compuestos antibióticos y antimicóticos utilizados son combinaciones de penicilina/estreptomicina, pero también pueden incluir, entre otros, anfotericina (Fungizone ®), ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, ácido micofenólico, ácido nalidíxico, neomicina, nistatina, paromomicina, polimixina, puromicina, rifampicina, espectinomina, tetracilina, tilosina y zeocina.

También se pueden utilizar ventajosamente hormonas en el cultivo celular, incluyendo, entre otras, D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona, β-estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, somatostatina/hormona del crecimiento humano (HGH), tirotrópina, tiroxina y L-tironina.

Las citoquinas, los factores de crecimiento y/o los factores de diferenciación también se pueden utilizar en el cultivo de células, incluyendo, entre otros, el factor 1 de células estromales (SDF-1), factor de células madre (SCF), angiopoyetina-1, factor de crecimiento derivado de placenta (PIGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), cualquier agente que promueva la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, tales como ICAM y VCAM, cualquier agente que facilite el proceso de direccionamiento guiado (*homing*), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento de fibroblastos (como FGF4, FGF8, bFGF), Wnt1, DKK1, ácido ascórbico, isoproterenol, endotelina, cualquier agente que promueva la angiogénesis, incluyendo VEGF, aFGF, angiogenina, angiotensina-1 y angiotensina-2, betacelulina, bFGF, Factor X y Xa, HB-EGF, PDGF, angiomodulina, angiotropina, angiopoyetina-1, prostaglandina E1 y E2, esteroides, heparina, 1-butil-glicerol, y amida nicotínica, cualquier agente que reduzca la apoptosis, incluyendo, entre otros, β- bloqueantes, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (inhibidores ACE), carvedilol, antagonistas del receptor de angiotensina II tipo 1, inhibidores de caspasas, cariporida, eniporida o una combinación de estos.

También se pueden emplear lípidos y portadores de lípidos para complementar los medios de cultivo de células, en función del tipo de célula y del destino de la célula diferenciada. Entre estos lípidos y vehículos se pueden incluir, entre otros, ciclodextrina (α, β, γ), colesterol, ácido linoleico conjugado con albúmina, ácido linoleico y ácido oleico conjugados con albúmina, ácido linoleico sin conjugar, ácido linoleico-oleico-araquidónico conjugado con albúmina, ácido oleico sin conjugar y conjugado con albúmina, entre otros.

Asimismo, se contempla el uso de capas de células sustentadoras. Las células sustentadoras se utilizan para favorecer el crecimiento de células cultivadas, incluyendo células madre. Las células sustentadoras son células normales que han sido inactivadas por radiación gamma. En el cultivo, la capa de células sustentadoras actúa de capa basal para otras células y suministra importantes factores celulares sin que se produzca su propio crecimiento o división posterior (Lim, J. W. y Bodnar, A., 2002). Algunos ejemplos de células que forman la capa de células sustentadoras son las células diploides típicas de pulmón humano, los fibroblastos embrionarios de ratón, los fibroblastos embrionarios de ratones Swiss, aunque puede ser cualquier célula postmitótica capaz de suministrar factores y componentes celulares que sean ventajosos para permitir el óptimo crecimiento, viabilidad y expansión de las células madre.

Las células en cultivo se pueden mantener en suspensión o unidas a un soporte sólido, como los componentes de la matriz extracelular y los biopolímeros o polímeros sintéticos. A menudo las células madre requieren factores adicionales que favorezcan su unión a un soporte sólido, como colágeno de tipo I, tipo II y tipo IV, concanavalina A, sulfato de condroitina, fibronectina, "superfibronectina" y polímeros similares a la fibronectina, gelatina, laminina, poli-D-lisina y poli-L-lisina, trombospondina y vitronectina.

#### B. Criopreservación de células madre/tejido conteniendo células madre

Las células madre multipotentes de ligamento periodontal postnatal humano se pueden recoger y conservar para su uso en el futuro mediante técnicas de preservación, como la congelación con nitrógeno líquido. Se prevé que estas células se podrían recoger del ligamento periodontal de un sujeto, conservarse e implantarse en el mismo sujeto en un momento posterior. Este protocolo resultaría útil para sustituir las células perdidas a consecuencia de la edad o de un traumatismo. Por ejemplo, las células conservadas se podrían utilizar durante procedimientos de reconstrucción periodontal practicados en un momento posterior de la vida. Por otra parte, las células se pueden tratar con factores para provocar que formen diferentes fenotipos (por ejemplo, diferenciación).

En el presente también se divulga el primer informe de aislamiento de células madre funcionales de tejido sólido congelado/descongelado. Tal como se describe en el presente, las PDLSC criopreservadas

humanas (C-PDLSC) aisladas de tejido congelado mantuvieron las características de las células madre y la capacidad de regeneración del tejido in vivo, lo que sugiere un gran potencial para el uso de las C-PDLSC con fines clínicos, incluyendo, entre otros, la regeneración del tejido periodontal.

C. Métodos para alterar genéticamente las PDLSC

5 Las PDLSC se pueden transfectar con una estructura de ácido nucleico preseleccionada que podría causar que las células expresen un producto preseleccionado. Estas células se podrían implantar en el sujeto, a fin de administrar el producto preseleccionado al sujeto. Entre los ejemplos de productos preseleccionados se incluyen, entre otros, factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas, factores relacionados con la hemofilia y similares. Se cree que la obtención e implantación de células en un mismo  
10 sujeto evita numerosas complicaciones resultantes del rechazo inmunológico.

Las PDLSC aisladas con los métodos descritos en el presente se pueden modificar genéticamente mediante la introducción de ADN o ARN en la célula, con diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por lo general, estos métodos se agrupan en cuatro categorías principales: 1) transferencia viral, incluyendo el uso de vectores virales de ADN o ARN (por ejemplo, retrovirus (como lentivirus), virus del simio 40 (SV40), vectores de alfavirus, incluyendo, entre otros, virus Sindbis, papilomavirus bovino, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes recombinante y similares); 2) transferencia química, incluyendo transfección de fosfato cálcico y métodos de transfección de DEAE-dextrano; 3) transferencia de fusión de membrana utilizando vesículas membranosas cargadas de ADN, tales como liposomas, eritrocitos fantasma y protoplastos, por ejemplo; y 4) técnicas de transferencia física, como  
15 microinyección, electroporación, nucleofección, transferencia génica por microproyectiles o transferencia directa de ADN "desnudo".

Los métodos para preparar estructuras de ácido nucleico son conocidos en la técnica y han sido descritos (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)).

25 Entre los vectores virales para el uso en PDLSC genéticamente modificantes se incluyen, entre otros, vectores adenovirales (Patente USA n.º 5 824 544; Patente USA n.º 5 707 618; Patente USA n.º 5 693 509; Patente USA n.º 5 670 488; Patente USA n.º 5 585 362), retrovirales (Patente USA n.º 5 888 502; Patente USA n.º 5 830 725; Patente USA n.º 5 770 414; Patente USA n.º 5 686 278; Patente USA n.º 4 861 719), virales adenoasociados (Patente USA n.º 5 474 935; Patente USA n.º 5 139 941; Patente USA n.º 5 622 856; Patente USA n.º 5 658 776; Patente USA n.º 5 773 289; Patente USA n.º 5 789 390; Patente USA n.º 5 834 441; Patente USA n.º 5 863 541; Patente USA n.º 5 851 521; Patente USA n.º 5 252 479), híbridos virales adenoasociados (Patente USA n.º 5 856 152), vector lentiviral, de virus vaccinia o herpesviral (Patente USA n.º 5 879 934; Patente USA n.º 5 849 571; Patente USA n.º 5 830 727; Patente USA n.º 5 661 033; Patente USA n.º 5 328 688).

35 La administración de estructuras de expresión a través de vectores no virales también se contempla. Esta administración puede emplear microinyección (Patente USA n.º 5 612 205), electroporación (Patente USA n.º 5 507 724; Patente USA n.º 5 869 326; Patente USA n.º 5 824 547; Patente USA n.º 5 789 213; Patente USA n.º 5 749 847; Patente USA n.º 5 019 034), coprecipitación con fosfato de calcio, introducción de DEAE dextrano, introducción mediada por receptores, introducción mediada por liposomas (Patente USA n.º 5 631 018; Patente USA n.º 5 620 689; Patente USA n.º 5 861 314; Patente USA n.º 5 855 910; Patente USA n.º 5 851 818; Patente USA n.º 5 827 703; Patente USA n.º 5 785 987), tecnología de dendrímeros (Patente USA n.º 5 795 581; Patente USA n.º 5 714 166; Patente USA n.º 5 661 025), inyección de ADN desnudo, bombardeo de partículas (Patente USA n.º 5 836 905; Patente USA n.º 5 120 657) y nucleofección (Lakshmipathy, U., et al., *Stem Cells*, 22:531-543 (2004)).

45 Las PDLSC se pueden alterar genéticamente mediante la inserción de ADN aislado preseleccionado, mediante la sustitución de un segmento de genoma celular con ADN aislado preseleccionado, o mediante la delección o inactivación de al menos una parte del genoma celular de la célula. La delección o inactivación de al menos una porción del genoma celular se puede realizar por diversos medios, incluyendo, entre otros, la recombinación genética, la tecnología antisentido (que puede incluir el uso de ácidos nucleicos peptídicos o PNA), o mediante tecnología de ribozimas, por ejemplo. La inserción de una  
50 o más secuencias de ADN preseleccionadas se puede realizar mediante la recombinación de homólogos o por la integración viral en el genoma de la célula hospedadora.

La secuencia genética deseada también se puede incorporar en la célula, particularmente en su núcleo, utilizando un vector de expresión de plásmidos y una secuencia de localización nuclear. Los métodos para dirigir los polinucleótidos al núcleo se han descrito en la técnica. El material genético se puede introducir utilizando promotores que permitirán inducir el gen de interés positiva o negativamente, utilizando determinados productos químicos/fármacos, que se eliminarán después de la administración de un determinado fármaco/producto químico, o se puede marcar para permitir la inducción a través de productos químicos (incluyendo, entre otros, el receptor de estrógeno mutado que responde al tamoxifeno) para su expresión en compartimentos específicos de la célula (incluyendo, entre otros, la membrana celular). También se pueden incluir otros elementos que pueden mejorar la expresión, como un facilitador o un sistema que produce niveles elevados de expresión. Adicionalmente, en algunos casos, resulta deseable que se produzca la secreción del producto genético. En estos casos, el producto  
60

genético contiene preferiblemente una secuencia de señal secretoria que facilita la secreción de la proteína.

Cualquiera de estas técnicas también se puede aplicar para introducir una secuencia reguladora transcripcional en las PDLSC, a fin de activar un gen endógeno deseado. Esto se puede hacer mediante recombina-  
5 recombina- ción de homólogos (por ejemplo, Patente USA n.º 5 641 670) o no homólogos (por ejemplo, Patente USA n.º 6 602 686).

La transducción o transfección con éxito de células diana se puede demostrar utilizando marcadores genéticos. Se ha demostrado que la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria*, por ejemplo, es un marcador efectivo para identificar y controlar células modificadas genéticamente (Persons, D. et al.,  
10 Nature Medicine, 4: 1201-1205 (1998)). Otros marcadores alternativos que se pueden seleccionar incluyen el gen  $\beta$ -Gal, el receptor truncado del factor de crecimiento nervioso (incluyendo, entre otros, NEO, MTX, higromicina).

En otra realización, las PDLSC se pueden obtener de animales transgénicos y, de este modo, en cierto sentido ya se encuentran modificadas genéticamente. En la actualidad se utilizan varios métodos para generar animales transgénicos. La técnica que se utiliza más a menudo es la microinyección directa de ADN en huevos fertilizados de una sola célula.

Otras técnicas incluyen la transferencia mediada por retrovirales o la transferencia genética en células madre embrionarias. El uso de estos animales transgénicos tiene ciertas ventajas, incluyendo el hecho de que no es necesario transfectar las células sanas. Las PDLSC obtenidas de animales transgénicos exhibirán una expresión genética estable. Utilizando animales transgénicos, resulta posible producir nuevas combinaciones genéticas. El animal transgénico puede tener integrado en su genoma cualquier gen útil.

Cuando la modificación genética está orientada a la producción de una sustancia biológicamente activa, por lo general la sustancia será una que resulte útil para el tratamiento de una determinada lesión y/o enfermedad. Por ejemplo, puede que se desee modificar genéticamente las células de forma que secreten un determinado factor de crecimiento, receptor del factor de crecimiento o citoquina.

## II. Un método para producir tejido periodontal y adiposo dentro de un organismo

La divulgación proporciona un método para producir tejido periodontal y adiposo en un sujeto. El método para producir tejido periodontal o adiposo implica trasplantar una célula o células madre multipotentes de ligamento periodontal posnatal en el sujeto, de manera que se forme el producto deseado. La célula madre de ligamento periodontal posnatal puede ser una célula madre multipotente de ligamento periodontal posnatal humano.

### A. Uso de las PDLSC

Las células madre postnatales de la invención se pueden trasplantar en un organismo para prevenir o reducir numerosas enfermedades. Por ejemplo, una célula madre postnatal de la invención se puede trasplantar en el tejido del periodoncio traumatizado de un sujeto, como un humano, para el tratamiento de la enfermedad periodontal u otra lesión. En otro ejemplo, una célula madre postnatal de la invención se puede implantar en un sujeto para crear grasa cuando sea necesario. Esta creación de grasa se puede emplear para reducir o mejorar graves trastornos (lipodistrofias) en los que hay ausencia de grasa en diferentes partes del cuerpo o en todas ellas. Estos sujetos a menudo experimentan graves problemas relacionados con el metabolismo de la energía, que depende en gran medida de la grasa.

La divulgación proporciona un método para generar tejido periodontal. Las células madre de ligamento periodontal se pueden obtener de un sujeto, como un ser humano, diferente del sujeto en el que se trasplantarán las células. Alternativamente, las células madre de ligamento periodontal se pueden obtener del mismo sujeto, como un ser humano, en el que se van a trasplantar. El rechazo inmunológico de las células trasplantadas se puede evitar obteniendo células del mismo sujeto en el que se van a trasplantar.

Los métodos se pueden practicar in vitro en condiciones de cultivo de células y/o en condiciones in vivo. Brevemente, las células madre de ligamento periodontal se pueden cultivar en condiciones de cultivo tisular, opcionalmente pueden ser modificadas genéticamente y, a continuación recogidas. Las células recogidas se colocan después en una región periodontal de interés en un sujeto, de forma que las células madre de ligamento periodontal produzcan tejido o células periodontales, incluyendo ligamento periodontal y cemento. Las células madre periodontales se pueden trasplantar en combinación con un portador o no combinarse con un portador.

La producción de tejido periodontal regenerativo permite sustituir material biológico por otro material biológico de reciente formación, en lugar de los materiales artificiales o injertos tradicionales. Esto puede evitar la reacción inmunológica o alérgica a un material artificial implantado en un sujeto y puede causar menos dolor al sujeto que los tratamientos actualmente disponibles. Por otra parte, los materiales biológicos se pueden mantener mejor con el paso del tiempo que los materiales artificiales, gracias a la constante renovación celular.

Tras la administración, la tolerancia inmunológica del sujeto a las PDLSC o a la progenie obtenida de las mismas se puede testar con diversos métodos conocidos en la técnica, a fin de valorar la tolerancia inmunológica del sujeto a las PDLSC. En los casos en los que la tolerancia del sujeto a las PDLSC no llega a ser la óptima (por ejemplo, el sistema inmunitario del sujeto rechaza las PDLSC exógenas), se puede aplicar al paciente un tratamiento inmunosupresor accesorio terapéutico, conocido en la técnica.

B. Administración

Para los fines descritos en el presente, las PDLSC autólogas, alogénicas o xenogénicas se pueden administrar al sujeto, en forma diferenciada o no diferenciada, genéticamente modificadas o sin modificar, mediante inyección directa en el lugar del tejido, sistémicamente, o sobre la superficie o alrededor de la superficie de una matriz aceptable, encapsuladas o en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Las células madre postnatales se pueden expandir ex vivo antes de ser implantadas en un organismo.

Las PDLSC se pueden administrar a un sujeto a través de diversos métodos conocidos en la técnica. Las PDLSC se pueden administrar a un sujeto por inyección localizada o sistémica, incluyendo, entre otros, por inyección intramuscular e inyección intravenosa. Las PDLSC se pueden administrar en un punto o en las proximidades de un punto que requiere nuevas células, masa o una función optimizada. Alternativamente, se pueden administrar en un lugar remoto.

En una realización, se introduce una suspensión de células en una jeringa y se administra a un sujeto. Se pueden aplicar múltiples inyecciones utilizando este procedimiento. El uso de estos procedimientos de suspensión celular proporciona muchas ventajas. Por ejemplo, estos métodos dirigen las células hacia cualquier sitio predeterminado y son relativamente poco traumáticos.

Típicamente, el número de células trasplantadas en un sujeto será una "cantidad terapéuticamente efectiva". Para los fines del presente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere al número de células trasplantadas que es necesario para aplicar el tratamiento de la lesión o enfermedad en concreto para la que se busca tratamiento. Por ejemplo, cuando el tratamiento es para una lesión de tejidos, el trasplante de una cantidad terapéuticamente efectiva de células producirá típicamente una reducción de la cantidad y/o la gravedad de los síntomas asociados a la lesión. Los expertos en la técnica entenderán cómo determinar las dosis de células adecuadas.

Una célula madre postnatal de la invención se puede cultivar induciendo unas condiciones que causen que la célula madre postnatal se diferencie en un tipo de célula deseado. Este cultivo se puede realizar antes del trasplante de la célula diferenciada o parcialmente diferenciada en un sujeto. Por ejemplo, una célula madre postnatal de la invención se puede someter a inducción de adipocitos.

Alternativamente, las PDLSC y su progenie se pueden inducir para que proliferen y/o se diferencien in vivo, mediante la administración al hospedador de cualquier factor o factores de crecimiento, citoquina o citoquinas, composición o composiciones farmacéuticas que inducirán la proliferación o diferenciación de las células. Estos factores de crecimiento, citoquinas o composiciones farmacéuticas incluyen cualquier factor de crecimiento, citoquina o composición farmacéutica conocido en la técnica, incluyendo los factores de crecimiento y citoquinas que se describen en el presente para la proliferación y diferenciación in vitro.

Entre las citoquinas se incluyen, entre otras, el factor 1 de células estromales (SDF-1), factor de células madre (SCF), angiopoyetina-1, factor de crecimiento derivado de placenta (PIGF) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Entre las citoquinas se incluyen también cualquiera que promueva la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, como ICAM y VCAM.

La diferenciación de las PDLSC en un fenotipo deseado se puede intensificar cuando se emplean factores de diferenciación.

La viabilidad de los tejidos de reciente formación se puede intensificar por angiogénesis. Entre los factores de diferenciación que promueven la angiogénesis se incluyen, entre otros, VEGF, aFGF, angiogenina, angiotensina-1 y angiotensina-2, betacelulina, bFGF, Factor X y Xa, HB-EGF, PDGF, angiomodulina, angiotropina, angiopoyetina-1, prostaglandina E1 y E2, esteroides, heparina, 1-butiril-glicerol, y amida nicotínica.

Los factores que reducen la apoptosis también pueden promover la formación de tejido nuevo. Entre los factores que reducen la apoptosis se incluyen, entre otros,  $\beta$ - bloqueantes, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (inhibidores ACE), carvedilol, antagonistas del receptor de angiotensina II tipo 1, inhibidores de caspasas, cariporida y eniporida.

Se pueden administrar factores exógenos (como citoquinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación y factores antiapoptosis) antes o después que las PDLSC o al mismo tiempo que estas. Por ejemplo, una forma de administración concomitante consistiría en combinar un factor de interés en los medios de suspensión de las PDLSC antes de la administración. Las dosis para las administraciones son variables, y pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores; sin embargo, pueden ser discernidas por un experto en la técnica, a partir de la presente divulgación, los

documentos citados aquí y el conocimiento de la técnica.

Un método para incrementar potencialmente la supervivencia de las células consiste en incorporar PDLSC en el implante de una matriz adecuada, incluyendo, entre otras, una matriz de biopolímero o de polímero sintético o de polímero (a fin de encapsular las células antes de la introducción en el organismo del sujeto, por ejemplo en una cápsula de polímero). En función del estado del sujeto, el punto de inyección podría resultar poco adecuado para el sembrado y proliferación de las células debido a la existencia de cicatrices u otros impedimentos. Entre los ejemplos de biopolímeros se incluyen, entre otros, células mezcladas con biopolímeros como fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y proteoglicanos, que pueden ser químicamente modificados o conformados. Esto se podría construir con o sin citoquinas, diferenciación o material genético adicional. Por otra parte, podrían hacerse en suspensión, aunque el tiempo de permanencia en los lugares sujetos a flujos sería nominal.

Otra alternativa es un gel tridimensional con las células encapsuladas en los intersticios de la mezcla célula/biopolímero. Una vez más, los factores de diferenciación o citoquinas se podrían incluir en el gel. Estos se podrían administrar por inyección a través de diversas vías.

La cantidad de células a administrar variará en función del sujeto tratado. En una realización, entre aproximadamente  $10^3$  y  $10^4$  o  $10^8$  o entre  $10^5$  y  $10^7$ , o aproximadamente  $3 \times 10^7$  células. Sin embargo, la determinación precisa de la dosis efectiva se puede basar en factores individuales para cada sujeto, incluyendo su tamaño, su edad, el tamaño de la necrosis u otro daño del órgano y la cantidad de tiempo transcurrido desde que se produjo el daño. Por tanto, las dosis pueden ser fácilmente discernidas por los expertos en la técnica, a partir de la presente divulgación y el conocimiento de la técnica.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de células y los aditivos, vehículos y/o portadores opcionales de las composiciones a administrar de los métodos de la invención. Típicamente, cualquier aditivo (además de la célula o células madre y/o citoquina o citoquinas) se encuentra presente en una cantidad de 0,001 a 50% en peso de la solución y el ingrediente activo se encuentra presente en términos de microgramos a miligramos, como aproximadamente de 0,0001 a 5% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,0001 a 1% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 0,0001 a 0,05% en peso, o aproximadamente de 0,001 a 20% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 10% en peso y más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a 5% en peso.

Por supuesto, para cualquier composición que se vaya a administrar a un animal o ser humano, y para cualquier método concreto de administración, es preferible determinar por tanto la toxicidad, por ejemplo determinando la dosis letal (LD) y  $LD_{50}$  en un modelo animal apto, como un roedor (por ejemplo, un ratón) y la dosis de la composición o composiciones, la concentración de sus componentes y el tiempo de administración de la composición o composiciones que provocan una respuesta adecuada. Estas determinaciones no requieren de experimentación innecesaria gracias al conocimiento del experto en la técnica, a esta divulgación y a los documentos citados en ella. Por otra parte, los tiempos de las administraciones secuenciales se pueden averiguar sin necesidad de experimentación.

Adicionalmente, se pueden añadir varios aditivos que mejoren la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos se puede garantizar a través de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares.

En muchos casos, resultará deseable incluir agentes isotónicos, como azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede conseguir mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, como monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, todo vehículo, diluyente o aditivo empleado utilizado tendría que ser compatible con las células.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando las células utilizadas para la práctica de la presente invención en la cantidad requerida del solvente apropiado con diversas cantidades de los demás ingredientes, según sea necesario.

Algunos ejemplos de composiciones que comprenden PDLSC incluyen preparaciones líquidas para la administración, incluyendo suspensiones y preparaciones para la administración intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), como emulsiones o suspensiones estériles. Estas composiciones pueden encontrarse en una mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado, como agua estéril, suero fisiológico, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones también se pueden utilizar liofilizadas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón del pH, aditivos que favorecen la gelificación o viscosidad, conservantes, aromatizantes, colorantes y similares, en función de la vía de administración y de la preparación deseada. Se pueden consultar textos estándar, como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985, para realizar preparaciones adecuadas sin necesidad de experimentación.

Las composiciones de la invención se proporcionan convenientemente como preparaciones líquidas, tales como soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones o composiciones viscosas, que pueden

ser tamponadas a un pH seleccionado. Por lo general, las preparaciones líquidas son más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Por otra parte, las composiciones líquidas son en cierto modo más cómodas de administrar, en particular por inyección. Por otra parte, se pueden formular composiciones viscosas dentro del rango de viscosidad apropiado, a fin de conseguir periodos de contacto más prolongados con tejidos específicos.

La elección de los portadores adecuados y de otros aditivos dependerá de la vía de administración exacta y de la naturaleza de la forma de la dosis concreta, como una forma de la dosis líquida (por ejemplo, si la composición va a ser formulada en una solución, una suspensión, un gel u otra forma líquida, como una forma de liberación prolongada o una forma rellena de líquido).

Normalmente las soluciones, las suspensiones y los geles contienen una cantidad importante de agua (preferiblemente agua purificada, esterilizada) además de las células. También pueden estar presentes pequeñas cantidades de otros ingredientes, como reguladores del pH (por ejemplo, una base como NaOH), agentes emulsionantes o dispersantes, agentes tampón, conservantes, agentes humectantes y agentes gelificadores (como metilcelulosa). Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir que pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el fluido lagrimal.

La isotonicidad deseada de las composiciones de esta invención se puede lograr utilizando cloruro sódico u otros agentes farmacéuticamente aceptables, tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, glicol de propileno u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro sódico es preferible particularmente para los tampones que contienen iones de sodio.

La viscosidad de las composiciones, si se desea, se puede mantener en el nivel seleccionado utilizando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. La metilcelulosa es preferible porque es fácil de conseguir y económica, además de que resulta sencillo trabajar con ella. Entre otros agentes espesantes adecuados se incluyen, por ejemplo, goma xantina, celulosa de carboximetilo, celulosa de hidropropilo, carbómero y similares. La concentración preferible del espesante dependerá del agente seleccionado. Lo importante es utilizar una cantidad con la que se consiga la viscosidad seleccionada. Normalmente las composiciones viscosas se preparan a partir de soluciones, mediante la adición de estos agentes espesantes.

Se puede emplear un conservante o estabilizador celular farmacéuticamente aceptable para incrementar la vida útil de las composiciones. Preferiblemente, si se necesitan conservantes, es competencia del experto en la técnica seleccionar composiciones que no afecten a la viabilidad o eficacia de las PDLSC descritas en la presente invención.

Los expertos en la técnica reconocerán que los componentes de las composiciones se deben seleccionar para que sean químicamente inertes. Esto no supondrá ningún problema para los expertos en la técnica farmacéutica y química, o bien los problemas se podrán evitar fácilmente consultando textos estándar o experimentos sencillos.

Las composiciones se pueden administrar en dosis y a través de técnicas conocidas por los expertos en la técnica médica y veterinaria, teniendo en cuenta factores como la edad, el sexo, el peso y la condición del sujeto en cuestión, así como la forma de la composición empleada para la administración (por ejemplo, sólida o líquida).

Las pautas adecuadas para la administración inicial y las dosis posteriores en el caso de administraciones secuenciales también son variables: pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores; sin embargo, podrán ser discernidas por un experto en la técnica, a partir de la presente divulgación, los documentos citados en ella y al conocimiento de la técnica.

La invención se ilustra asimismo a través del ejemplo siguiente, que no deberá interpretarse que impone ninguna limitación a su ámbito de aplicación.

Por el contrario, se deberá entender claramente que se puede recurrir a otras realizaciones, modificaciones y equivalentes que, tras leer la descripción del presente, puedan sugerir los expertos en la técnica, sin desviarse del ámbito de aplicación de las reivindicaciones adjuntas.

## **EJEMPLOS**

### **EJEMPLO 1**

#### **Aislamiento. Caracterización y uso de PDLSC**

##### **Materiales y métodos**

##### **Muestras y cultivo de células**

Se recogieron terceros molares impactados humanos normales (n=25) de 16 individuos (19-29 años) en la clínica Dental Clinic of the National Institute of Dental & Craniofacial Research, USA, siguiendo las directrices aprobadas por los National Institutes of Health Office of Human Subjects Research. El ligamento periodontal (PDL) se separó suavemente de la superficie de la raíz y después fue procesado en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I (Worthington Biochem, Freehold, NJ) y 4 mg/ml de dispasa

(Roche, Mannheim, Alemania) durante una hora a 37°C. Las muestras de PDL de diferentes individuos se agruparon y se obtuvieron suspensiones de una única célula, haciendo pasar las células a través de un tamiz de 70 µm (Falcon, BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA).

5 Para identificar las células madre putativas, las suspensiones de una única célula (1 a 1 x 10<sup>4</sup> células) se sembraron en placas de cultivo de 10 cm (Costar, Cambridge, MA) con modificación alfa del medio de Eagle (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) complementado con suero de ternero fetal al 15% (Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX, USA), 100 µmol/l de ácido ascórbico 2-fosfato (WAKO, Tokio, Japón), 2 mmol/l de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Biofluids Inc, Rockville, MD, USA) y, a continuación se incubaron a 37°C en un 5% de CO<sub>2</sub>.

10 Para valorar la eficacia de la formación de colonias, los cultivos del día 10 se fijaron con un 4% de formalina y, a continuación, se tiñeron con azul de toluidina al 0,1%. Los agregados de 50 o más células se puntuaron como colonias. El índice de proliferación de cultivos subconfluentes (primer paso) de células madre se valoró mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 24 horas, con un kit de tinción BrdU de Zymed Laboratories (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). La acumulación de calcio se indujo tal como se describe en Miura et al. (2003), y se detectó mediante tinción con rojo de alizarina S al 2% (pH 4.2). La concentración de calcio se midió utilizando un kit de calcio Sigma 587-A (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA). La inducción de la adipogénesis se realizó tal como se documenta en Gronthos et al. (2000).

20 Las células madre de pulpa dental (DPSCs) y las células madre estromales de médula ósea (BMSSCs) se aislaron y cultivaron tal como se ha descrito anteriormente (Gronthos et al. 2000; Krebsbach et al., 1997; Shi et al., 2003). En algunos experimentos, las células madre de PDL (PDLSC) y las DPSC se obtuvieron del mismo donante o donantes. Las BMSSC se obtuvieron de un medio comercializado (AllCells LLC, Berkeley, CA, USA). Todas las células primarias empleadas en este estudio eran de 2- 4 pasos. Para cada experimento se usó el mismo paso de PDLSC, DPSC y BMSSC.

#### 25 Anticuerpos

Entre los anticuerpos de conejo utilizados se incluyeron anti-HSP90 y TGFβ1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA); anti-CBFA1 (Oncogene Research Product, Cambridge, MA, USA); anti-endostatina y anti-mitocondria específica humana (Chemicon, Temecula, CA, USA); anti-fosfatasa alcalina (LF- 47), anti-osteocalcina (LF-32), anti-proteína de la matriz extracelular (MEPE; LF-155), anti-colágeno tipo I (LF-67), antifibromodulina (LF-150) del Dr. Larry Fisher del National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health (Miura et al., 2003). Entre los anticuerpos de ratón utilizados se incluyeron antiCD146/MUC18, y anti-STRO-1 (Dr. Stan Gronthos; Shi et al., 2003); anti-sailoproteína de hueso (LF-25, del Dr. Larry Fisher). También se utilizaron anticuerpos de control negativos con coincidencia de isotipo de conejo y murino de Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA).

#### 35 RT-PCR

Entre los cebadores de la PCR se incluyeron: PPARγ2 - sentido, 5'- CTCCTATTGACCCAGAAAGC-3' (SEC ID. N.º: 1; 114-133), antisentido, 5'- GTAGAGCTGAGTCTTCTCAG-3' (SEC. ID. N.º: 2; 441-460, Número de registro Genbank: XM\_003059); LPL - sentido, 5'- ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC-3' (SEC. ID. N.º: 3; 175-195), antisentido, 5'- GTTAGGTCCAGCTGGATCGAG-3' (SEC. ID. N.º: 4; 718-738, Número de registro Genbank: XMJM4682); GAPDH - sentido, 5'- AGCCGCATCTTCTTTTTCGCTC-3' (SEC. ID. N.º: 5; 12-32), antisentido, 5'- TCATATTTGGCAGGTTTTTCT-3' (SEC. ID. N.º: 6; 807-827, Número de registro Genbank: M33197). El aislamiento de ARN total, la síntesis de ADNc de la primera cepa y los procesos de PCR fueron tal y como se ha descrito anteriormente (Gronthos et al., 2002).

#### 45 Análisis de Northern Blot

15 µg de ARN completo de cultivos de PDLSC, DPSC y BMSSC primarios se sometieron a electroforesis y después se transfirieron a una membrana de nylon. Se generó una sonda de los productos de PCR purificados con cebadores de escleraxis (SCX) (sentido, 5'- CTGGCCTCCAGCTACATCTC-3' 900-919 (SEC. ID. N.º:7), antisentido, 5'- CTTTCTGTGGTTGCTGAGGC-3', 1090-1109 (SEC. ID. N.º: 8), Número de registro Genbank: Bk000280) marcando aleatoriamente con (γ-<sup>32</sup>P) dCTP (Dupont New England Nucleotide) utilizando el kit de marcado Stratagene Prime It II (Stratagene). Tras la prehibridación en solución de hibridación QuickHyb (Stratagene, Cedar Creek, TX) a 68°C durante 15 minutos, las membranas se hibridaron con una sonda de SCX a 68°C durante una hora. Las membranas se lavaron dos veces en 2XSSC, 0,1% (en peso) de SDS durante 15 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se lavaron una vez en 0,1% de SSC y 0,1% (en peso) de SDS a 68°C durante 30 minutos. Las membranas fueron expuestas en una cassette PhosphorImager (Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA, USA) durante 16-72 horas.

#### Inmunohistoquímica

60 Las PDLSCs fueron subcultivadas en portaobjetos de ocho cámaras (2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) (NUNC Inc, Naperville, IL, USA). Las células se fijaron en formaldehído al 4% durante 15 minutos y, a continuación, se bloquearon e incubaron con anticuerpos primarios (a diluciones que oscilaron desde aproximadamente 1:200 hasta aproximadamente 1:500) durante una hora. Posteriormente, las muestras se incubaron con

anticuerpos secundarios de cabra de IgG-rojo de rodamina o IgG-Cy2 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), durante 45 minutos. Los anticuerpos de control con coincidencia de isotipo se utilizaron en las mismas condiciones. En el caso de la tinción inmunohistoquímica enzimática, se utilizó el kit AEC de inmunoperoxidasa de amplio espectro Zymed (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA) de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante.

#### Análisis de Western Blot

Los anticuerpos primarios utilizados para el análisis Western Blot fueron los mismos que los que se emplearon en las tinciones inmunohistoquímicas a diluciones que oscilaban entre aproximadamente 1:200 hasta aproximadamente 1:1000. El análisis Western Blot se realizó tal y como se documenta en Shi et al., 2001.

#### Aislamiento inmunomagnético

Este procedimiento se documentó anteriormente en Shi y Gronthos, 2003.

Dicho brevemente, las suspensiones unicelulares de PDLSC se incubaron con el supernatante de STRO-1 (BMSSC murina anti-humano, IgM) durante una hora sobre hielo. Posteriormente las células se lavaron con PBS/1% albúmina de suero bovino y se resuspendieron con perlas de Dynal conjugadas con IgM de rata anti-ratón en cuatro lechos por célula (Dynal, Oslo, Norway) durante 45 en una mezcladora giratoria a 4°C. Las células positivas a las perlas fueron aisladas con un concentrador de partículas magnéticas Dynal MPC-1 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

#### Trasplante

Aproximadamente 4,0 x 10<sup>6</sup> PDLSC expandidas in vitro se trasplantaron subcutáneamente en la superficie dorsal de doce ratones beige inmunosuprimidos de 10 semanas de edad (NIH-bg-nu-xid, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA), tal y como se describe en Gronthos et al. 2000 y Krebsbach et al, 1997. Se empleó el mismo número de DPSC y BMSSC expandidas in vitro como controles. Estos procedimientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones de un protocolo aprobado para animales (NIDCR #02-222).

Las PDLSC se trasplantaron en el área periodontal en seis ratas inmunodeficientes, tal y como se había descrito anteriormente (Melcher 1970). Dicho brevemente, 2,0 x 10<sup>6</sup> PDLSC se mezclaron con 40 mg de partículas de cerámica de fosfato tricálcico/hidroxiapatita (Zimmer, Warsaw, IN, USA) y se trasplantaron en dos defectos periodontales de 2mm<sup>2</sup> que se habían creado quirúrgicamente en la corteza bucal del molar mandibular de las ratas (NIH-rnu, Taconic, Germantown, NY, USA).

Estos procedimientos se realizaron de conformidad con las especificaciones de un protocolo aprobado para animales de pequeño tamaño (NIDCR #03-264). Los trasplantes se recuperaron a las 6-8 semanas contadas desde el trasplante, se fijaron con un 4% de formalina, se descalcificaron con una solución tampón al 10% de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (pH 8.0) y, a continuación, se introdujeron en parafina. Las secciones se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

#### Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para analizar la significación entre los dos grupos. Los valores p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

#### Resultados

Para identificar las células madre putativas, se generaron suspensiones de una única célula de PDL humano (Figuras 1A y 1B). La capacidad de las células obtenidas de PDL para formar grupos de células clonogénicas adherentes de células similares a fibroblastos, similares a los registrados en el caso de las poblaciones de células madre mesenquimales diferentes, se puso de manifiesto mediante la formación de unas 170 colonias únicas (Figura 15 1C), generadas con 105 células únicas cultivadas a baja densidad (Figura 11). La población de células formadoras de colonias, que en el presente se denominan células madre de ligamento periodontal (PDLSC) presenta una elevada tasa de absorción de bromodesoxiuridina, similar a la tasa observada en las DPSC (Figura 1D).

Las PDLSC expandidas ex vivo expresaron las moléculas de la superficie celular STRO-1 y CD146/MUC18, dos marcadores tempranos de las células madre mesenquimales también presentes en las BMSSC y DPSC (Figura 1E y 1F). También se mostró que las células STRO-1 positivas se localizaban en el tejido del PDL mediante tinción inmunohistoquímica (Figura 1G y 1H). Cuando se utilizó el anticuerpo anti-STRO-1 para aislar las PDLSC liberadas por el tejido de PDL recién recogido, se reveló que la mayoría de las células formadoras de colonias se encontraban dentro de la población de células STRO-1 positivas, lo que confirma la condición de STRO-1 como marcador de los progenitores tempranos de las PDLSC (Figura 11).

El nivel de expresión de escleraxis, un factor de transcripción específico del tendón, se evaluó en las PDLSC, dado que el PDL es similar al tendón por lo que respecta a su estructura de fibra de colágeno denso y a su capacidad para absorber tensión mecánica durante la actividad fisiológica normal. Las

PDLSC expresaron un nivel superior de escleraxis que las BMSSC y las DPSC (Figura 1J), lo que sugiere que las PDLSC podrían pertenecer a una única población de células madre mesenquimales postnatales.

Para investigar el potencial de las PDLSC para someterse a diferenciación cementoblástica/osteoblástica, los cultivos de PDLSC secundarios establecidos se complementaron con L-ascorbato-2 fosfato, dexametasona y fosfato inorgánico para inducir la mineralización *in vitro*, tal como se había descrito anteriormente (Gronthos et al., 2000). Se formaron pequeños nódulos redondos positivos en rojo de alizarina en los cultivos de PDLSC tras cuatro semanas de inducción, lo que indica una acumulación de calcio *in vitro* (Figura 2A). Sin embargo, en comparación con las DPSC, las PDLSC formaron menos nódulos mineralizados, correlacionados con unas concentraciones inferiores de calcio en la matriz extracelular (Figura 2A-2C). La tinción inmunohistoquímica (Figura 2D) y el análisis Western Blot (Figura 2E) demostraron que las PDLSC cultivadas expresaban una serie de marcadores cementoblásticos/osteoblásticos, incluyendo fosfatasa alcalina, MEPE, sialoproteína ósea, osteocalcina y receptor de TGF $\beta$  de tipo I. Tras la diferenciación de las células en cementoblastos y cementocitos, continuaron expresando marcadores de hueso/cemento, tales como BSP, MEPE, OSC y colágeno de tipo I. El cemento de reciente formación expresaba un marcador específico, fibromodulina, que no se expresaba en el hueso generado por otras células.

Se investigó si las PDLSC, al igual que las DPSC, tenían el potencial de diferenciarse en otras líneas de células, tales como adipocitos. Después de tres semanas de cultivo con un cóctel inductivo adipogénico, las PDLSC se diferenciaron en células de grasa cargadas de lípidos positivas en aceite rojo O (Figura 3A y 3B). Este hecho estaba correlacionado con una regulación al alza de la expresión de dos elementos transcritos específicos de los adipocitos, PPAR $\gamma$ 2 y lipasa de lipoproteína, detectados por RT-PCR (Figura 3C).

Para validar la capacidad de las PDLSC para diferenciarse en células funcionales similares a cementoblastos, las PDLSC expandidas *ex vivo* se trasplantaron en ratones inmunosuprimidos. Se regeneró una estructura típica similar al cemento/PDL, en la que se formó una fina capa de tejido similar al cemento sobre la superficie del portador, junto con fibras de colágeno condensadas con células dispersas que recordaban a las estructuras de PDL (Figura 4A). Las estructuras similares al cemento/PDL parecían totalmente diferentes de las estructuras típicas de hueso/médula generadas por las BMSSC y de las estructuras similares a dentina/pulpa generadas por las DPSC (Figuras 4B y 4C). Estas conclusiones demostraron la diferencia de capacidad de regeneración de tejido existente entre las PDLSC y las BMSSC/DPSC *in vivo*. Los trasplantes de PDLSC contenían células formadoras de cemento positivas en mitocondrias específicas humanas y una estructura similar al PDL que contenía PDLSC humanas, así como células receptoras (Figura 4D). De 13 clones de PDLSC obtenidas de una única colonia y trasplantadas en ratones inmunosuprimidos, ocho (61%) demostraron una capacidad para formar un tejido similar a cemento/PDL, lo que equivale a las PDLSC obtenidas de múltiples colonias (Figura 4E). Los cinco clones restantes no formaron tejidos similares a cemento/PDL (Figura 4F).

Las PDLSC humanas trasplantadas fueron capaces de formar un tejido denso similar a PDL positivo de colágeno tipo I dentro de los trasplantes (Figuras 4A a 5D). Lo que es más importante es que las fibras de colágeno generadas *in vivo* fueron capaces de unirse a las estructuras de cemento de reciente formación, imitando la unión fisiológica de la fibra de Sharpey (Figura 5E), lo que es necesario para formar una unión funcional de las estructuras de cemento/PDL. Estos resultados sugieren que las PDLSC pueden contener una subpoblación de células capaces de diferenciarse en cementoblastos/cementocitos y células formadoras de colágeno *in vivo*. Las PDLSC humanas fueron responsables de la formación de fibra de colágeno dentro de los trasplantes, tal y como se demuestra por la reactividad de estas células ante el anticuerpo anti-mitocondrial específico humano (Figuras 5F a 5H).

Para evaluar si las PDLSC fueron capaces de ayudar a reparar el tejido periodontal, las PDLSC humanas fueron trasplantadas en defectos creados quirúrgicamente en la zona periodontal de los molares mandibulares de ratas inmunosuprimidas.

Las PDLSC humanas trasplantadas se integraron en el compartimento del PDL en dos de las seis muestras examinadas (Figura 6A) y ocasionalmente se unieron a las superficies del hueso alveolar y las piezas dentales (Figuras 6B y 6C), dependiendo de las áreas examinadas. Estas conclusiones sugieren un potencial papel funcional de las PDLSC humanas para la regeneración de tejido periodontal.

#### Debate

Por lo que respecta al desarrollo de las piezas dentales, el PDL se obtiene del folículo dental que rodea a los dientes en desarrollo, proporcionando un conjunto de células formadoras de cemento (Handa et al. 2002; Zhao et al, 2002). Las conclusiones presentadas en el presente documento demuestran que el PDL humano contiene una población de células madre postnatales multipotentes que se pueden aislar y expandir *in vitro*, proporcionando una reserva única de células madre de un recurso de tejido accesible. Es importante señalar que el PDL recogido de una pieza dental puede dar lugar a múltiples células madre, debido a su capacidad de proliferación *ex vivo*. Por tanto, la regeneración de tejido mediada por PDLSC humanas podría tener potencial como tratamiento celular práctico para las enfermedades periodontales.

Experimentos previos han demostrado que la médula ósea y la pulpa de tejido dental humano contienen

células postnatales que son capaces de diferenciarse en osteoblastos/odontoblastos, adipocitos y células similares a las neuronales. Estas células madre se caracterizaron como progenitores STRO-1/CD146 positivos obtenidos de un nicho perivascular dentro de la médula ósea y de microentornos de pulpa dental. (Gronthos et al. , 2000; Shi et al. , 2003; Gronthos et al., 2002) En el presente estudio, se ha demostrado que las PDLSC son similares a otras células madre mesenquimales por lo que respecta a su expresión de STRO-1/CD146, lo que sugiere que las PDLSC también se podrían obtener de una población de células perivasculares. (Gould et al., 1977; McCulloch et al., 1985).

Las conclusiones presentadas en el presente documento sugieren que las PDLSC representan una población novedosa de células madre multipotentes, tal y como demuestra su capacidad para diferenciarse en células similares a cementoblastos, adipocitos in vitro y tejido similar a cemento/PDL in vivo, así como su elevado nivel de expresión de escleraxis, un factor de transcripción específico asociado con las células de tendón. (Brent et al. , 2003) Las PDLSC también demostraron su capacidad para formar fibras de colágeno, similares a las fibras de Sharpey, que se unen al tejido similar al cemento, lo que sugiere el potencial de regenerar la unión al PDL. Estos datos respaldan el concepto de que las PDLSC son una población única de células madre postnatales. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de las células madre mesenquimales STRO-1/CD146 positivas (Shi et al. , 2003), es posible que las PDLSC descritas en el presente puedan representar una población enriquecida de células madre heterogéneas que contiene algunas células progenitoras tempranas sin una función.

El potencial osteogénico de las células de PDL se ha evaluado con anterioridad utilizando diversos métodos de cultivo de células y se ha documentado la capacidad de estos cultivos para formar una matriz mineralizada. (Lekic et al., 2001; Ohno et al., 2002). Los datos presentados en el presente demuestran el potencial de las PDLSC para formar depósitos calcificados in vitro, tal como han demostrado anteriormente otras poblaciones de células mesenquimales como las BMSSC y las DPSC. Sin embargo, las PDLSC formaron nódulos calcificados dispersos en comparación con sus homólogas de tejido de la pulpa o de la médula espinal. A pesar de que se observó que las PDLSC expresan un conjunto de marcadores cementoblásticos/osteoblásticos, no formaron dentina, hueso ni sus componentes hematopoyéticos asociados in vivo.

Los datos presentados en el presente utilizaron selección de colonias y marcadores de STRO-1/CD146 para aislar las PDLSC del PDL. El trasplante in vivo demostró que las PDLSC expandidas in vitro generan un complejo similar al cemento/PDL que se caracteriza por una capa de tejidos similares al cemento alineados y tejidos similares al PDL claramente asociados. Las PDLSC, al igual que las DPSC, demuestran un mayor número de duplicaciones de la población que las BMSSC en cultivo; los potenciales mecanismos que contribuyen a la prolongada vida útil de las PDLSC y las DPSC no están claros. A pesar de que las PDLSC, DPSC y BMSSC son células madre mesenquimales y comparten algunos perfiles de expresión de proteínas comunes, las PDLSC difieren notablemente en sus potenciales de desarrollo in vivo y en su capacidad para diferenciarse en tejidos distintos representativos de los microentornos de los que se han obtenido in vivo.

La conclusión presentada en el presente demuestra que las PDLSC postnatales son células clonogénicas, altamente proliferativas y capaces de regenerar tejidos similares a cemento/PDL que las definen efectivamente como células madre. Por consiguiente, las PDLSC ofrecen potencial para su uso en la regeneración de tejido periodontal.

Los resultados presentados en el presente demuestran que las PDLSC humanas participan en el proceso de reparación de tejido periodontal en ratas inmunosuprimidas.

## **EJEMPLO 2**

### **Recuperación de células madre postnatales funcionales de tejidos**

#### **mesenquimales humanos criopreservados, como ligamento periodontal** **Introducción**

##### **Introducción**

Se aislaron con éxito células madre postnatales de diversos tejidos humanos, incluyendo médula espinal, sangre periférica, tejido neural, músculo esquelético, epitelio, pulpa dental y ligamento periodontal (Bianco y Robey, 2001, Evers et al. , 2003; Gronthos et al., 2000; Korbling y Estrov, 2003; Seo et al. , 2004). Con los recientes avances de las terapias con células madre y de la ingeniería de los tejidos, la preservación efectiva de células madre supone un problema para el tratamiento clínico mediado por células madre (Korbling y Estrov, 2003). Durante décadas las clínicas han utilizado células madre hematopoyéticas criopreservadas para el tratamiento de enfermedades. Recientemente, se ha documentado que las células madre hematopoyéticas se pueden usar con éxito para el trasplante de células madre tras 15 años de criopreservación (Broxmeyer et al., 2003), lo que sugiere que la criopreservación a largo plazo es un método fiable para el almacenamiento de células madre. Por otra parte, la capacidad para criopreservar con éxito células reproductivas, incluyendo espermatozoos y ovocitos, tejidos reproductivos, embriones y material nuclear tiene implicaciones significativas para la medicina y la tecnología en el campo de la reproducción (He et al. , 2003; Hoffman et al. , 2003; Hubel, 1997; Rowley et al., 2003; Woods et al. ,

2004). Sin embargo, se desconoce si el tejido humano sólido criopreservado es un recurso para la recuperación de células madre funcionales.

Tal y como se describe aquí, las células madre de ligamento periodontal humano (PDLSC) se aislaron y caracterizaron como una población de células madre multipotentes capaces de formar cemento y tejidos de ligamento periodontal tras el trasplante in vivo. El tejido de ligamento periodontal recogido de las piezas dentales extraídas es un tejido humano de fácil acceso que no solamente puede servir como recurso práctico para las potenciales terapias mediadas por células madre, sino también proporcionar un número suficiente de muestras de tejido para el análisis de las características de las células madre.

#### Materiales y métodos

##### 10 Sujetos, criopreservación y cultivo de células

Se recogieron inmediatamente después de la extracción terceros molares impactados humanos normales junto con los fragmentos de hueso unidos de un total de 10 adultos (19-29 años) en la clínica Dental Clinic of the National Institute of Dental & Craniofacial Research, de conformidad con las directrices aprobadas establecidas por los National Institutes of Health Office of Human Subjects Research. Los ligamentos periodontales se separaron suavemente de la superficie de la raíz y, a continuación, se cortaron en pequeñas porciones (0,5 mm<sup>3</sup> de tamaño). Los tejidos estromales de médula ósea se retiraron por medios mecánicos de los fragmentos de hueso (Krebsbach et al., 1997; Kuznetsov et al., 1997).

Los tejidos de PDL o tejidos estromales de médula ósea obtenidos de los diferentes individuos se mezclaron y la mitad de las muestras de tejido se utilizó para aislar células madre recién obtenidas, mientras que la otra mitad se mezcló con suero fetal de ternero (Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX) que contenía un 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) a 4°C y, a continuación, se almacenó directamente en nitrógeno líquido. Tras haber estado congelados durante 3 y 6 meses, los tejidos se descongelaron rápidamente a 37°C y, a continuación, fueron procesados en una solución de 3 mg/ml de colagenasa de tipo I (Worthington Biochem, Freehold, NJ, USA) y 4 mg/ml de dispasa (Roche, Mannheim, Alemania) durante una hora a 37 °C. Las suspensiones de células únicas (10<sup>4</sup> células) se sembraron en un matraz T25 (Costar, Cambridge, MA) con modificación alfa del medio de Eagle (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), se complementaron con un 15% de suero fetal de ternero (Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX, USA), 100 mM L-ácido ascórbico-2-fosfato (WAKO, Tokyo, Japón), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina 45 y 100 mg/ml de estreptomina (Biofluids Inc, Rockville, MD, USA) y, a continuación, se incubaron a 37 °C en un 5% de CO<sub>2</sub>.

Para evaluar la eficiencia de la formación de colonias, los cultivos del día 10 se fijaron con formalina al 4% y, a continuación, se tiñeron con azul de toluidina. Los agregados de > 50 células se puntuaron como colonias. La tasa de proliferación de los cultivos subconfluentes (primer paso) de PDLSC se evaluó mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) utilizando un kit de tinción Zymed Laboratories (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Las condiciones para la inducción de la acumulación de calcio y la adipogénesis se habían documentado con anterioridad (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002). Para la generación de colágeno de tipo I in vitro, se cultivaron las perlas de PDLSC (2 X 10<sup>6</sup>) durante 6 semanas en tubos de polipropileno de 15 ml en un ml de medio DMEM con un elevado nivel de glucosa (4,5 g/l), complementado con 1% ITS+, 100 mM L- ácido ascórbico 2-fosfato (WAKO, Tokyo, Japón), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (Biofluids Inc, Rockville, MD, USA), 2 mM de piruvato y 10 ng/ml de TGF- β1 recién añadidos. El medio se cambió dos veces a la semana.

#### Anticuerpos

Entre los anticuerpos de conejo se incluyeron anti-TGFβRI (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , Santa Cruz, CA, USA), anti-mitocondrial específico humano (Chemicon, Temecula, CA, USA), y anti-colágeno de tipo I (LF-67), sialoproteína ósea (BSP LF-120), fosfatasa alcalina (ALP LF-47) del Dr. Larry Fisher del NIDCR/NIH (Miura et al., 2003). Los anticuerpos de ratón incluían STRO-1 (Dr. Stan Gronthos). También se utilizaron anticuerpos de control negativos con coincidencia de isotipo de conejo y murino (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA).

##### 50 Trasplante

Aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> C-PDLSC o BMSSC expandidas in vitro se mezclaron con 40 mg de partículas de cerámica de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) (Zimmer Inc. Warsaw, IN, USA) y, a continuación, se trasplantaron subcutáneamente en la superficie dorsal de ratones beige inmunosuprimidos de 10 semanas de edad (NIH-bg-nu-xid, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA), tal y como se había descrito anteriormente (Krebsbach et al. , 1997; y en el presente documento). Estos procedimientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones de un protocolo aprobado para animales (NIDCR #02-222). Los trasplantes se recuperaron a las 6-8 semanas contadas desde el trasplante, se fijaron con un 4% de paraformaldehído, se descalcificaron con una solución tampón al 10% de EDTA (pH 8.0) y, a continuación, se introdujeron en parafina. Las secciones se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

#### Inmunohistoquímica

Las C-PDLSC fueron subcultivadas en portaobjetos de ocho cámaras ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) (NUNC Inc, Naperville, IL, USA). Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y, a continuación, se bloquearon e incubaron con anticuerpos primarios (a diluciones que oscilaron desde aproximadamente 1:200 hasta aproximadamente 1:500) durante una hora. Posteriormente, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra de IgG-rojo de rodamina o IgG-Cy2 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), durante 45 minutos. En el caso de la tinción inmunohistoquímica enzimática, se utilizó el kit de AEC de inmunoperoxidasa de amplio espectro Zymed (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA) de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante.

#### 10 Hibridación in situ de Alu humana

Se realizó la hibridación in situ de la secuencia Alu específica humana, tal y como se había descrito anteriormente (Shi et al., 2002). Dicho brevemente, entre los cebadores para Alu (Número de registro Genbank X53550) se incluyeron: sentido, 5'-TGGCTCACGCCTGTAATCC-3' número de base 90-108; SEC. ID. N.º 9), y antisentido: 5'-TTTTTTGAGACGGAGTCTCGC-3' (número de base 344-364; SEC. ID. N.º: 10). Las secciones de trasplantes de BMSSC de ocho semanas se desparafinaron e hibridaron con sonda de Alu marcada con digoxigenina, utilizando el kit localizador de ARNm Hyb Kit (Cat # 1800; Ambion, Inc., Austin TX). Tras la hibridación, la presencia de células positivas de Alu específicas humanas detectó la inmunorreactividad con fosfatasa alcalina de antidigoxigenina conjugada con fragmentos Fab (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA).

#### 20 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de T-Student para analizar la significación entre los dos grupos. Los valores p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

#### Resultados

Para examinar si el tejido criopreservado contenía células madre postnatales se preservaron pequeñas porciones de PDL congeladas en nitrógeno líquido durante 3 y 6 meses; a continuación, el PDL congelado se utilizó como recurso de tejido para aislar las células madre postnatales. Al menos el 40% de las cepas de una única colonia heterogénea de PDLSC se pudo recuperar del PDL congelado/descongelado, al colocarlas en placas a baja densidad (5000 células por matraz T-25) (Figura 7A). A pesar de que el número de colonias únicas de PDLSC obtenidas de PDL criopreservado se redujo notablemente en comparación con las PDLSC recién aisladas, mantenían una elevada capacidad proliferativa en términos de marcado con BrdU durante 12 horas (Figura 7B).

Tras el examen histológico de las PDL criopreservadas, el tejido de PDL congelado presentaba varios tipos normales de estructuras microscópicas en la mayoría de las áreas examinadas (Figuras 7C y 7D). Sin embargo, se observó daño celular, como anisocariosis, un tamaño variable del núcleo y la agrupación de células (Figura 7E). Estas células también fueron negativas para la tinción con la técnica de TUNEL, lo que indica muerte celular no apoptótica probablemente causada por la nucleación de hielo intracelular letal.

Se observó que las PDLSC criopreservadas (C-PDLSC) expandidas ex vivo expresaban la molécula de la superficie celular STRO-1, un marcador temprano de las células madre mesenquimales, junto con la coexpresión de marcadores del TGF cementoblásticos/osteoblásticos (Figuras 7F-7M). Por otra parte, las C-PDLSC exhibían una expresión separada y no solapada de STRO-1 con BSP (Figuras 2F-2I), lo que indica sus características de heterogeneidad.

Para evaluar la capacidad de diferenciación multipotencial in vitro, los cultivos de C-PDLSC secundarios establecidos se complementaron con L-ascorbato-2-fosfato, dexametasona y fosfato inorgánico, a fin de inducir una diferenciación osteogénica/cementogénica, tal y como se había descrito previamente (Miura et al., 2003; y véase más arriba). Los resultados demostraron la formación de nódulos positivos en rojo de alizarina en los cultivos de C-PDLSC cuatro semanas después de la inducción, lo que indica una acumulación de calcio in vitro (Figuras 8A y 8B). A continuación, se examinó el potencial de las PDLSC para diferenciarse en adipocitos. De forma análoga a lo que se había demostrado anteriormente con respecto a las PDLSC y C-PDLSC adultas, se observó que las C-PDLSC también ofrecían el potencial de diferenciarse en células de grasa cargadas de lípidos positivas en aceite rojo O después de cinco semanas de cultivo con un cóctel inductivo adipogénico (Figuras 8C y 8D).

Como ya se demostró anteriormente, las PDLSC humanas trasplantadas eran capaces de formar tejidos similares a PDL positivos en colágeno de tipo I dentro de los trasplantes y también el TGFβ1 podía inducir la expresión de colágeno en las BMSSC. También se examinó si el TGFβ1 era capaz de regular al alza la expresión de colágeno de tipo 1, el principal tipo de colágeno presente en el tejido del PDL. Bajo la inducción de TGFβ1, las PDLSC y C-PDLSC produjeron colágeno de tipo I en cultivo, lo que confirma su capacidad única de formación de colágeno (Figuras 8E- 8J). Por lo contrario, las DPSC no fueron capaces de producir fibras de colágeno bajo las mismas condiciones de cultivo (Figura 8G).

60 Se ha demostrado que las PDLSC fueron capaces de formar tejidos similares a cemento/PDL tras el trasplante in vivo. Para confirmar la capacidad de regeneración del tejido, las C-PDLSC se trasplantaron

subcutáneamente en ratones inmunosuprimidos utilizando hidroxapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) como portador. Se generó una estructura típica similar a cemento/PDL en la que se formó una fina capa de cemento sobre la superficie del HA/TCP y las estructuras similares al PDL se unieron al cemento recién regenerado (Figura 9A). Los trasplantes de C-PDLSC produjeron cementoblastos/cementocitos positivos en mitocondria específica humana, lo que indica una diferenciación in vivo de las C-PDLSC humanas (Figura 9B). Por otra parte, las fibras de colágeno se insertaron perpendicularmente en el tejido similar a cemento (Figuras 9C y 9D), imitando a las fibras de Sharpey naturales del ligamento periodontal. Para entender mejor la diferenciación in vivo de las C-PDLSC, se seleccionaron seis cepas de una única colonia de C-PDLSC y se trasplantaron en ratones inmunosuprimidos, tal como se ha descrito anteriormente.

Cuatro de las seis colonias pudieron generar cemento y estructuras de PDL con cantidades variables de cemento/fibras de PDL, mientras que las dos colonias restantes solamente revelaron tejido fibroso dentro de los trasplantes (Figuras 9E y 9F), lo que sugiere que las C-PDLSC mantienen las características heterogéneas de las PDLSC normales. Adicionalmente, se observó que el cemento y los cementoblastos regenerados eran positivos para la tinción con el anticuerpo anti-colágeno de tipo I y BSP (Figuras 9G-9I). Estos datos confirmaron que las C-PDLSC eran capaces de diferenciarse en cementoblastos y de formar cemento in vivo.

Para determinar si la criopreservación puede influir en el cariotipo de las PDLSC criopreservadas, se realizó un cariotipo con banda G para examinar la estabilidad cromosómica de las C-PDLSC. Las C-PDLSC presentaban un cariotipo con banda G normal en comparación con las PDLSC normales (datos no mostrados). Estos datos sugieren que las C-PDLSC pueden ser utilizadas con fines terapéuticos.

Para valorar si otro tejido criopreservado también contiene células madre postnatales, se recuperaron BMSSC humanas de tejido estromal de médula ósea congelada/descongelada obtenido de fragmentos de hueso. Estas células madre mesenquimales recuperadas expresaban el marcador de las células madre STRO-1 y fosfatasa alcalina (Figuras 10A-10D).

Tras la expansión ex vivo, las BMSSC trasplantadas dieron lugar a una estructura de hueso/médula in vivo (Figura 10E), similar a lo ocurrido con el trasplante de BMSSC normal. Las BMSSC se diferenciaron en células osteogénicas identificadas por la secuencia Alu específica humana por hibridación in situ (Figura 10F). Estos datos indicaron que se podían recuperar células madre postnatales funcionales de tejidos congelados, cuando estos se criopreservaban conforme a los métodos descritos en el presente.

#### Debate

Los experimentos previos han demostrado que las PDL humanas recién aisladas contienen células madre que son capaces de diferenciarse en células cementoblásticas/osteoblásticas in vitro y de formar tejidos similares a cemento/PDL in vivo (tal y como se ha descrito en este documento). El presente estudio demuestra que las células madre postnatales humanas se pueden recuperar de PDL humano criopreservadas, aportando así un método clínico práctico para la utilización de tejidos congelados para el aislamiento de células madre. Es importante el hecho de que las C-PDLSC mantienen las características de las células madre y la capacidad de regeneración de tejido in vivo, lo que sugiere un gran potencial de uso de las C-PDLSC para la regeneración de tejido periodontal.

La base lógica del aislamiento de células madre postnatales humanas de tejidos congelados es preservar de forma práctica y eficaz las muestras clínicas para la posterior recuperación de células madre y para potenciales terapias mediadas por células madre. Parece razonable especular que la criopreservación de tejidos en la clínica resultará mucho más sencilla que el aislamiento de células madre que puede requerir equipos adicionales o personal profesional. En este estudio se determinó que las C-PDLSC son similares a las PDLSC por lo que respecta a sus características de STRO-1 positivo. Por tanto, las C-PDLSC se pueden obtener de una población de células perivasculares (Gould et al., 1977; McCulloch, 1985). Por otra parte, las C-PDLSC muestran una naturaleza heterogénea que puede reflejar diferencias en sus fases de evolución o pueden incluso representar diferentes líneas de células de PDL análogas a las PDLSC no congeladas. Esto se pone de manifiesto en los experimentos en los que cada línea de células clonales de C-PDLSC obtenidas de una colonia demostró una capacidad variable para generar cemento, que oscilaba entre una ausencia total de cualquier cementogenesis hasta unos niveles comparables a las poblaciones obtenidas de múltiples colonias. Cabe señalar que las PDLSC y C-PDLSC fueron capaces de formar agregados de colágeno cuando se cultivaron con TGFβ1 in vitro, lo que refleja una especificidad de estas células madre para formar fibras de colágeno para el mantenimiento de la homeostasis del tejido de PDL. Estos datos respaldan además la idea de que las C-PDLSC son similares funcionalmente a las PDLSC.

Es interesante señalar que se pueden recuperar progenitores hematopoyéticos tras la criopreservación de médula ósea completa donde las células de los individuos fueron suspendidas dentro de una fase líquida (Lundell et al., 1999). Este es el primer informe/estudio que utiliza tejido humano congelado/descongelado para aislar células madre postnatales (previamente identificadas como células madre a nivel funcional). A pesar de que el número recuperado de colonias únicas de PDL congelado durante seis meses fue inferior a las PDLSC obtenidas del PDL fresco, observó ninguna diferencia por lo que respecta a las características de las células madre, incluyendo la expresión de marcadores, la tasa de proliferación, el

cariotipo con banda G y la capacidad de regeneración de tejido in vivo. Por otra parte, no se observó ninguna diferencia entre los periodos de preservación por congelación de 3 y 6 meses por lo que respecta a la tasa de recuperación de células madre, lo que indica que la duración de la criopreservación de hasta 6 meses o más puede no ser perjudicial para la supervivencia de las C-PDLSC.

- 5 Se desconoce la razón por la que la tasa de recuperación de colonias de células madre es inferior. Existen múltiples factores que pueden influir en la viabilidad de las células madre criopreservadas con éxito, entre los que se incluyen el procesamiento previo a la congelación, las variaciones de temperatura y la duración del almacenamiento, así como los procedimientos posteriores a la congelación (Hubel, 1997). La causa más común de muerte celular es la formación de hielo intracelular durante el proceso de congelación/descongelación (Rowley et al., 2003; Woods et al., 2004). La criopreservación se puede mejorar para incrementar la tasa de supervivencia tras la congelación de las células madre criopreservadas, utilizando, por ejemplo, trehalosa, un disacárido no reductor de la glucosa (Eroglu et al., 2000; Guo et al., 2000).

10 Por tanto, las células madre postnatales se pueden recuperar de tejidos humanos. Este es el primer reporte de que se pueden recuperar células madre postnatales de tejido humano congelado sólido.

#### Bibliografía

- Amar, S., Chung K.M. (1994) Clinical implications of cellular biologic advances in periodontal regeneration. *Curr Opin Periodontol* 128-40.
- Bartold, P.M., McCulloch, C.A., Narayanan, A.S., Pitaru, S. (2000).
- 20 Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol.* 2000 24:253-69.
- Baum BJ, Mooney DJ (2000). The impact of tissue engineering on dentistry. *J Am Dent Assoc* 131(3):309-18.
- 25 Beertsen, W., McCulloch, C.A., Sodek, J. (1997) The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000. 13:20- 40.
- Bianco, P., Robey, P.G. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414(6859): 118-21.
- Boyko, G.A., Melcher, A.H., Brunette, D.M. (1981) Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. *J Periodontol Res.* 16:73-88.
- 30 Broxmeyer, H.E., Srour, E.F., Hangoc, G., Cooper, S., Anderson, S.A., Bodine, D.M. (2003). High efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(2):645-50.
- Brent, A.E., Schweitzer, R. Tabin, C.J. (2003) A somatic compartment of tendon progenitors. *Cell.* 113:235-48.
- 35 Cochran, D.I., Wozney, J.M. (1999) Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 19:40-58.
- Cochran, D.I., Jones, A., Heijl, L., Mellonig, J.T., Schoolfield, J., King, N. (2003) Periodontal regeneration with a combination of enamel matrix proteins and autogenous bone grafting. *J Periodontol.* 74:1269-81.
- 40 Cochran, D.I., King, G.N., Schoolfield, J., Velasquez-Plata, D., Mellonig, J.T., Jones, A. (2003) The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. *J Periodontol.* 74:1043-55.
- Desvarieux, M., Demmer, R.T., Rundek, T. et al. (2003) Relationship between periodontal disease, tooth loss, and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Stroke.* 34:2120-25.
- 45 Elter, J.R., Offenbacher, S., Toole, J.F., Beck, J.D. (2003) Relationship of periodontal disease and edentulism to stroke/TIA. *J Dent Res.* 82:998-1001.
- Eroglu, A., Russo, M.J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H, Toner, M. (2000). Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 18(2) :163-7.
- 50 Evers, B.M., Weissman, I.L., Flake, A.W., Tabar, V., Weisel, R.D. (2003). Stem cells in clinical practice. *J Am Coll Surg.* 197(3):458-78.
- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J., Levine, F. (2000). Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells, *Nat Biotechnol,* 18(2) : 168-71.
- Gould, T.R., Melcher, A.H., Brunette, D.M. (1980) Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J. Periodontal Res.* 15:20-42.

- Gould, T.R., Melcher, A.H., Brunette, D.M. (1977) Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat Rec.* 188:133-41.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman 1ST, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Slii S (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81(8):531-5.
- 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 US A* 97(25): 13625-30.
- Grzesik, W.J., Kuznetsov, S.A., Uzawa, K., Mankani, M., Robey, P.G., Yamauchi, M. (1998) Normal human cementum-derived cells: isolation, clonal expansion, and in vitro and in vivo characterization. *J Bone Miner Res.* 13 :1547-54.
- 10 Grzesik, W.J., Narayanan, A.S. (2002) Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13:474-84.
- Han, X., Amar, S. (2003) IPG-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 82:454-59.
- 15 Handa,K., Saito, M., Yamauchi, M., Kiyono, T.» Sato, S., Teranaka, T., & SampathNarayanan, A. (2002) *Bone* 31(5):606-611.
- Handa, K., Saito, M., Tsunoda, A, et al. (2002) Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res.* 43:406-08.He, Z., Liu, H.C., Rosenwaks, Z. (2003), Cryopreservation of nuclear material as a potential method of fertility preservation. *Fertil Steril.* 79(2):347-54.
- 20 Hoffman, D.I., Zellman, G.L., Fair, C.C., Mayer, J.F., Zeitz, J.G., Gibbons, W.E., Turner, T.G., Jr. (2003). Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research. *Fertil Steril.* 79(5): 1063-9.
- Hubei, A. (1997). Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev*, 11(3):224-33.
- 25 Kaigler D, Mooney D (2001), Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 65(5):456-62.
- Isaka,J., Ohazama, A., Kobayashi, M. et al. (2001) Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontal* 2001. 72:314-23.
- 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 PGP-2, -4, -8, and -9, *Dev Genet* 22(4):374-85.
- 30 Korbling, M., Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 349(6):570-82.
- Krebsbach, P.H., Kuznetsov, S.A., Satomura, K., Emmons, R.V., Rowe, D. W., Robey, P.G. (1997). Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 63(8): 1059-69.
- 35 Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Rimiiucci, M., Benayahu, D., Robey, P.G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res.* 12(9): 1335-47.
- Lekic, P., Rojas, J., Birek C., Tenenbaum, H., McCulloch, C.A.G. (2001) Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J. Periodont. Res.* 36:71-79.
- 40 Liu, H.W., Yacobi, R., Savion, N., Narayanan, A.S., Pitaru, S. (1 997) A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res.* 12:1691-99,
- Lundell, B.I., Mandalam, R.K., Smith, A.K. (1999). Clinical scale expansion of cryopreserved small volume whole bone marrow aspirates produces sufficient cells for clinical use. *J Hematother.* 8(2): 115-27.
- 45 MacNeil, R.I., Somerman, M. J. (1999) Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontal* 2000. 19:8-20.
- Marcopoulou,C.E., Vavouraki, H.N., Dereka, X.E., Vrotsos, LA... (2003)
- 50 Proliferative effect of growth factors TGF-beta1, PDGF-BB and rhbmp-2 human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Int Acad Periodontal.* 82:23-27.
- McCulloch, C.A., Melcher, A.H. (1983) Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am J Anat.* 167:43-58.
- McCulloch, C.A., Bordin, S. (1991) role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and

## ES 2 610 964 T3

- pathology. *J Periodontol Res.* 26:144-54.
- McCulloch, C.A. (1985) Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec.* 211:258-62.
- 5 Melcher, A.H. (1970) Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol.* 15:1183- 204.
- Miura, Masako, Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Ghebrerobey, P., & Shi, S. (2003) SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 100(10):5807-5812.
- Murakami, Y., Kojima, T., Nagasawa, T., Kobayashi, H.» & Ishikawa, I. (2003) Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *J. Periodontol.* 74(6):780-786.
- 10 Nevins, M., Camelo, M., Nevins, M.I., Schenk, R.K., Lynch, S.E. (2003) Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol.* 74:1282-92.
- Ohno, S., Doi, T, Fujimoto, K. et al. (2002) RGD-CAP (betaig-h3) exerts a negative regulatory function on mineralization in the human periodontal ligament. *J Dent Res*, 81:822-25.
- 15 Ouyang, H., McCauley, L.K., Berry, I.E., D'Errico, J.A., Strayhorn, C. L., Somerman, M.J. (2000) Response of immortalized murine cementoblasts/periodontal ligament cells to parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in vitro. *Arch Oral Biol.* 45:293-303.
- Pitaru, S., Pritzki, A., Bar-Kana, I., Grosskopf, A., Savion, N., Narayanan, A.S. (2002) Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res.* 43:257-64.
- 20 Ripamonti, U., Reddi, A.H. (1997) Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissue by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 8(2): 154-63.
- Rowley, S.D., Feng, Z., Chen, L., Holmberg, L., Heimfeld, S., MacLeod, B, Bensinger, W.I. (2003). A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarcli. *Bone Marrow Transplant.* 31(11):1043-51.
- 25 Saito, Yoshinori et al. (2002) A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2, *Journal of Cell Science* 115:4191-4200,
- 30 Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.-Y., Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 364:149-155.
- 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):S32-9,
- 35 Shi, S., Gronthos, S. (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 18:696- 704.
- Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C.M., Robey, P.G., Wang, C.-Y. (2002). Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nature Biotechnology.* 20(6):587-591.
- 40 Shimono, M., Ishikawa, T., Ishikawa, H. et al. (2003) Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech.* 60:491-502.
- 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.
- 45 Thesleff, I, Tjund, M. (2003) Stem cells and tissue engineering: Prospects for Regenerating Tissues in Dental Practice. *Med Princ Pract* 12(suppl 1):43-40.
- 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):104S-55.
- 50 Morscbeck et al. (Fecha de publicación: 14/08/2003). Pluripotent embryonic- like stem cells derived from teeth and uses thereof. W003066840.
- Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y., Critser, J.K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology.* 48(2):146-56.
- Young, H.E. (2004) Existence of reserve quiescent stem cells in adults, from amphibians to humans. *Curr*

Top Microbiol Immunol 280:71-109.

Young, Henry E. et al. (2001) Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals : 1. Pluripotent mesenchymal stem cells. The Anatomical Record 263: 350- 360.

5 Young, Henry E. et al. (2001) Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult and geriatric donors. The Anatomical Record 264: 51- 52.

Zhao, M. Xiao, G. , Berry, J. E., Franceschi, R. T., Reddi, A., Somerman, M. J. (2002) Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. J Bone Miner Res. 17: 1441-51.

10 La anterior memoria descriptiva ha sido descrita en relación con determinadas realizaciones de la misma y se han ofrecido numerosos detalles a título ilustrativo; sin embargo, para los expertos en la materia resultará evidente que la invención es susceptible de realizaciones adicionales y que algunos de los detalles descritos en el presente pueden variar considerablemente sin apartarse de la invención reivindicada.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende una matriz de polímero o un gel de polímero y una célula madre multipotente postnatal aislada de ligamento periodontal clonogénico, donde la célula madre expresa STRO-1 y MUC18, donde la célula madre es capaz de diferenciarse en un cementoblasto, un cementocito, un adipocito y una célula formadora de fibra de colágeno.
2. La composición de la reivindicación 1, donde la matriz comprende un biopolímero.
3. La composición de la reivindicación 2, donde la matriz comprende fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, un colágeno, un proteoglicano, concanavalina A, sulfato de condroitina, gelatina, laminina, poli-D-lisina o poli-L-lisina.
4. La composición de la reivindicación 1, donde la matriz comprende un polímero sintético.
5. La composición de la reivindicación 4, donde el polímero es esponja de polivinilo o donde el gel comprende gelatina.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende también una citoquina, un factor de diferenciación o un material genético adicional.
7. La composición de la reivindicación 1 o 6 que comprende también un regulador del pH, un emulsionante, un agente dispersante, un agente tampón, un conservante, un agente humectante, un agente gelificador, un aditivo que mejore la viscosidad, un agente aromatizante, un colorante, cloruro sódico, dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico o glicol de propileno.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula madre es de mamífero.
9. La composición de la reivindicación 8, donde la célula madre es humana.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula madre expresa también escleraxis, fosfatasa alcalina, MEPE, receptor de TGFβ tipo I, BSP, OSC, y endostatina.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como medicamento en un método para producir células o tejido periodontal en un sujeto, que comprende la administración de la composición al sujeto.
12. La composición para el uso según la reivindicación 11, donde el tejido periodontal producido comprende ligamento periodontal, cementocitos, cementoblastos o cemento.
13. La composición para el uso según la reivindicación 12, donde los cementocitos o cementoblastos expresan BSP, OSC, MEPE o cualquier combinación de estos.
14. La composición para el uso según la reivindicación 11, donde el cemento expresa colágeno de tipo I y/o fibromodulina.
15. La composición para el uso según la reivindicación 14, donde la composición se utiliza para reducir o mejorar un traumatismo en el sujeto.
16. La composición para el uso según la reivindicación 15, donde el traumatismo es una enfermedad periodontal o lesión física.
17. La composición para el uso según la reivindicación 16, donde la lesión física se debe a un procedimiento dental.
18. La composición para el uso según la reivindicación 11, donde la composición se puede trasplantar al tejido periodontal del sujeto.
19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso como medicamento en un método para producir tejido adiposo humano en un sujeto, que comprende la administración de la composición al sujeto.
20. La composición para el uso según la reivindicación 11, donde la composición se implanta tras la inducción de adipocitos.
21. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20, donde el sujeto es mamífero.
22. La composición para el uso según la reivindicación 11, donde el mamífero es un humano.
23. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20, donde la célula madre se expande ex vivo.
24. Un método para obtener una célula madre multipotente postnatal aislada de ligamento periodontal clonogénico, donde la célula madre expresa STRO-1 y MUC18, donde la célula madre es capaz de diferenciarse en un cementoblasto, un cementocito, un adipocito y una célula formadora de fibra del

## ES 2 610 964 T3

colágeno, y donde dicho método comprende el uso de un anticuerpo anti-STRO-1 para aislar la célula madre de una muestra de tejido de ligamento periodontal.

25. El método de la reivindicación 24, que comprende también el posterior almacenamiento de la célula madre.
- 5 26. El método de la reivindicación 24 o 25 que comprende también el cultivo de la célula madre en un medio de cultivo tisular.
27. El método de la reivindicación 26, donde el medio de cultivo tisular incluye suero.
28. El método de la reivindicación 26 o 27, donde el medio de cultivo tisular incluye uno o más factores de crecimiento.
- 10 29. El método de la reivindicación 28, que comprende también la criopreservación del ligamento periodontal antes de aislar la célula madre.
30. El método de la reivindicación 29, donde el paso de criopreservación comprende la inmersión de una porción del ligamento periodontal en suero que contiene un 1-20% de dimetilsulfóxido y la congelación rápida del ligamento.
- 15 31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 30, donde el paso de aislar la célula madre comprende la descongelación del ligamento, la digestión o disrupción mecánica del ligamento para formar una suspensión de células individuales y la introducción de la suspensión en un recipiente para el cultivo tisular, en presencia de un medio de cultivo tisular.
32. El método de la reivindicación 31, donde el medio de cultivo tisular es un medio de células madre.
- 20 33. Un método para criopreservar una célula madre multipotente postnatal aislada de ligamento periodontal clonogénico, donde la célula madre expresa STRO-1 y MUC18, donde la célula madre es capaz de diferenciarse en un cementoblasto, un cementocito, un adipocito y una célula formadora de fibra del colágeno, y donde dicho método comprende la inmersión de una porción del ligamento periodontal aislado en suero que contiene un 1-20% de dimetilsulfóxido y la congelación rápida del ligamento,
- 25 particularmente donde la célula madre es tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

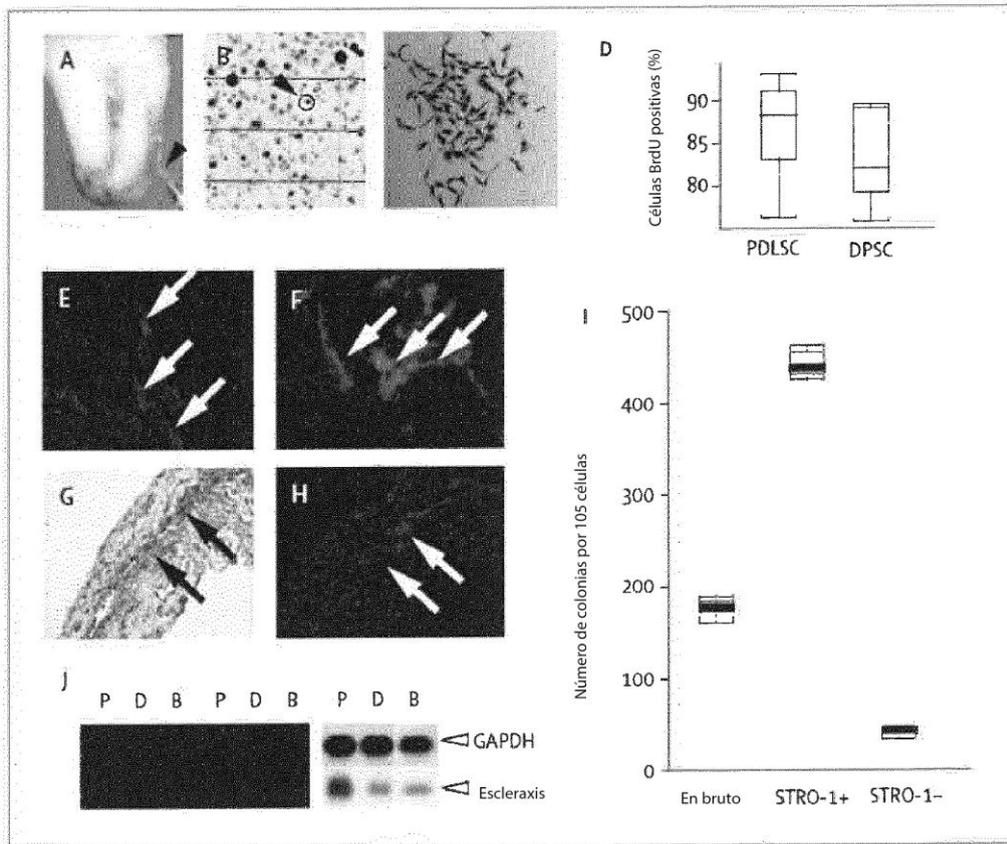


FIG. 1

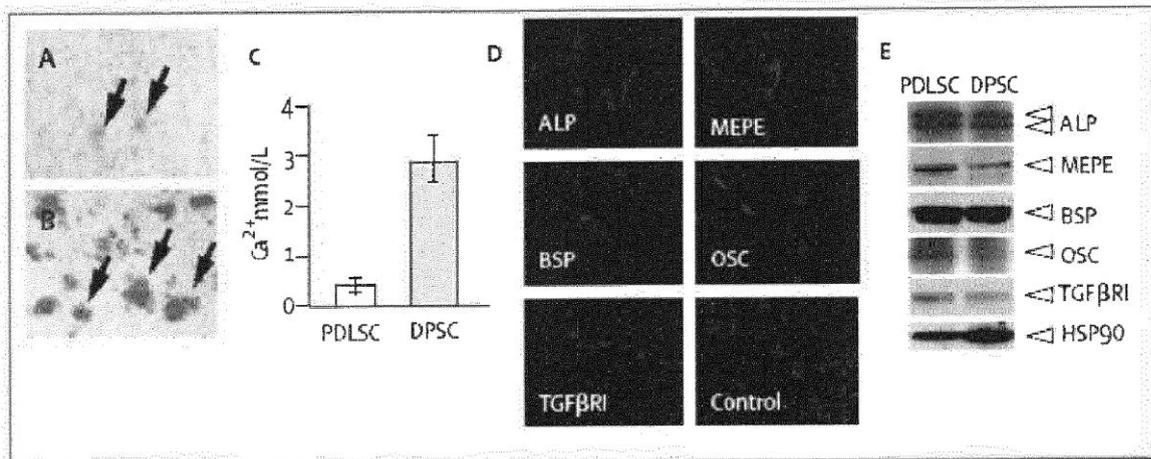


FIG. 2

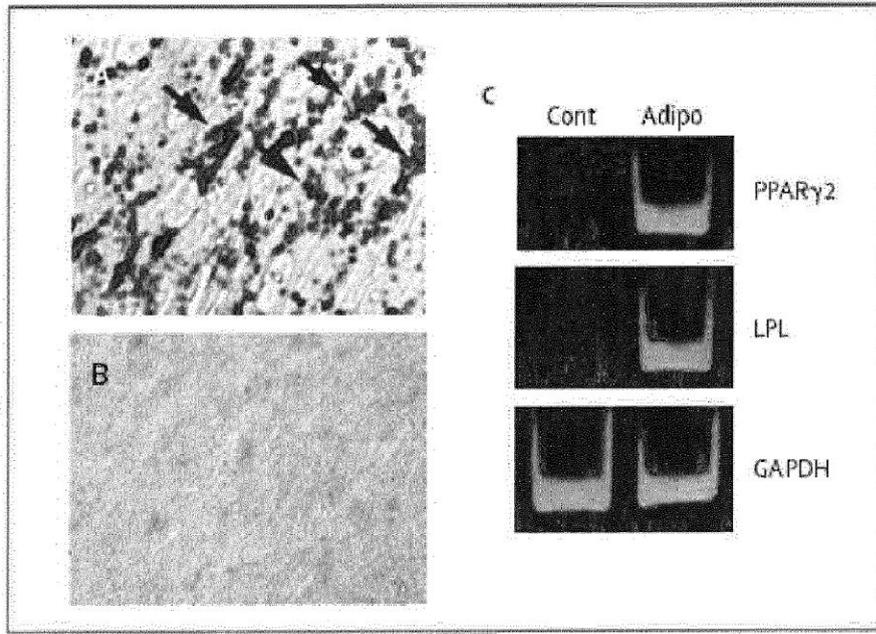


FIG. 3

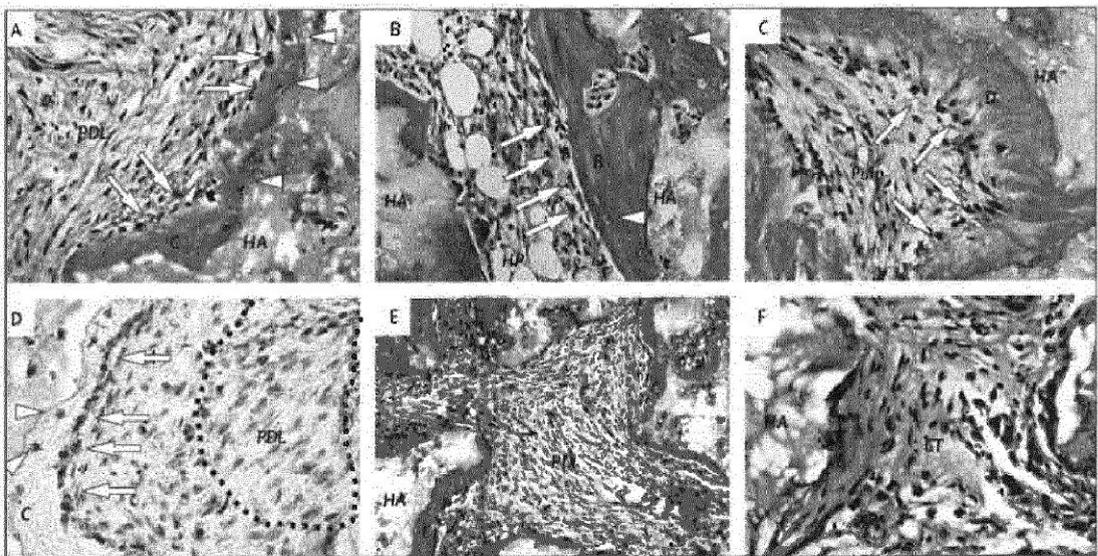


FIG. 4

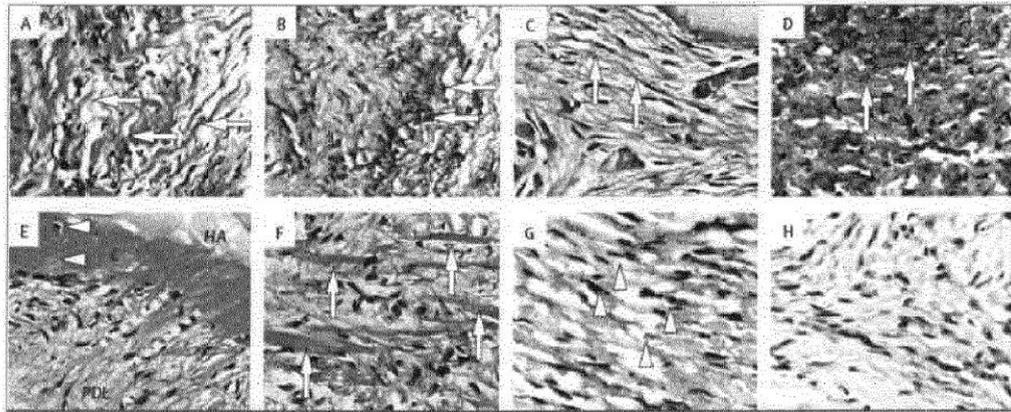


FIG. 5

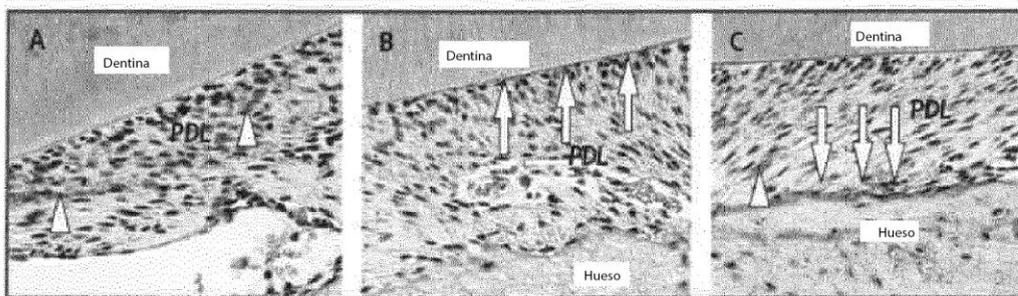


FIG. 6

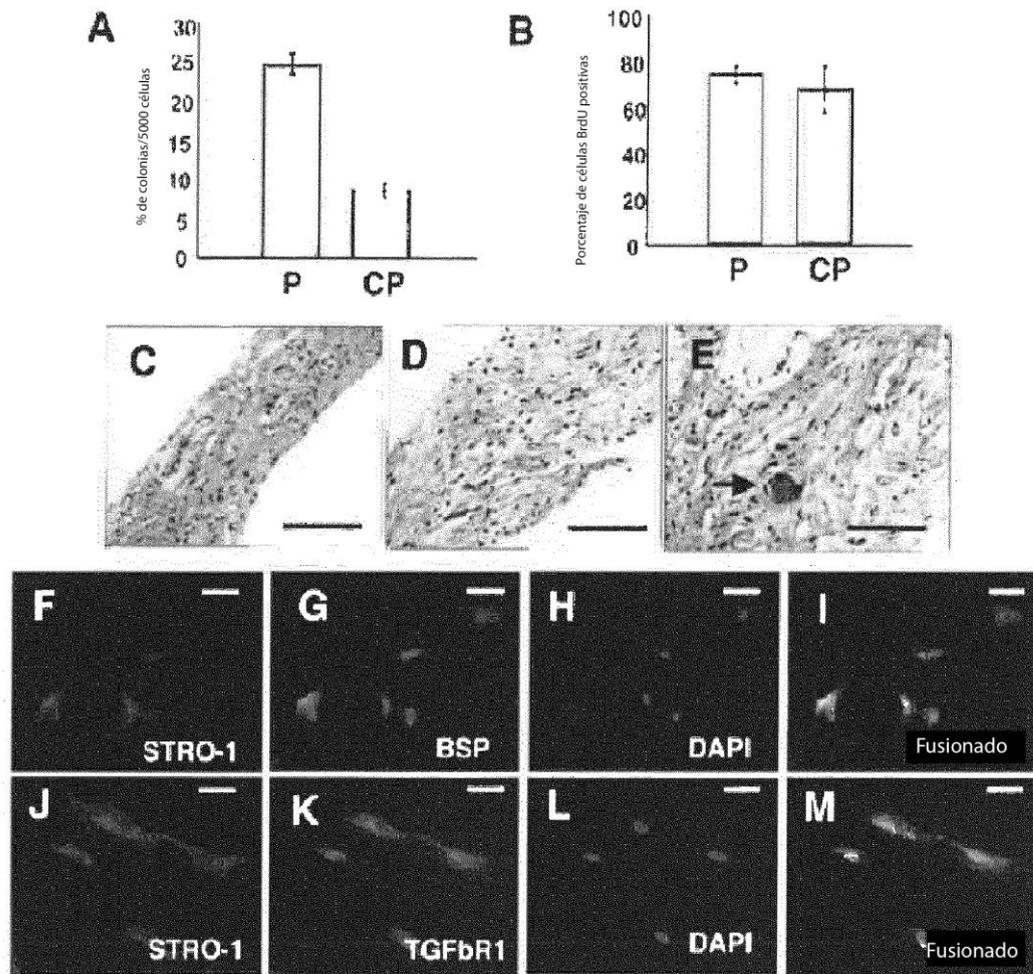


FIG. 7

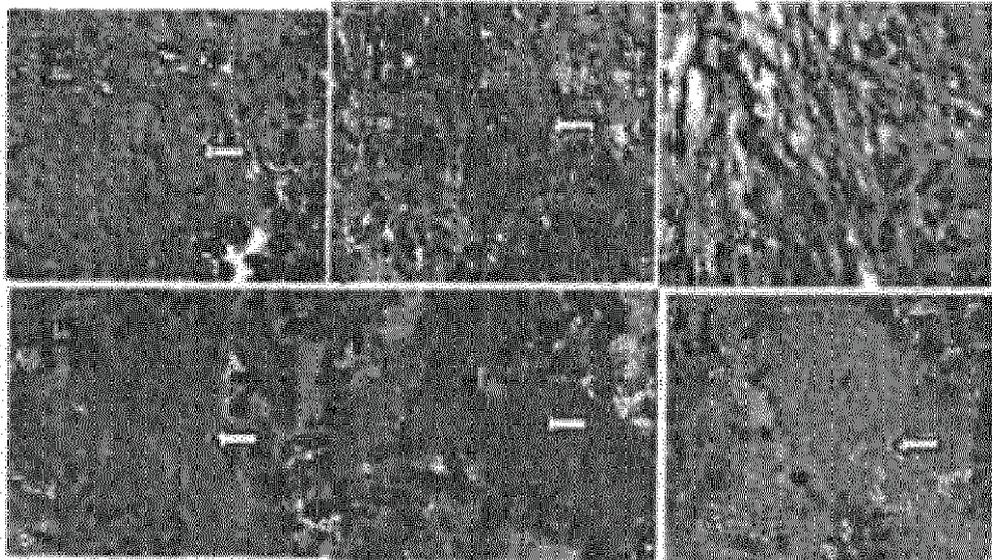
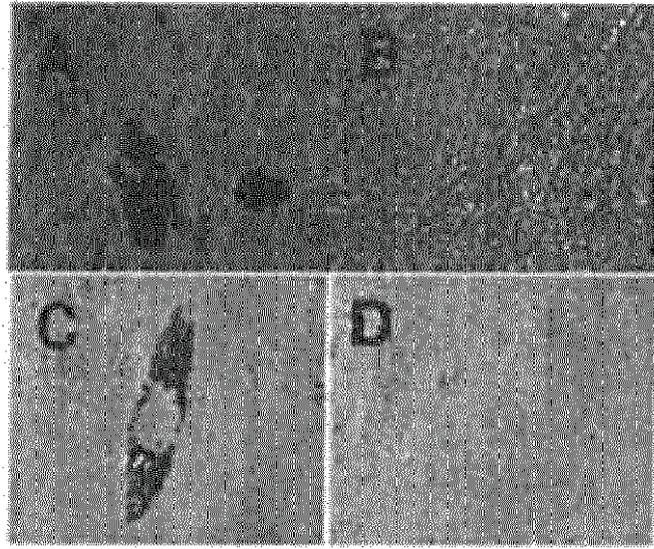


FIG. 8

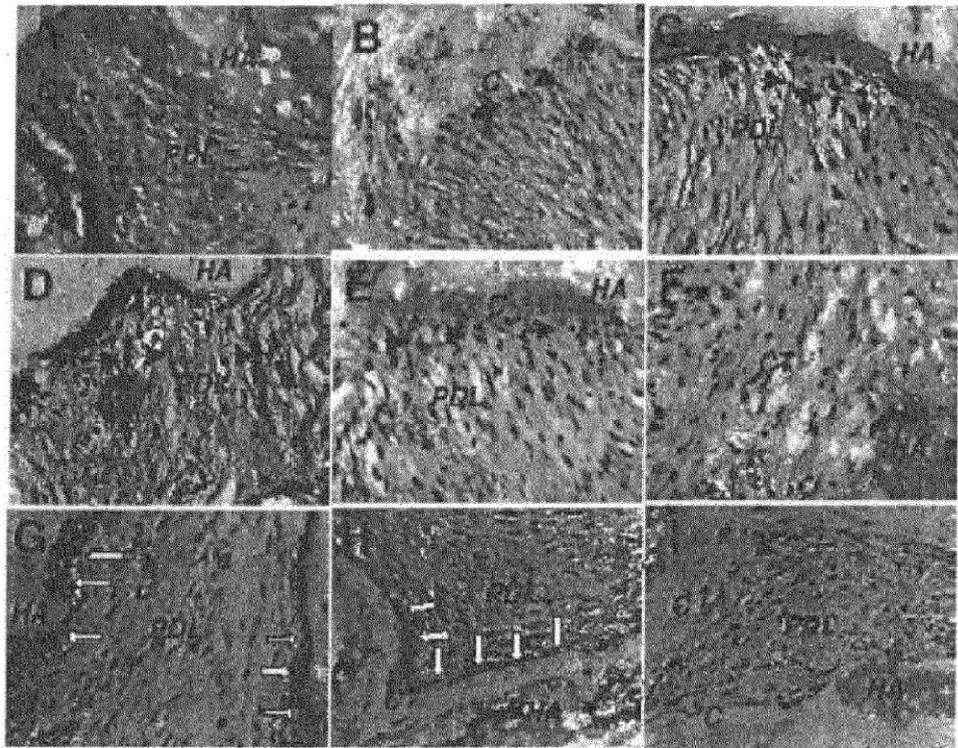


FIG. 9

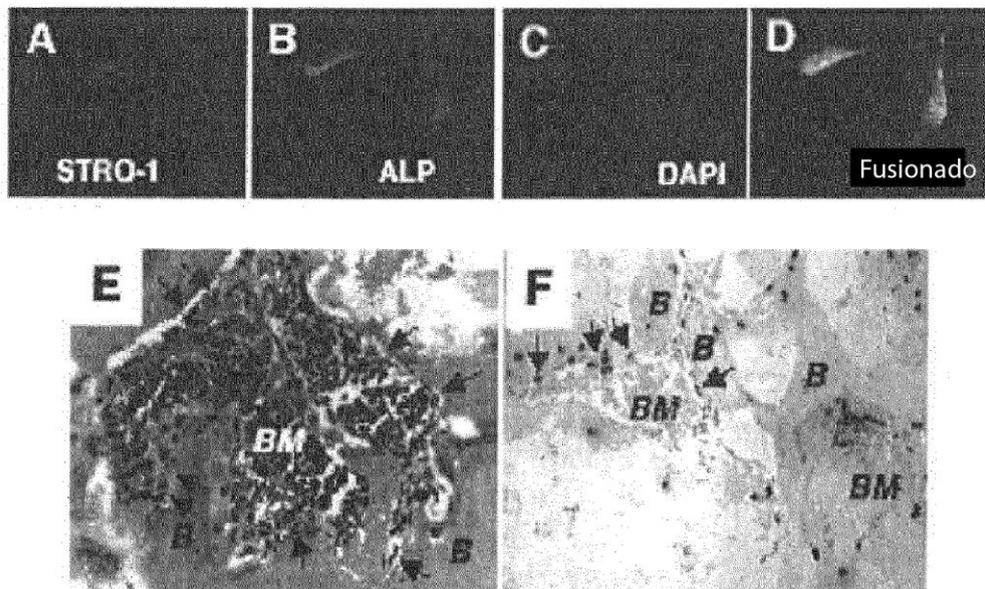


FIG. 10