



UNC

Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“MELATONINA Y SUS ACCIONES PROTECTORAS Y
OSTEODIFERENCIADORAS SOBRE CÉLULAS
MESENQUIMALES GINGIVALES DE RATA”**

TESISTA:

OD. ESP. VERÓNICA MARIANA SOLÁ-MORABITO

DIRECTOR:

PROF. DRA. AGATA RITA CARPENTIERI

CÓRDOBA, 2020



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Odontología

Escuela de Posgrado

*Melatonina y sus acciones protectoras y
osteodiferenciadoras sobre células mesenquimales
gingivales de rata*

Trabajo de tesis para optar al título de Doctora en Odontología

Od. Esp. Verónica Mariana Solá-Morabito

Directora de tesis: Prof. Dra. Agata Rita Carpentieri

Lugar de trabajo: Cátedra “B” de Química Biológica, FO-UNC
INICSA/CONICET, FCM-UNC

2020

The spring sun
shows its power
between snowfalls
-SHIGEYORI



Miembros Evaluadores y Jurados

Comisión de tesis

Prof. Dr. Ricardo Fretes, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (FCM-UNC-INICSA/CONICET).

Prof. Dr. Ismael Angel Rodriguez, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba (FO-UNC, FO-Universidad de Granada).

Prof. Dra. Agata Rita Carpentieri, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba (FO-UNC, INICSA/CONICET).

Jurado de tesis

Prof. Dr. Ricardo Fretes, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (FCM-UNC, INICSA/CONICET).

Prof. Dr. Ismael Angel Rodriguez, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba (FO-UNC, FO-Universidad de Granada).

Prof. Dr. Esteban Funosas, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Rosario (FO-UNR).

Agradecimientos

A la Dra. Carpentieri, directora de esta tesis, por la oportunidad de iniciarme en la investigación, por todo lo aprendido bajo su tutela.

Al Dr. Fretes y al Dr. Rodriguez, por el riguroso seguimiento de mi trabajo y sus excelentes aportes.

Al Bioq. JJ. Aguilar, por su generosidad para conmigo y este trabajo. Al Dr. Farías por su enorme ayuda.

A mis compañeras de cátedra de Química Biológica B, Dra Azcurra, Esp. Scatena, Dra. Castillo, Bioqs.Sokolovsky y Martinez, Dra. Barembaum y Dra. Peralta Lopez, por su hermoso acompañamiento en mi formación en todo sentido, profesional y personal.

A la Dra. Witt-Enderby, por su enorme generosidad para conmigo, cuando hice mi pasantía en su laboratorio.

A las siguientes instituciones: SeCyT y CONICET, por financiarme mediante becas de doctorado. A la FO-UNC y Secretaría de Graduados, por los años de formación continua. A la FO-UNCuyo, por la posibilidad de especializarme en Periodoncia. A la comisión Fulbright-Min. de Educación y la CABBIO por las becas otorgadas. Al virológico JM. Vanella, por los miles de experimentos que realice en dicho instituto.

Por último, pero más importante. A Dios, por las infinitas bendiciones que me otorgó. A mi madre, a mi padre, Solá y Ocampo, respectivamente, por contribuir a la persona que soy. A mis hermanas, Elena y Jimena, por la infancia, el cariño de siempre. A mis tios, José y Graciela, por su acompañamiento. A mis amigos, porque han sido, son y serán claves en mi vida. Amorós, ¡gracias por tu inconmensurable ayuda! Aquiles, Arano, Berasategui, Giménez, Rodriguez, Salas, ¡Sos de lo que ya no hay! Siudak, Schmidt, Storello, Torres, Vazquez Mosquera, por estar a mi lado.

A mis suegros, por su formidable apoyo en mi nueva vida.

A mi marido, Morabito, porque palabras sobran...

Comité de Ética



FCM
Facultad de
Ciencias Médicas



UNC
Universidad
Nacional
de Córdoba

"2016 - Año del Bicentenario de la Declaración de la Independencia Nacional"

SECRETARIA DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

Córdoba, 10 de Marzo de 2016.

Los miembros del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Fac. De Ciencias Médicas UNC, hemos revisado el manuscrito bajo el Título: **"Desarrollo de osteoblastos y fibroblastos derivados de células pluripotenciales inducidas combinados con melatonina para lograr regeneración periodontal"**, en la reunión plenaria del día de la fecha.

De la evaluación general del mismo se evidencia que se han respetado las normas establecidas en el reglamento, y por lo tanto se da por **APROBADO** este estudio.

Sin otro particular, saludamos a Ud. muy atentamente.

Las actuaciones de este Comité se limitan a la evaluación de las características relacionadas estrictamente al cuidado y uso de animales de experimentación vertidas en el presente Proyecto. La originalidad y pertinencia del mismo quedan fuera de la competencia de este Comité y por lo tanto no son considerados en esta instancia.

Dra. Cristina B. López

Dr. Arnaldo Mangeaud

Dra. Ana Carolina Martini

Dra. Nori Tolosa de Talamoni

Dra. Vilma Campana

Dra. Marina Ponzio

Índice

Abreviaturas	1
Resumen.....	4
Summary	5
Introducción	6
Marco Teórico.....	8
1. Conceptos básicos de estrés oxidativo	8
2. Osteoinmunología y estrés oxidativo	13
3. Periodontitis	18
3.1. Introducción a la periodontitis y epidemiología.....	18
3.2. Etiopatogenia	21
3.3. Apoptosis	26
3.4. Terapias periodontales de modulación de la inflamación e ingeniería de tejidos	28
3.5. Células Madre Mesenquimales gingivales (GMSCs)	29
3.5 Las GMSCs en la periodoncia regenerativa.....	34
4. Melatonina	36
4.1 Síntesis pineal	36
4.2 Síntesis extrapineal.....	39
4.3 Receptores de Melatonina	39
4.4 Acciones protectoras de Melatonina	40
4.5 Melatonina inmunomoduladora	40
4.6 Melatonina en el ambiente periodontal	43
4.7 Melatonina modula la homeostasis ósea	45
5. Trabajos previos de nuestro laboratorio.....	47
Hipótesis.....	49
Objetivos.....	50
Objetivo General	50
Objetivos específicos	50
Materiales y Métodos.....	51
1. Animales de laboratorio	51
Consideraciones bioéticas	51
2. Tejido gingival para la realización del cultivo primario de GMSCs.....	51
3. Cultivos celulares	53
4. Análisis de la expresión de genes característicos de MSCs	54
4.1. Extracción de ARNm	54
4.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc). Reacción de transcripción inversa (RT) .	55

Indice

4.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	56
5. Ensayo de la capacidad de Unidades formadoras de colonias	56
6. Ensayo de la herida	56
7. Ensayo de XTT	57
Modelo de daño celular relacionado al estrés oxidativo	58
8. Determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria	58
9. Técnica de rojo neutro.....	58
10. Técnica de cristal violeta.....	59
11. Determinación del daño celular a diferentes tiempos	59
12. Determinación de la concentración de anión superóxido.....	59
13. Determinación de toxicidad de melatonina.....	60
14. Técnica inmunohistoquímica TUNEL	60
15. Protocolo de diferenciación osteogénica.....	61
16. Validación de la técnica de Alizarina Roja	62
17. Técnica de alizarina roja	63
18. Medición de actividad de fosfatasa alcalina.....	63
19. Análisis estadístico.....	64
Resultados	65
Capítulo I: Obtención de cultivos primarios de GMSCs de encía de rata.....	65
1.1. Establecimiento de cultivo primario de GMSCs.....	65
1.2. Caracterización de las GMSCs.....	65
1.3. Capacidad migratoria y proliferativa de las GMSCs	66
Capítulo II: Efecto protector de la Melatonina.....	69
2.1. Determinación de la concentración y tiempo de acción citotóxico de BSO y GLUT como modelo de daño celular	69
2.2. Determinación de la producción de anión superóxido en el modelo de daño celular ..	72
2.3. Determinación del rol de la melatonina en el modelo de daño celular	72
2.3.1. Efectos citotóxicos de la melatonina en GMSCs	72
2.3.2. Rol de la melatonina en la viabilidad celular	73
2.3.3. Efectos antioxidantes y antiapoptóticos de la Melatonina	74
2.3.5. Rol clonogénico y migratorio de la melatonina sobre las GMSCs sometidas a daño celular.....	77
Capítulo III: La Melatonina y su efecto osteodiferenciador	79
3.1. Diferenciación osteogénica <i>in vitro</i> de GMSCs.....	79
3.2. Características funcionales relevantes de células diferenciadas al linaje osteogénico .	84
Capítulo IV: Relación entre el daño celular y los diferentes estadios de diferenciación osteogénico.....	87
4.1. Viabilidad y diferenciación.....	87

Indice

Discusión.....	92
Obtención y caracterización de la subpoblación de células madre gingivales.....	92
Protección de la melatonina ante un modelo de daño celular relacionado al estrés oxidativo	93
Efecto osteodiferenciador de la melatonina	99
Influencia del daño celular a las GMSCs en diferentes momentos del protocolo de diferenciación osteogénica.....	100
Conclusiones	104
Perspectivas futuras.....	106
Bibliografía	107
Anexo I: Producción científica y docente originada de esta tesis	127
Publicaciones en revistas con referato	127
Participación de reuniones científicas	127
Actividad docente:	128

Índice de figuras

FIGURA 1 REPRESENTACIÓN DE LAS REACCIONES QUÍMICAS DEL COMPLEJO IV MITOCONDRIAL.....	9
FIGURA 2 ESQUEMA DE UNA MITOCONDRIA.	11
FIGURA 3 REPRESENTACIÓN DE LA FÓRMULA QUÍMICA DEL GLUTATIÓN REDUCIDO.....	12
FIGURA 4 SISTEMA ÓXIDO-REDUCCIÓN CELULAR EN RELACIÓN AL METABOLISMO.	12
FIGURA 5 REMODELADO ÓSEO FISIOLÓGICO.....	15
FIGURA 6 IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE INDIVIDUOS CON PERIODONTITIS.. ..	19
FIGURA 7 PREVALENCIA DE PERIODONTITIS EN EE.UU.	20
FIGURA 8 ANATOMÍA DEL PERIODONTO.	22
FIGURA 9 ESQUEMA DE LA PERIODONTITIS Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA.....	22
FIGURA 10 ESQUEMA DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA PERIODONTITIS.	24
FIGURA 11 MODELO CONTEMPORÁNEO DE PERIODONTITIS.	26
FIGURA 12 ASPECTO CLÍNICO DE UN DEFECTO ÓSEO PERIODONTAL.....	28
FIGURA 13 PILARES DE LA REGENERACIÓN TISULAR.	29
FIGURA 14 JERARQUÍA DE LAS SUBPOBLACIONES MADRE.	30
FIGURA 15 MSCS EN EL AMBIENTE BUCAL.....	31
FIGURA 16 GMSCS DE TEJIDO GINGIVAL HUMANO DIFERENCIADAS	32
FIGURA 17 SÍNTESIS DE MELATONINA.....	37
FIGURA 18 SISTEMA FOTONEUROENDÓCRINO	38
FIGURA 19 EFECTOS DE LA MELATONINA Y DE LAS GMSCS SOBRE CÉLULAS INMUNES Y ÓSEAS.....	46
FIGURA 20 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL MECANISMO PROPUESTO PARA EL MODELO DE DAÑO CELULAR RELACIONADO AL ESTRÉS OXIDATIVO ENDÓGENO DE BSO+GLUTAMATO SOBRE LAS GMSCS.	48
FIGURA 21 SECUENCIA QUIRÚRGICA PARA LA OBTENCIÓN DE ENCÍA DE RATA52	
FIGURA 22 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE ALIZARINA ROJA.	63
FIGURA 23. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE CULTIVOS PRIMARIOS DE GMSCS DERIVADAS DE RATA.	65

FIGURA 24 GEL REPRESENTATIVO DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LAS GMSCS.....	66
FIGURA 25 CANTIDAD DE UFCS.....	66
FIGURA 26 IMÁGENES REPRESENTATIVAS DEL ENSAYO DE LA HERIDA.....	67
FIGURA 27 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MEDIDA CON XTT SOBRE LAS GMSCS.....	68
FIGURA 28 IMÁGENES REPRESENTATIVAS DEL DAÑO CELULAR PROVOCADO POR BSO + GLUT.....	70
FIGURA 29 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE BSO Y GLUT.....	71
FIGURA 30 VIABILIDAD CELULAR ANTE EL EFECTO DE BSO + GLUT 300 μ M A DIFERENTES TIEMPOS.....	71
FIGURA 31 DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ANIÓN SUPERÓXIDO ANTE EL ESTÍMULO DE BSO + GLUT.....	72
FIGURA 32. CURVA DE VIABILIDAD DE MELATONINA SOBRE LAS GMSCS.....	73
FIGURA 33 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR ANTE LA MELATONINA Y EL DAÑO CELULAR.....	74
FIGURA 34 PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO ANTE DAÑO CELULAR Y EN PRESENCIA DE MELATONINA.....	75
FIGURA 35 FIG. ACTIVIDAD ANTIAPOPTÓTICA DE LA MELATONINA EN CULTIVOS GMSCS ANTE EL DAÑO CELULAR.....	76
FIGURA 36 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE UFCS ANTE DAÑO CELULAR.....	77
FIGURA 37 CAPACIDAD MOTIL DE LA CÉLULA ANTE EL DAÑO CELULAR, EN PRESENCIA DE MELATONINA.....	78
FIGURA 38 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE GMSCS.....	80
FIGURA 39 EL ROL DE LA MELATONINA EN LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.....	82
FIGURA 40 PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS GMSCS SOMETIDAS A DIFERENTES MEDIOS DETECTADOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	83
FIGURA 41 PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA.....	83
FIGURA 42 GRÁFICO REPRESENTATIVO DE LA RELACIÓN INVERSA ENTRE LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA Y LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS.....	84
FIGURA 43 CAPACIDAD DE UFCS ANTE MEDIOS INDUCTORES OSTEOGÉNICOS Y MELATONINA.....	85
FIGURA 44 CAPACIDAD MIGRATORIA DE CULTIVOS DIFERENCIADOS CON LOS DIFERENTES MEDIOS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE MELATONINA.....	86

FIGURA 45 GMSCS EN EL MODELO DE DAÑO CELULAR Y EN PRESENCIA O NO DE MELATONINA.....	88
FIGURA 46 GMSCS EN EL MODELO DE DAÑO CELULAR, ANTE MEDIOS DE INDUCCIÓN OSTEOGÉNICO Y EN PRESENCIA O NO DE MELATONINA.....	89
FIGURA 47 RELACIÓN ENTRE EL MOMENTO DEL DAÑO CELULAR Y LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.....	90
FIGURA 48 PORCENTAJE DE DIFERENCIACIÓN CON LAS DROGAS INDIVIDUALES.	91
FIGURA 49 MECANISMO PROPUESTO MEDIANTE EL QUE ACTÚA LA MELATONINA SOBRE LAS GMSCS ESTUDIADAS EN ESTE TRABAJO.....	103

Abreviaturas

ATP: Adenosín Trifosfato

AANAT: Arilalquilamina N-acetiltransferasa.

AR: Alizarina roja.

BMSCs: Células mesenquimales derivadas de médula ósea (por sus siglas en inglés, Bone marrow mesenchymal stem cells).

BSO: DL-Butionina-sulfoximina.

CDs: células dendríticas

CD: Cluster de diferenciación.

CFU-GM: unidades formadoras de colonias monocitoides y granulocíticas (por sus siglas en inglés, Colony forming units-Granulocitic and mielocitic).

COX: Ciclooxygenasa.

CTE: Cadena transportadora de electrones.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DPMSCs: Células mesenquimales de pulpa dental (por sus siglas en inglés, Dental pulp mesenchymal Stem Cells of dental pulp).

e-: Electrón

EO: Estrés oxidativo.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico (por sus siglas en inglés, fibroblast growth factor)

FAL: Fosfatasa alcalina.

FB: Fibroblastos.

GLUT: Glutamato.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas y mielocíticas (por sus siglas en inglés, granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor).

GMSCs: MSCs derivadas de encía (por sus siglas en inglés, Gingival mesenchymal stem cells).

GSH: Glutación reducido

Abreviaturas

GSSG: Glutati3n oxidado.

H₂O₂: Per3xido de hidr3geno.

HIOMT: Hidroxindol-O-metiltransferasa.

IL-1 β : Interleuquina 1 β .

IL-2: Interleuquina 2.

IL-6: Interleuquina 6.

IL-8: Interleuquina 8.

IL-10: Interleuquina 10.

IL-12: Interleuquina 12

IL-17: Interleuquina 17

IL-18: Interleuquina 18

IL- 23: Interleuquina 23

ISCT: Sociedad internacional para terapia celular (por sus siglas en ingl3s, International society for cellular therapy).

LB: Linfocito B.

LP: Ligamento periodontal.

LT h 1: Linfocito T cooperadores 1 (por sus siglas en ingl3s, Linfocito T helper 1).

LT h 17: Linfocito T cooperadores 17 (por sus siglas en ingl3s, Linfocito T helper 17).

LT h 2: Linfocito T cooperadores 2 (por sus siglas en ingl3s, Linfocito T helper 2).

LT regs: Linfocito T reguladores

LT: Linfocito T.

MEL: Melatonina.

MMPs: Metaloproteinasas de la matriz (Matrix metalloproteinase, por sus siglas en ingl3s)

MSCs: C3lulas madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells, por sus siglas en ingl3s).

MT1: Receptor de melatonina 1 (Melatonin Receptor 1, por sus siglas en ingl3s)

MT2: Receptor de melatonina 2 (Melatonin Receptor 2, por sus siglas en ingl3s)

Abreviaturas

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidada

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida

NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

O⁻²: Anión superóxido.

OB: Osteoblasto.

OC: Osteoclasto.

OS-: Medio basal o no osteogénico.

OS+: Medio osteogénico.

OT: Osteocito.

PAMP: patrones asociados a patógenos.

PBS: Buffer fosfato salino (Phosphate saline buffer, por sus siglas en inglés).

PMN: Neutrófilos polimorfonucleares.

RANK: Receptor activador del factor nuclear κ B. (por sus siglas en inglés, receptor activator for Nuclear Factor κ B)

RANKL: Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B. (por sus siglas en inglés, Receptor activator for Nuclear Factor κ B Ligand)

ROS: Especies reactivas de oxígeno. (por sus siglas en inglés, Reactive oxygen species).

SCAP: células mesenquimales de papila apical. (por sus siglas en inglés, Stem cells of apical papilla).

SHED: Células mesenquimales derivadas de dientes primarios. (por sus siglas en inglés, Stem cells of human exfoliated deciduous teeth).

TGF β : Factor transformante de crecimiento β . (por sus siglas en inglés, transforming growth factor β)

TNF α : Factor de necrosis tumoral α (por sus siglas en inglés, tumor necrosis factor α).

TRAP: fosfatasa ácida tartrato resistente (por sus siglas en inglés, tartrate resistant acid phosphatase)

Resumen

La melatonina es una hormona secretada principalmente por la glándula pineal, cuya función endócrina es la de regular los ritmos circadianos. Sin embargo, se han identificado enzimas de biosíntesis de la misma en diversas partes del organismo, como en la encía y en las glándulas salivales, donde cumpliría funciones paracrinas de protección del ambiente periodontal, debido a sus acciones antioxidantes y antiapoptóticas. La melatonina a su vez participa en la diferenciación osteogénica mediada por el receptor MT2 en Células Madre Mesenquimales (MSCs). Dichas células son una población celular heterogénea residente en el estroma de diversos tejidos. Sus propiedades funcionales incluyen la inmunomodulación, la migración, la secreción de factores parácrinos, y la capacidad de diferenciar a diversos linajes, entre ellos el osteogénico. En patologías como la periodontitis, donde está implicado el aumento de estrés oxidativo (EO) y la resorción ósea, las MSCs derivadas de la encía (GMSCs) y la melatonina, son relevantes para la implementación de terapias regenerativas. Sin embargo, aún se dista de conocer en profundidad sobre la combinación de ambas para lograr una regeneración osteogénica. En este trabajo, se propuso profundizar el estudio el efecto antioxidante, antiapoptótico y diferenciador de la melatonina sobre un sistema *in vitro* de GMSCs. La melatonina demostró aumentar la diferenciación osteogénica y la protección de las GMSCs, en un modelo de daño celular relacionado al estrés oxidativo, devolviendo los valores de anión superóxido, de viabilidad y de apoptosis a los niveles basales. Más aún, la melatonina fue más efectiva en la protección de GMSCs por la producción de células osteogénicas ante el estrés oxidativo. Se aportan evidencias que apoyan el uso de una terapia regenerativa novedosa que incluye a esta subpoblación madre y a la melatonina.

PALABRAS CLAVE: Periodontitis (PD), Melatonina, Diferenciación Osteogénica, Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido gingival (GMSCs)

Summary

Melatonin is a hormone secreted mainly by the pineal gland, whose endocrine function is to regulate circadian rhythms. However, biosynthetic enzymes of this hormone have been identified in various parts of the body, as in gums and salivary glands, where it would perform paracrine functions to protect the periodontal zone due to its antioxidant and antiapoptotic action. Melatonin also participates in MT2 receptors mediated by osteoblastic differentiation in mesenchymal stem cells. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are a heterogeneous cell population residing in the stroma of various tissues. Its functional properties include immunomodulation, migration, secretion of paracrine factors, and the ability to differentiate between various lineages, including osteogenic. In pathologies such as periodontitis, where increased oxidative stress (OS) and bone resorption are involved, MSCs derived from gingiva (GMSC) and melatonin are important for the implementation of regenerative therapies. However, it is still far from knowing in depth about its combination to achieve osteogenic regeneration. In this work, it was proposed to study the antioxidant, antiapoptotic and differentiating effect of melatonin on an *in vitro* GMSC system. Melatonin has shown to increase osteogenic differentiation and protect GMSCs in a model of cellular damage related to oxidative stress, returning superoxide anions, viability, and apoptosis values to baseline levels. Furthermore, melatonin was more effective in protecting GMSCs than osteogenic cells against oxidative stress. Evidence is provided for the study of a novel regenerative therapy that includes mother subpopulation and melatonin.

KEY WORDS: Periodontitis, Melatonin, osteogenic differentiation, gingival mesenchymal stem cells (GMSCs)

Introducción

La salud periodontal es un delicado equilibrio de su ambiente, que presenta la confluencia del estímulo de una flora simbiótica, representada por cocos y bacilos aerobios y un infiltrado controlado de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) ¹. La aparición de la periodontitis implica la disrupción de este delicado equilibrio, entre la microbiota simbiótica y la respuesta inmune del huésped. Ante un aumento de biomasa bacteriana supragingival, se desencadena la gingivitis. Si la lesión avanza, propiciada por factores ambientales, genéticos y epigenéticos, puede derivar en una periodontitis. Esta es una enfermedad inflamatoria multifactorial, que tiene afectación sistémica.

En individuos que padecen de diabetes tipo dos, las citoquinas proinflamatorias que se producen durante la periodontitis, dificultan el control glucémico ². En mujeres gestantes, se documentó la asociación de periodontitis al parto prematuro y al bajo peso del infante al nacer ³⁻⁵.

Durante la periodontitis, el intenso infiltrado de PMN liberará moléculas inflamatorias, entre ellas, un exceso de especies de oxígeno reactivas (ROS). A su vez, puede manifestarse un estrés oxidativo (EO) endógeno, por la disminución de los niveles de glutatión (GSH), en las células del ambiente periodontal ⁶.

Las ROS y el EO están relacionados a la periodontitis. Por este hecho, en el modelo contemporáneo de la periodontitis, se menciona a las ROS como agentes proinflamatorios ⁷. Además, se ha postulado que las ROS pueden activar los osteoclastos (OC) directamente ⁸, o bien, con intermediación del factor de transcripción NFκB ⁹. A partir de lo ya mencionado, se encuentra, como consecuencia principal, la pérdida de inserción característica de la periodontitis. Esta pérdida, en general, se manifiesta con la aparición de defectos óseos, por lo cual, se buscan alternativas regenerativas para este periodonto perdido. Las células madre mesenquimales derivadas de la encía (GMSCs), se posicionan como una alternativa terapéutica regenerativa. Dicha alternativa, hasta el momento, se encuentra poco explorada. A su vez, el desarrollo de un modelo de daño celular provocado por la depleción del glutatión, en dichas GMSCs, aún no ha sido estudiado.

Para lograr un abordaje integral desde una perspectiva salud-enfermedad, que involucre un seguimiento de la recuperación de la enfermedad del periodonto, se buscan alternativas que impliquen una matriz de efectividad y de predictibilidad. De esta manera, se proporcionará un ambiente periodontal promotor de salud del mismo.

La melatonina, es una hormona conocida principalmente por sincronizar los ritmos circadianos y por ejercer sus funciones fisiológicas a través de las acciones de dos receptores acoplados a proteínas G: MT1 y MT2. La liberación circadiana de melatonina por la noche, desde la glándula pineal, se activa mediante receptores de melatonina en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, sincronizando así, la fisiología y el comportamiento de los animales con el ciclo nocturno-diurno ¹⁰. La indolamina, sincronizará este ciclo al ritmo circadiano cuando hay desórdenes tales como la descompensación horaria o el *jet lag*, la depresión y la degeneración macular relacionada a la edad, entre otros ¹¹.

A su vez, es posible de afirmar que la melatonina es, mediante propiedades antioxidantes, protectora celular. Dicha protección es llevada a cabo de forma tanto directa como indirecta ¹². Actuará como antioxidante directo cuando remueva radicales libres de oxígeno ¹⁴, y a su vez estimulará la síntesis de enzimas que participan en la defensa antioxidante de la célula ^{15,16}. La melatonina se caracteriza, además, por su versatilidad, ya que es capaz de atravesar membranas biológicas por sus propiedades anfipáticas, y en especial, membranas mitocondriales ¹⁷.

En adición, la melatonina posee funciones en el anabolismo óseo debido a la diferenciación osteoblástica, mediada por los receptores de melatonina MT2 acoplados a proteínas G de membrana. Los mismos desencadenan, mediante la activación de las cascadas ERK1/2 -MEK5 en células madre, el compromiso hacia el linaje osteogénico ¹⁸.

A partir de lo mencionado anteriormente, numerosos estudios postulan el uso de melatonina para tratar enfermedades de la cavidad bucal tales como mucositis ¹⁹, osteonecrosis por bifosfonatos ²⁰ y periodontitis ²¹.

En el presente trabajo, se brindará un aporte sobre el conocimiento del aislamiento y del cultivo de GMSCs para estudiar las propiedades protectoras y osteodiferenciadoras de la melatonina, en un modelo de daño celular relacionado al estrés oxidativo. Dicho trabajo de tesis sustentará futuras líneas de investigación para instaurar dicha indolamina como tratamiento de la periodontitis, en la prevención y como coadjuvante en las terapias periodontales no quirúrgicas y regenerativas.

Marco Teórico

1. Conceptos básicos de estrés oxidativo

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que poseen un electrón desapareado o libre. Los mismos tienden a captar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula que lo cedió se denomina ROS, ya que queda con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que destruye las biomoléculas esenciales para las células⁶. El estudio del rol de radicales libres en sistemas biológicos, se remonta a 1956, con Harman²², quien introdujo un novedoso concepto sobre la similitud entre los ROS y la radiación ionizante. Cuando existe un desbalance entre los ROS y la capacidad antioxidante del organismo, se produce el EO.

Actualmente las ROS son asociadas a diversas funciones celulares. La concentración fisiológica de las mismas -estimada en el orden de los 3 billones de moléculas por día¹⁴, regula y promueve cascadas de señalizaciones involucradas en la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis²³⁻²⁵. Desde el comienzo de la vida en la Tierra, los organismos han estado expuestos tanto a ROS como a radiaciones ionizantes²⁶. El oxígeno molecular (O₂) comenzó a elevarse hace unos 2500 millones de años debido a bacterias fotosintéticas^{27,28}, resultando así en una presión altamente selectiva, en favor de organismos de metabolismo aeróbico²⁹. El O₂ es utilizado para la producción del 90 % a 95 % total del Adenosín Trifosfato (ATP) -la molécula de intercambio energético celular que genera. Las mitocondrias son centrales en dicho proceso de generación de ATP, dado que poseen la cadena transportadora de electrones (CTE). La CTE, está compuesta por una serie de complejos enzimáticos, el complejo I (Nicotinamida Adenina Dinucleótido [NADP] Ubiquinona Reductasa), el complejo II (Succinato Ubiquinona Reductasa), el complejo III (Ubiquinol Citocromo c Reductasa), y el complejo IV (Citocromo C Oxidasa)¹⁷ (Figura 2).

De acuerdo a la teoría quimiosmótica, el CTE convierte a la energía de óxido-reducción en un gradiente electroquímico de protones que forman el ATP a partir de Adenosín Difosfato y fosfato por la ATP sintasa³⁰. En consecuencia, todo el O₂ es reducido a agua por 4 e⁻ en el complejo IV. Sin embargo, un pequeño porcentaje de O₂ es reducido por uno, dos o tres electrones, generando las reacciones explicadas a continuación (Figura 1 y 2).

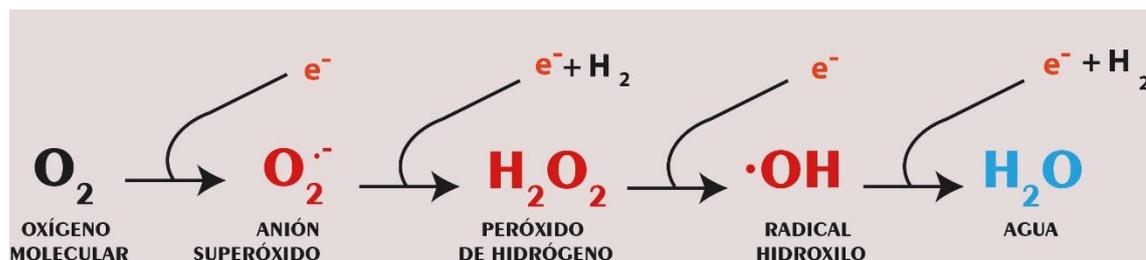


Figura 1. Representación de las reacciones químicas del complejo IV mitocondrial. La adición de electrones al O_2 resulta en la formación de diferentes ROS, hasta su estabilización, mediante la formación de agua con cuatro e^- . Ilustradora científica: Verónica M. Solá.

Las ROS comprenden, a su vez, especies que no son verdaderos radicales libres, pero que actúan como tales. Ejemplo de esto es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso ($HOCl$), ambos capaces de formar radicales libres verdaderos en el microambiente intra y extracelular (Figura 4).

El O_2 , que forma parte de las ROS, se forma por la unión de dos átomos de oxígeno cuyos orbitales se denotan $(1s)^2$, $(2s)^2$ y $(2p)^4$. Posee 16 electrones ($8 e^-$ por átomo), ocupando las capas atómicas, pero dichos e^- externos se encuentran desapareados. Hay 2 orbitales s en la capa 1, dos orbitales s en la capa 2 y los $8 e^-$ remanentes se encuentran en los orbitales p. En dicho orbital, $6 e^-$ están apareados con *spin* opuesto y los e^- externos ocupan orbitales individuales y, poseen *spin* paralelo. Esto resulta en una molécula que deben aparear sus e^- externos para lograr estabilidad electroquímica. Sin embargo, dado a que dichos e^- poseen restricción de *spin* inherente, no pueden aceptar pares electrónicos. Por lo tanto, no existirán $2 e^-$ aislados con *spines* paralelos. Esto resulta de gran importancia dada la relación entre el O_2 y las ROS derivados del mismo. En este sentido, el O_2 acepta de a un electrón.

El oxígeno de por sí no es dañino para las moléculas vecinas. Sus acciones perjudiciales derivan de su conversión a agentes tóxicos, especialmente el anión hidróxilo $\cdot OH$ y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$)^{31,32}. En un ambiente acuoso, el anión superóxido es rápidamente dismutado a H_2O_2 . Es por ello que, la formación de dicho anión trae apareado la formación de H_2O_2 . Dicho compuesto químico es altamente destructivo por su alta lipofilia. Esto permitirá que atraviese las membranas ricas en lípidos, así expandiendo el daño a través de las células por los radicales libres.

Otro peligro del H_2O_2 deviene de la reacción con metales tales como el cobre, el hierro, entre otros. O bien, con hemoproteínas para lograr el $\cdot OH$ ^{33,34}. Estas reacciones, son denominadas Haber-Weiss o Fenton.

El ión OH, por su parte, es muy inestable y reactivo, es por ello, que de forma instantánea interacciona con cualquier molécula próxima de su zona de producción. Como consecuencia, el OH tiene una vida media muy corta y su ‘campo de acción’ es muy limitado, por ende, el daño es circunscripto al área anteriormente explicitada.

Se estima que, del total del daño celular asociado a las ROS, la mayoría es originado por dicho radical ³⁵. El OH reacciona con proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos para producir ROO como intermediarios. Aunque los ROO sean menos reactivos que el OH, poseen una vida media relativamente larga, y, dañan moléculas a distancia. Dentro de los ROO, la mayor documentación se encuentra sobre las peroxidaciones de los ácidos poliinsaturados. La destrucción de los mismos en las membranas celulares y mitocondriales, siendo este el principal factor del deterioro funcional, ocasiona una eventual muerte celular. Los ROO pueden, a su vez, oxidar carbohidratos, proteínas y componentes sulfhidrilos de las hemoproteínas ³⁶.

La principal hipótesis que explica la toxicidad de las ROS es la reducción del O₂ a anión superóxido. La principal fuente de esta reacción es producida en la CTE, en la mitocondria (Figura 2). Además, la CTE es ubicua en la naturaleza, ya que se ha identificado a la misma en diferentes bacterias ³⁷.

Mientras que la CTE es eficiente en el manejo de los electrones, a través de sus sucesivos componentes (complejos I-V), algunos electrones se ‘filtran’ y reducen moléculas cercanas tales como O₂ a anión superóxido. La cantidad de anión superóxido está relacionada a la tensión de oxígeno, por ende, la cantidad de este anión se ve aumentada directamente proporcional al aumento de la concentración del O₂.

Bajo condiciones fisiológicas de niveles de O₂ con la CTE funcionando correctamente, se estima que entre el 1 y 3% del O₂ es convertido a anión superóxido.

Durante el evento de algún daño hacia alguno de los componentes de la CTE, la misma funcionaría subóptimamente, provocando una pérdida mayor de electrones, los cuales formarían más ROS. Esto ocurre en personas de edad mayor o durante exposición a toxinas. Otras fuentes de ROS incluyen enzimas, como la xantina oxidasa u, reacciones de auto oxidación y proteínas hemo ³⁸ (Figura 4).

El EO se relaciona con enfermedades inflamatorias, entre ellas, la periodontitis. Al respecto, Bullon *et al.*, ³⁹ destaca que ‘la naturaleza es frugal’, el estado de las células, y en particular, las mitocondrias, promueven la inflamación y la destrucción de tejidos. Es por ello, que el nuevo modelo que incluye a las ROS como factores necesarios para el desarrollo y la aparición de dicha enfermedad ⁷. Halliwell ^{40,41} propuso cuatro postulados

con respecto a la implicancia de EO en patologías similares a de Koch, y en patologías de origen bacteriano ⁴². En primer lugar, ROS o el daño oxidativo debe estar presente en el sitio de la injuria. En segundo lugar, la formación de ROS debe darse antes o simultáneamente a la injuria. En tercer lugar, la aplicación de ROS a tejidos en un nivel experimental, debe dar una reacción similar al daño observado en la enfermedad. Por último, al remover o inhibir la formación de ROS debería disminuir el daño tisular relacionado con su capacidad antioxidante *in vivo*. El principal antioxidante de las células es el glutatión, este es un tripéptido que puede presentarse en su forma oxidada (GSSG) o reducida (GSH) (Figura 3).

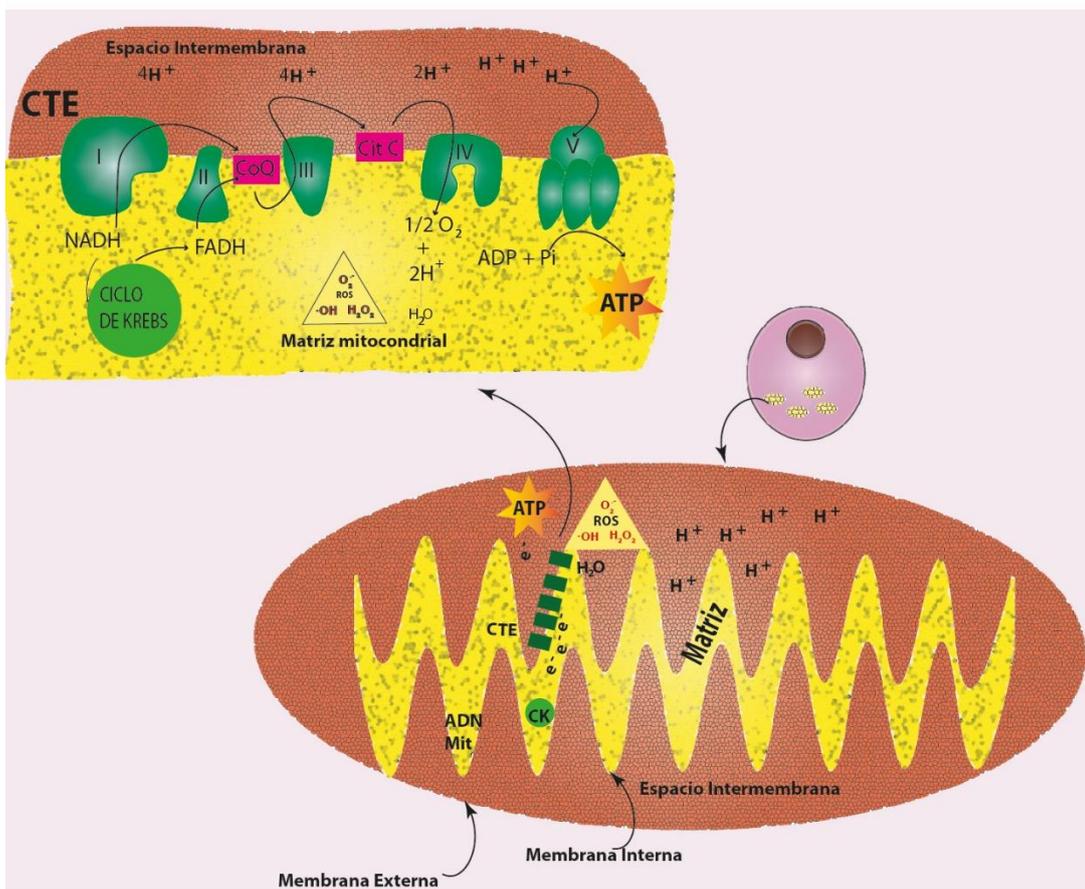


Figura 2. Esquema de una mitocondria. Se señalan los principales componentes y reacciones allí ocurridas. **CK:** Ciclo de Krebs. **CTE:** Cadena transportadora de electrones. **ATP:** Adenosín Trifosfato, principal 'moneda de cambio' energética de la célula. Ilustradora científica: Veronica M. Solá

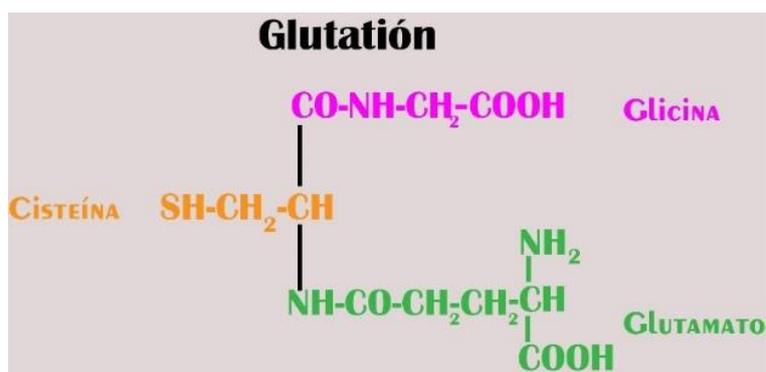


Figura 3. Representaci3n de la f3rmula qu3mica del glutati3n reducido. El glutati3n es un trip3ptido que consta de los amino3cidos cisteina, glicina y glutamato. Ilustradora cient3fica: Ver3nica M. Sol3. (Adaptado de Chapple *et. al* 2007).

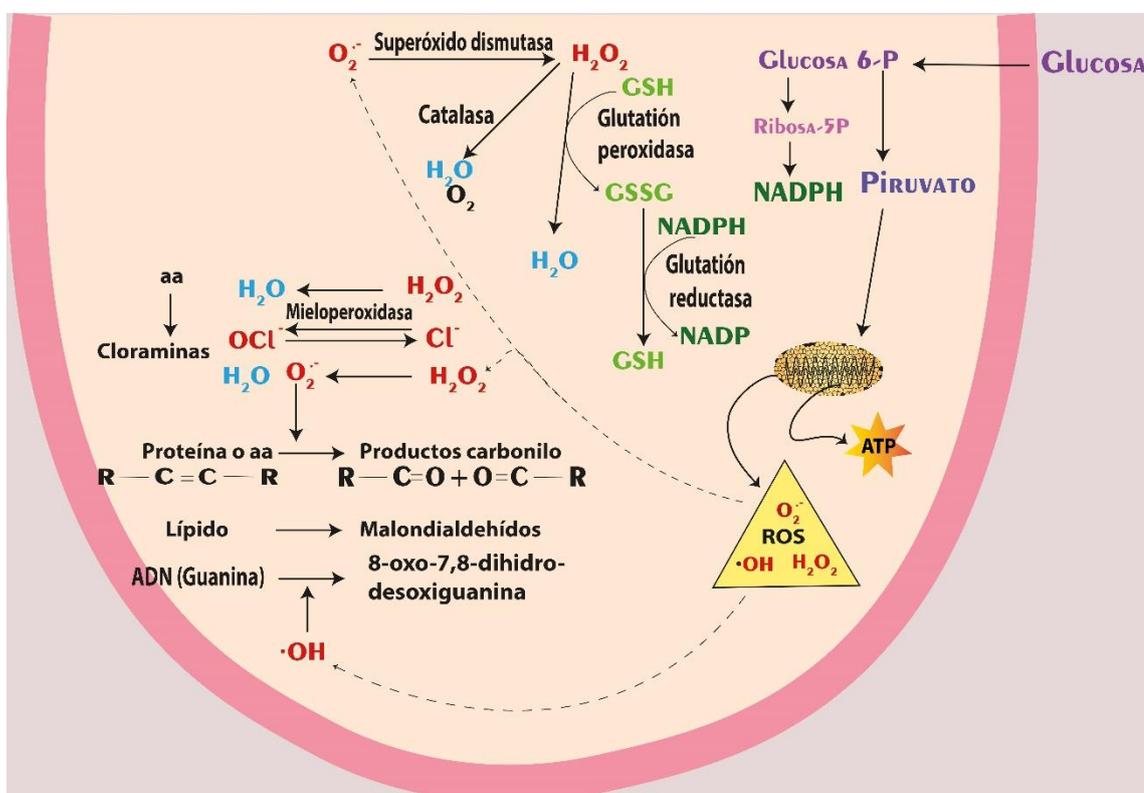


Figura 4. Sistema de 3xido-Reducci3n celular en relaci3n al metabolismo. La glucosa ingresa a la c3lula para ser oxidada hasta CO₂ y H₂O en la mitocondria o bien para seguir la v3a de las pentosas. Producto de la oxidaci3n total de la glucosa, se produce el ATP, e, indeseablemente, ROS. La v3a de las pentosas cobra relevancia en el sistema antioxidante celular al generar el cofactor NADPH el cual ser3 un equivalente de reducci3n en reacciones mediadas por la enzima glutati3n reductasa. El sistema antioxidante celular, est3 compuesto, entre otras enzimas, por la super3xido dismutasa, catalasa, glutati3n peroxidasa y reductasa. A su vez, se encuentra representado el sistema de mieloperoxidasa, presente en los PMN, la cual media reacciones de 3xido-reducci3n de an3n cloruro hacia an3n hipocloroso y del H₂O₂ hacia H₂O, y viceversa para neutralizar a los microorganismos. Estas reacciones son causantes del EO ex3geno. El EO end3geno, como se se3ala, proviene principalmente desde la reducci3n incompleta de una mol3cula de ox3geno en las mitocondrias, esto origina que se oxiden prote3nas, l3pidos y ADN. Las prote3nas se carbonilan. Los l3pidos (principalmente los de membrana), dan como producto el malondialdeh3do. El ADN, es da3ado principalmente por el i3n hidroxilo (OH) en la base nitrogenada guanina, la cual se oxida a 8 oxo, 7,8 dihidrodesoxiguanina. Ilustradora cient3fica: Ver3nica M. Sol3

2. Osteoinmunología y estrés oxidativo

El EO se ha asociado con diversas enfermedades que afectan prácticamente a todos los órganos del cuerpo. Interesantemente, dependiendo de su concentración, las ROS podían tener acciones benéficas o bien deletéreas para los diferentes tejidos.

Se sabe que el EO es clave en la respuesta inmune. La activación y el reclutamiento de las células involucradas en dicha respuesta llevan a la muerte de los patógenos. En este proceso, tiene un papel preponderante el estrés oxidativo. El mismo posee una función clave en los eventos de formación, más aun, de resorción ósea. Esto es de relevancia en cuanto a que la función ósea es fundamental para la homeostasis del organismo ⁴³.

El organismo humano posee en total 213 huesos. Los mismos comprenden cuatro tipos principales: largos, cortos, planos e irregulares. Los huesos largos incluyen las clavículas, húmeros, radio, fémures, tibias y falanges, entre otros. Los cortos son, por ejemplo, carpales y tarsales. Los huesos planos incluyen al cráneo, a la mandíbula, a la escápula y al esternón, entre otros. Los irregulares incluyen huesos como las vértebras, sacro y hioides ⁴⁴.

Los huesos planos se forman mediante osificación membranosa mientras que los largos surgen de una combinación de osificación endocondral y membranosa.

El hueso cortical es denso y sólido, rodea el espacio medular, mientras que el hueso medular posee un entramado de 'panal de abejas', localizándose entre medio de la médula ósea. Tanto el hueso cortical como el trabecular están compuestos por osteones.

El tejido óseo, es un tejido conectivo especializado y endurecido por cristales de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] resistente a las fuerzas mecánicas a las que es sometido. A su vez, el hueso debe de ser liviano, lo que permitiría la movilidad del cuerpo humano. De igual modo, protege órganos vitales y es la principal fuente de Ca^{2+} a la que recurre el organismo para mantener la homeostasis fosfocálcica ⁴⁴. Los huesos del organismo están comprendidos en su mayoría por huesos compactos (80%) y en una menor proporción (20%) en huesos esponjosos o trabeculados ⁴⁵. Poseen una estructura compleja consistente en una matriz mineralizada y no mineralizada (osteóide) y cinco tipos celulares principales. Estos son los osteoblastos, formadores de hueso, las células situadas en los bordes óseos, osteocitos, las células de resorción ósea, los osteoclastos y las células mesenquimales ⁴⁶.

El desarrollo y las actividades de estas células, así como también la comunicación entre las mismas, son claves para el desarrollo, la adaptación ósea, el modelado y la preservación ósea remodelada ⁴⁷.

Durante el modelado óseo la formación y la resorción son procesos que no están acoplados. El mismo es predominante durante los primeros años de vida, donde se produce la osificación endocondral, hasta producirse un pico de masa ósea y luego persiste en un bajo nivel durante la vida. El modelado modifica la forma del hueso o mejora la masa ósea, para adaptarse a las fuerzas mecánicas sin flexionarse o agrietarse, mientras que colabora con resistir a la deformación por el impacto de cargas. Entonces, regula el crecimiento del esqueleto y provee soporte a las fuerzas mecánicas durante la hematopoyesis y la función endócrina ⁴⁸.

Una vez alcanzado el crecimiento óseo, los huesos serán permanentemente sometidos a la remodelación ósea. En este proceso la resorción ósea esta acoplada a la formación de la misma. Este proceso es esencial para mantener y prolongar en el tiempo las propiedades mecánicas, ya que genera una adaptación de su microarquitectura consistente a los cambios ambientales de cargas ⁴⁷.

El estrés oxidativo, posee efectos deletéreos para la osteogénesis. Como se mencionará posteriormente, la respuesta inmune tiene gran relevancia en la generación de ROS. Dichos ROS, están envueltos en la homeostasis ósea, promoviendo la resorción del hueso ⁴³. La osteoclastogénesis inducida por la activación del activador del ligando del factor nuclear κ B ligando (RANKL), requiere la producción de ROS ⁴⁹. Más aun, la enzima glutatión peroxidasa, cuando se encuentra sobre expresada en osteoclastos, previene la osteoclastogénesis mediada por el RANKL ⁵⁰. Teniendo en cuenta lo anteriormente explicitado, se infiere que la resorción ósea está mediada por el EO que promueve la formación y la actividad osteoclástica.

Osteoblastos, Osteoclastos y la tríada RANK/RANKL/OPG

El equilibrio entre resorción y formación ósea es un objetivo a seguir por parte del organismo para mantener la integridad esquelética. Esto se lleva a cabo principalmente por dos células, osteoblastos y osteoclastos. Las células del linaje osteoblástico, es decir, las células madre mesenquimales, los preosteoblastos, los osteoblastos y los osteocitos, controlan la actividad osteoclástica incluyendo la fusión de células mononucleares, su actividad y apoptosis durante el remodelado óseo. Los osteoclastos, son células que

resorben al hueso y que regulan la función de los osteoblastos, por medio de la comunicación celular directa y por factores secretados en la matriz⁵¹. En ratones *knockout* de *c-fos* y factor estimulante de colonias (GM-CSF), la ausencia de osteoclastos deriva en una formación ósea defectuosa. Estos datos permiten ver que en el proceso de remodelado se sustenta lo esencial para poder mantener la integridad ósea^{44, 52}. Una constante comunicación entre osteoblastos y osteoclastos es esencial para mantener la sincronización entre formación y resorción ósea durante el remodelado óseo⁵³.

El remodelado comienza con la activación de las células latentes que bordean al hueso en respuesta a cambios en las cargas mecánicas. Las células madre mesenquimales y preosteoblastos incrementan la expresión en su superficie del activador del RANKL y GM-CSF.

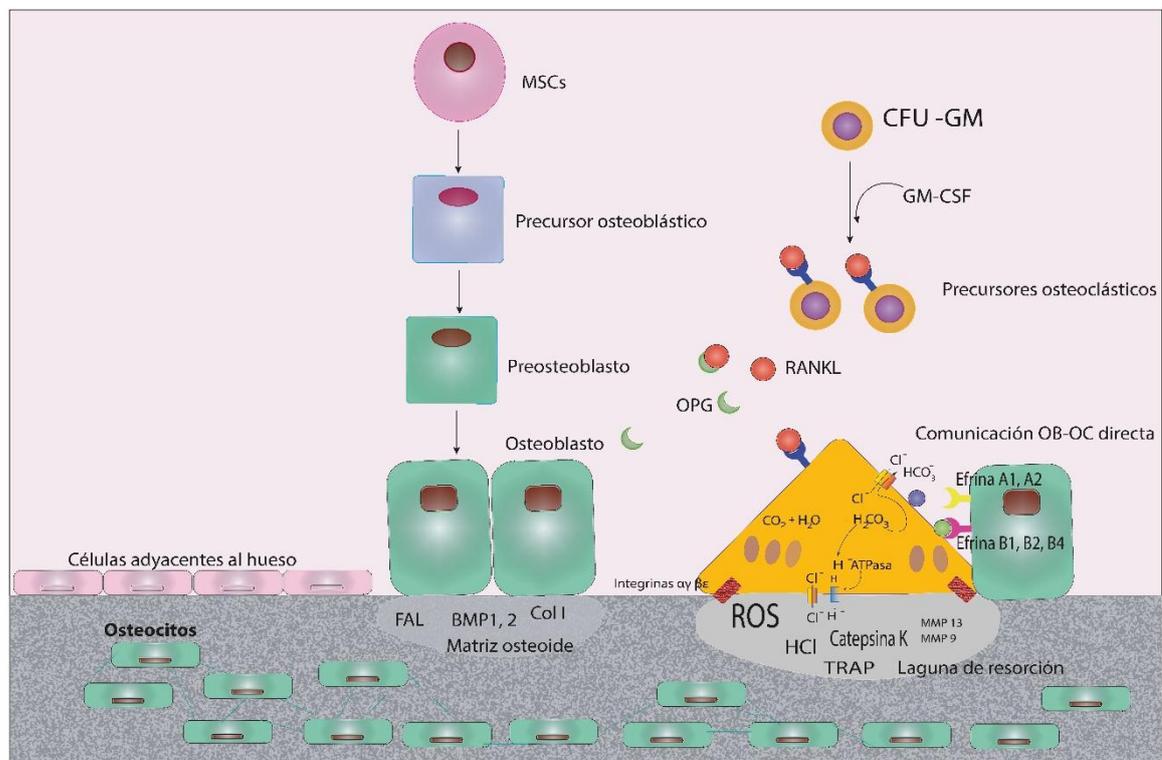


Figura 5. Remodelado óseo fisiológico. En el esquema se encuentra representado el proceso mediante el cual se produce la interacción de osteoblastos, osteoclastos y osteocitos y la comunicación mediada por citoquinas tales como RANKL, OPG y RANK. Dependiendo de la proporción RANKL/OPG el hueso puede resorberse o aposicionarse. Se observan las principales reacciones químicas llevadas a cabo por el osteoclasto para disolver el componente inorgánico del hueso a través de HCl y ROS. La fase orgánica se remueve mediante la producción de enzimas tales como la fosfatasa ácido tartrato resistente (TRAP), la Catepsina K, y metaloproteinasas 9 y 13. El osteoblasto a su vez, secreta proteínas como colágeno tipo I, BMP1 y 2, y fosfatasa alcalina. La comunicación del osteoblasto y el osteoclasto también se ejerce a través de proteínas denominadas efrinas, quienes se encuentran representadas en el gráfico. Los receptores se encuentran en los osteoblastos, y los ligandos en los osteoclastos. Las efrinas B principalmente suprimen la osteoclastogénesis. Mientras que las A producen la osteoblastogénesis. Ilustradora científica: Verónica M. Solá.

RANKL y GM-CSF promueven la liberación de progenitores inmaduros de osteoclastos, como monocitos mononucleares en la circulación y en el reclutamiento, en la superficie de resorción. También se unen a sus respectivos receptores de superficie en preosteoclastos [(i.e. RANKL al RANK y GM-CSF al receptor del factor estimulante de colonias)], para estimular la fusión de monocitos en preosteoclastos y eventualmente en células completamente diferenciadas como osteoclastos funcionales. La fase de activación osteoclástica dura aproximadamente diez días y precede a la resorción ósea, al retraimiento y a la formación ósea.

En la fase resortiva, los osteoclastos se adhieren a la matriz ósea subyacente y producen un anillo de actina que sella la zona delimitada por el borde en cepillo, el cual aísla el compartimento de la zona de resorción del microambiente. Los osteoclastos luego secretan fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), catepsina K y metaloproteinasas (MMP) 9 y 13, resultando en la disolución de su parte inorgánica y orgánica. La fase de resorción continúa por dos a tres semanas y finaliza con la apoptosis osteoclástica ⁵⁴.

Luego de aproximadamente cinco días, comienza una fase de reversión de la resorción ósea. Esto implica el final de la etapa resortiva y el comienzo de la etapa de formación ósea mediada por los osteoblastos. Los osteoclastos estimulan la formación ósea. Es por ello que secretan citoquinas, las cuales incluyen factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), y proteínas morfogenéticas óseas 2, 3, 4, 6 y 7 y factor de crecimiento plaquetario. A su vez, existen acciones dependientes del contacto estrecho entre osteoblastos y osteoclastos mediados por el grupo de proteínas denominadas efrinas ⁵⁵.

En la Figura 5 se aprecian las interacciones entre osteoclastos y osteoblastos a través del eje efrinas A/B. La efrina B2 se expresa en osteoclastos diferenciados y maduros, mientras que la efrina A2 se expresa en osteoclastos diferenciados tempranos ^{55,56}. La efrina B suprime la diferenciación del osteoclasto vía la supresión de FOS y NFACT1 y por otro lado promueve a osteogénesis. Por el contrario, la efrina A, vía la activación de la fosfolipasa C γ 2 estimula la diferenciación del osteoblasto.

La osteoinmunología investiga la interacción entre los sistemas esquelético e inmune al nivel molecular y celular ^{57,58}. La resorción ósea que sucede en la periodontitis, puede explicarse en términos osteoinmunológicos. Tal como se señaló previamente, aunque los microorganismos desempeñan un papel necesario para desencadenar la periodontitis ⁷, el verdadero causante es la respuesta inmune del hospedador, ante una presencia bacteriana, a esta flora periodontopática. Esta respuesta es la que, finalmente,

termina con la ruptura de la proporción osteoprotegerina (OPG):RANKL por parte de linfocitos activados y por el propio estrés oxidativo que activa, sin mediación de receptores, a los osteoclastos periodontales ^{6,59,60}.

La identificación y la caracterización del RANKL, de su ligando, del RANK y del receptor soluble señuelo denominado OPG, ha contribuido significativamente a la comprensión del mecanismo de remodelación ósea. Este mecanismo implica, la diferenciación de osteoclastos (osteoclastogénesis) y la activación de los mismos. Prueba de esto es que los ratones *knockout* de RANKL o RANK, no solo presentan fenotipos osteopetróticos, sino que a su vez carecen de ganglios linfáticos periféricos ⁵⁹. De este modo, se sustenta la idea que tanto RANKL, como RANK, desempeñan un rol fundamental en la osteoclastogénesis. También participan en el desarrollo inmune, como se muestra en los Th1 que expresan RANKL. Estas células luego actuarán sobre las células dendríticas para inducir su producción de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β e IL-6 ⁴⁴.

Asimismo, cuando la cantidad de RANKL producida en el microambiente que rodea a los preosteoclastos, es abundante y sobrepasa la producción de OPG -que actúa como antagonista natural de RANKL -, se une al RANK expresado en precursores de osteoclastos. De esta manera, el equilibrio del hueso se inclina hacia la resorción ósea. Cuando las células madre del tejido hematopoyético, CFU-GM, se diferencian hacia osteoclastos estimulados por el GM-CSF, se induce la expresión de RANK en CFU-GM. Posteriormente, el RANK, permanece expresado en células de linaje de osteoclastos a lo largo de la evolución, hasta diferenciarse terminalmente en células multinucleadas ⁶¹. Por ende, la unión de RANKL a RANK no solo provoca osteoclastogénesis, sino que promueve, además, la supervivencia y la activación de células osteoclásticas. Esto resultará en la resorción ósea. Por el contrario, cuando la concentración de OPG es mayor que el RANKL expresado, la unión de OPG a RANKL interrumpe su ligamiento a RANK. Esta inhibición mediada por OPG en la unión entre RANKL y RANK, disminuye la velocidad e intensidad de la osteoclastogénesis, y promueve la apoptosis de osteoclastos activados y diferenciados previamente. En conclusión, se reduce el proceso de resorción ósea ^{62,63}.

La comunicación entre los osteoblastos y los osteoclastos es esencial para el remodelado óseo y la calidad ósea, la cual se mide por la densidad mineral ósea. Las MSCs que rodean el hueso, son activadas en respuesta a varios estímulos, tales como cambios en la carga mecánica del mismo generando que las BMSCs de médula ósea y

pre-osteoblastos expresen en su superficie al RANKL y M-CSF. Los progenitores inmaduros, como las células mononucleares, comienzan a fusionarse, formando un osteoclasto maduro en respuesta al RANKL y al M-CSF. Como consecuencia, se producirá la resorción ósea mediante la fosfatasa ácida tartrato resistente y la catepsina K. A su vez, el osteoclasto puede ser activado directamente por ROS sin la mediación de receptores ⁶. Una vez producida la resorción ósea, comienza la formación ósea por parte de los osteoblastos quienes mediante la secreción de OPG, resulta en el impedimento de la formación de nuevos OC. A su vez, los OC activos entran en apoptosis.

La proporción OPG: RANKL es crucial en el proceso de remodelado óseo. Los OC pueden regular la función de los osteoblastos mediante la unión de membranas o la secreción de factores parácrinos en la matriz, tal como fue descrito anteriormente.

3. Periodontitis

3.1. Introducción a la periodontitis y epidemiología

Entre las patologías bucales de mayor prevalencia, se encuentran aquellas que afectan al periodonto, como la inflamación localizada de encía, la gingivitis -debido a la acumulación de biopelícula supragingival -, y la periodontitis. Esta última, se caracteriza por la destrucción de los tejidos periodontales de inserción, que, a su vez, representa una colección de enfermedades complejas de distintos grados y estadios. La última clasificación de estas enfermedades muestra la variación en la intensidad y la extensión de la periodontitis ⁶⁴. Los avances en las técnicas de biología molecular, en la proteómica, y en el área de la bacteriología, permitieron profundizar la etiopatogenia de la enfermedad ⁶⁴⁻⁶⁶. Tal es así que, actualmente dicha patología se considera el resultado de complejas interacciones dinámicas entre el sistema inflamatorio e inmune del hospedador, la microbiota subgingival y la modificación de factores ambientales, genéticos y epigenéticos ^{67, 68, 69, 70, 71}. Las características clínicas comprenden encías friables, sangrado al sondaje, recesiones gingivales, bolsas profundas rodeando los dientes (lo cual implica resorción ósea) y una eventual pérdida del elemento dentario. (Figura 6 y 9)

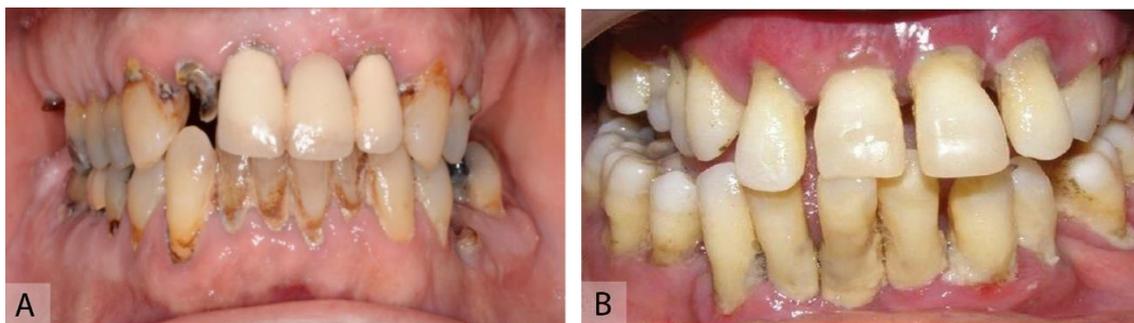


Figura 6. Imágenes representativas de individuos con periodontitis. A. Periodontitis en un individuo fumador crónico, en estadio III.⁶⁹ **B.** Periodontitis en un individuo en estadio III (71). Los estadios corresponden a la última clasificación de Enfermedades Periodontales ⁶³.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su publicación “*La Clasificación Internacional del Funcionamiento, de la Discapacidad y de la Salud*” delimitó las principales discapacidades físicas y mentales ⁷². Según esta publicación, funciones del sistema digestivo (apartado b510-b539 de dicha clasificación), tales como morder, succionar y masticar y manipular la comida en la boca, entre otras, se verían afectadas ante la pérdida de dientes que se dan en estadios avanzados de la periodontitis. La capacidad del habla, que se encuentra en el apartado b3100 (producción de la voz), también puede verse afectada ante la pérdida de uno o más dientes. En suma, ante una periodontitis en estadio III o IV o en un grado C, en donde se ve amenazada la permanencia de uno o más dientes, podría calificarse como una enfermedad promotora de la discapacidad según la OMS.

La periodontitis afecta a casi la mitad de los individuos adultos en el Reino Unido y Estados Unidos, y al 60% de los mayores de 65 años ^{73,74} (Figura 7). En Latinoamérica, los porcentajes resultan similares o aumentados ⁷⁵. En Argentina, Romanelli *et al.*, utilizó el índice periodontal comunitario, en donde se miden solo algunos dientes, y reportó que en los pacientes mayores de 40 años el porcentaje periodontitis es del 25% ⁷⁶.

En cuanto al aspecto económico, se estima que el 70% de unos 416 millones de dólares anuales del total de las enfermedades dentales, son para tratar la periodontitis y sus secuelas. En el Reino Unido, de 3 a 4 millones de individuos, aproximadamente el 5% de la población, sufre de periodontitis severa y se estima en un costo de 2 mil millones de libras para el Servicio Nacional de Salud ⁷⁷.

En conclusión, la periodontitis es un gran problema de salud a nivel mundial, afectando así a una parte importante de la población. Las consecuencias de la misma pueden resultar en inhabilitaciones en diversos aspectos de funciones relacionadas con la cavidad bucal, sumado al gasto que representa.

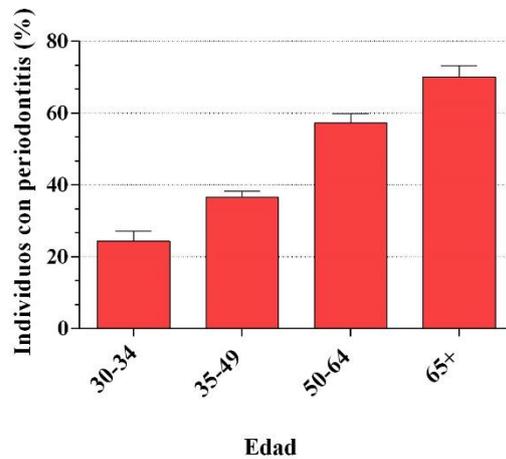


Figura 7. Prevalencia de periodontitis en EE.UU. Estimaciones combinadas de formas de la enfermedad (leve, moderada y grave). Gráfico de elaboración propia adaptado de Eke *et al.* 2012 ⁴⁴.

3.2. Etiopatogenia

En el modelo actual de enfermedad periodontal, los patógenos periodontales son necesarios para el inicio de la enfermedad. No obstante, la extensión y la gravedad de la destrucción del tejido, depende de la interacción huésped-microbiota tal como se detallará a continuación.

La principal función del periodonto es la de unir el diente al tejido óseo de los maxilares y en mantener la integridad en la superficie mucosa masticatoria.

El periodonto (peri=alrededor, odontos=diente) está compuesto por el periodonto de protección, el cual comprende a la encía y por el periodonto de inserción que comprende los siguientes tejidos: cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar (Figura 8).

La encía, a su vez, se divide en encía libre e insertada. La encía libre es la que circuncida al cuello de los dientes y da lugar a un surco que se forma entre la misma y el diente. La insertada se encuentra firmemente adherida a los procesos alveolares y clínicamente presenta un punteado 'en cascara de naranja'

Los tejidos periodontales, son comprendidos como un sector con gran cantidad de especies microbianas, lo cual implica una sofisticada interacción entre las bacterias y el hospedador ⁷⁸. En adición, el ambiente bucal es el único lugar donde el tejido óseo se comunica directamente con el ambiente externo, mediante los dientes ⁸⁰.

Normalmente, en el surco gingival hay PMN en constante migración a través del epitelio de unión (Figuras 8 y 10).

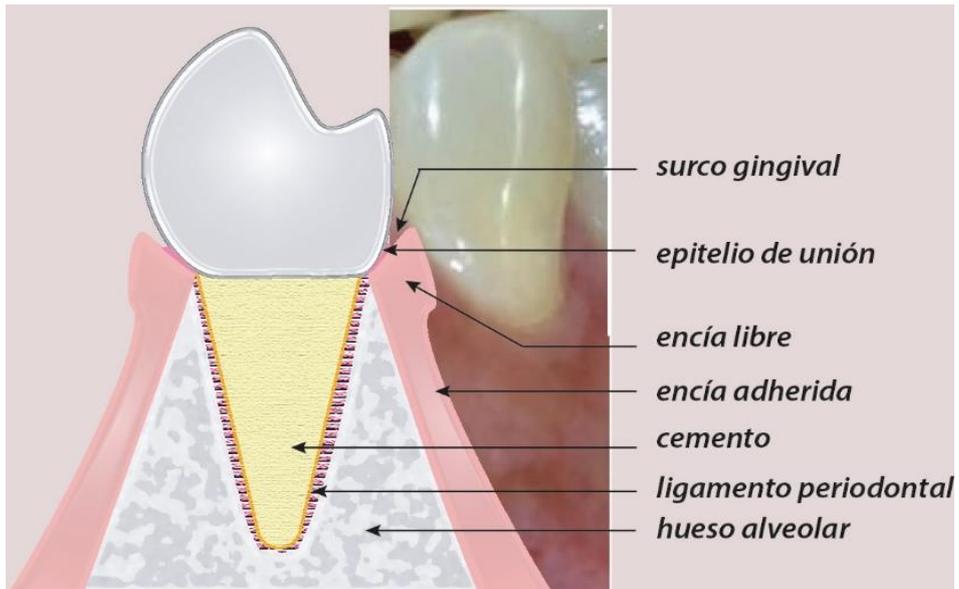


Figura 8. Anatomía del periodonto. Esquema del periodonto de protección e inserción correlacionado con una imagen clínica del periodonto de protección. Ilustradora científica: Verónica M. Solá

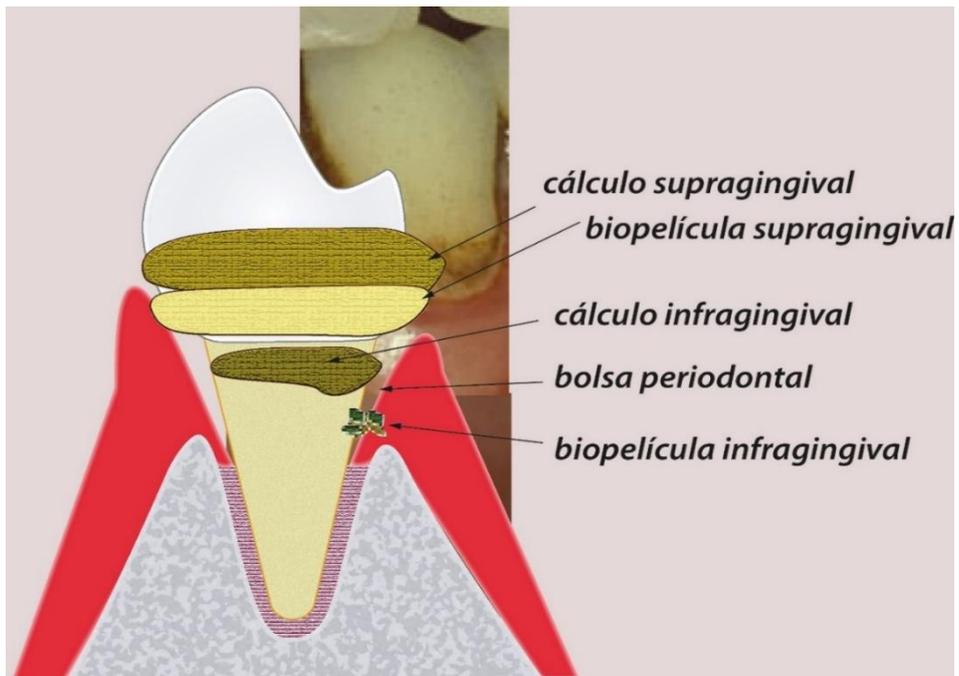


Figura 9. Esquema de la periodontitis y su correlación clínica. Se aprecia el depósito de biopelícula y cálculo tanto supra como infragingival. La bolsa periodontal resulta de un surco gingival profundizado por el proceso patológico de la periodontitis. Ilustradora científica: Verónica M. Solá

La microbiota periodontal es generalmente de naturaleza comensal y su relación con el huésped se encuentra en un estado de homeostasis o simbiosis. No obstante, como resultado del aumento de las concentraciones de mediadores de la inflamación y como producto de la descomposición del tejido conectivo en el líquido crevicular gingival (por ejemplo, péptidos de colágeno), el entorno del surco gingival puede sufrir modificaciones. Las mismas proporcionan un ambiente adecuado para el crecimiento excesivo de patógenos periodontales dentro de la biopelícula subgingival. Si la respuesta inflamatoria del hospedador es suficiente, sumado a influencias genéticas y ambientales favorables, la lesión puede ser detenida como gingivitis y no progresa, aunque madurará como una lesión inmunoinflamatoria estable ⁸⁰. Por otro lado, si el huésped y las respuestas inflamatorias no estabilizan la lesión, y el individuo es genéticamente susceptible, e influido por factores ambientales desfavorables como por ejemplo exceso de estrés oxidativo, la afección progresará. De este modo, se dará lugar a la manifestación clínica que tendrá como consecuente la pérdida de tejidos de inserción ⁸¹ (Figura 9).

Diferentes autores proponen, que el entorno cambiante de la bolsa periodontal, promueve la proliferación de bacterias responsables del cambio como respuesta del hospedador y no que son los microorganismos quienes determinan el resultado final de las interacciones hospedador-parásito. ^{82,83}. El microbioma disbiótico localizado en el esmalte -debajo del margen gingival - inicia la inmunidad innata, así estimulando a las células del surco de las células epiteliales, fibroblastos de ligamentos periodontales, fibroblastos gingivales y células dendríticas. De esta manera, las diferentes células producen mediadores de la inflamación en respuesta al lipopolisacárido bacteriano a través de los receptores tipo *toll*. Las células residentes ubicadas en el tejido conectivo y en el hueso alveolar producen inflamación y citoquinas. Esto incluye en el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), 1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 y en el RANKL. Ambos, por un lado, estimularán la hidrólisis de diferentes componentes del tejido conectivo mediado por metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y, por otro lado, el RANKL estimulará la diferenciación osteoclástica por parte de los monocitos.

La activación de las células B y T inicia en la inmunidad adaptativa. En esta etapa, el tejido conectivo se infiltrará por linfocitos con predominancia de células B, en detrimento de células T ⁸⁴. Las células T producirán TNF-, RANKL e IL-17 que conducirá a un aumento de la osteoclastogénesis y resorción ósea (Figura 10 y 19). Esto dará como resultado en signos clínicos, el aumento en la pérdida de la inserción clínica, resección gingival y el sangrado al sondaje.

La microbiota asociada con la periodontitis se considera ‘inflamofílica’ ya que los patógenos periodontales no pueden persistir sin la presencia de la inflamación ⁸⁵. Es importante destacar, que se ha demostrado que el control de la inflamación periodontal puede restaurar la homeostasis normal de las biopelículas ⁸⁶. Estos conceptos fueron validados por un estudio que demostró que bacterias anaerobias junto con las comensales y el sistema de complemento, pueden inducir inflamación periodontal que proporcionaría un ambiente propicio para que *Porphyromonas gingivalis* -uno de los patógenos más asociados a la periodontitis - crezca y prolifere ⁸⁷. Más aun, surgen terapias antiinflamatorias para combatir esta enfermedad ⁸⁸⁻⁹¹ (Figura 10).

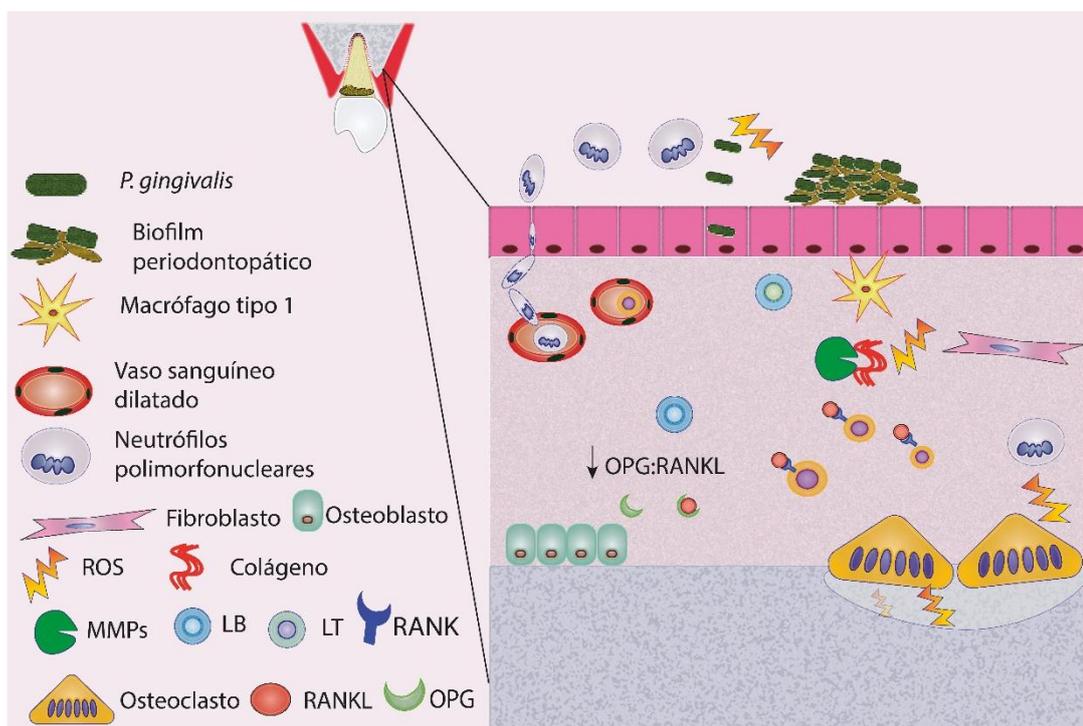


Figura 10. Esquema de la respuesta inmune en la periodontitis. Ante la injuria bacteriana por parte de bacterias Gram- presentes en la bolsa periodontal, se estimula la angiogénesis, vasodilatación y extravasación de PMN. La bacteria *P. gingivalis* puede quedar internalizada en las células del epitelio de la bolsa, dificultando el pronóstico de la periodontitis. Los fibroblastos producirán citoquinas proinflamatorias y ROS. También existe una mayor respuesta de LT H 1 y LT H 17. Los LB por su parte también producen inmunoglobulinas y RANKL, además de inmunoglobulinas que estimularán la producción de RANKL por parte de los osteoblastos. Finalmente, el equilibrio entre RANKL y OPG se rompe en favor de RANKL favoreciendo la resorción ósea. El estrés oxidativo generado por los PMN y los fibroblastos desencadenan que, por un lado, se diferencien OC sin la mediación de RANKL y, por otro lado, la depleción de GSH en el ambiente periodontal. Las MMPs actúan hidrolizando proteínas como colágeno. Para más detalles de la resorción ósea ir a figura 5 y 19. Ilustradora científica: Verónica M. Solá

Como se mencionó anteriormente, el EO es crítico en el inicio y en la progresión de la periodontitis, tal es así, que fue propuesto como un factor equiparable a las

citoquinas pro-inflamatorias en el modelo contemporáneo de periodontitis de Meyle y Chapple ⁷. (Figura 11).

Dada la importancia que reviste el EO en la PD, dentro del ambiente periodontal, se estudió como el glutatión actúa como una defensa antioxidante innata. Dicho tripéptido forma el sustrato para la enzima antioxidante glutatión peroxidasa, la cual transforma el H_2O_2 en H_2O y es reconstituido en su forma oxidada (GSSG) por la enzima glutatión reductasa ⁴ (Figura 4). Estas reacciones cíclicas son vitales para el estado de óxido-reducción de la célula sino también para el normal funcionamiento de la NADPH oxidasa la cual utiliza O_2 molecular y NADPH para transformarlo en anión superóxido (O_2^-) ⁷. Fisiológicamente, la reacción de la reductasa va siempre a favor de la creación de glutatión. Los niveles intracelulares de glutatión normalmente son altos (1–10 mM) ⁹², mientras que los extracelulares son bajos (1–4 μM) ^{94,95}. Por este motivo, es relevante que haya niveles milimolares en el fluido crevicular gingival de glutatión. De esta manera, estos altísimos niveles contribuirían a la defensa antioxidante del epitelio de unión ⁹⁶. El glutatión entonces, representa un sistema de defensa innato y fundamental en el epitelio del surco expuesto a las bacterias ^{95,97}. Más aún, en algunas bacterias asociadas a la *Fusobacteria*, *Peptostreptococcus micros*, y *Treponema denticola* metabolizan este glutatión para convertirlo en sulfuro de hidrógeno (H_2S), resultando en un característico olor a descomposición ^{98–102}. También se identificaron las vías metabólicas que subyacen a estos procesos en *T. denticola* ¹⁰³. A su vez, fumar un solo cigarrillo es capaz de inducir una significativa reducción del glutatión salival ^{104,105} y los valores en plasma son similares ¹⁰⁵. Más aún, los PMN de personas fumadoras mostraron la liberación aumentada de anión superóxido ¹⁰⁶.

Existen datos similares para con una reducción del glutatión de modo dosis-dependiente como resultado del hábito de fumar ¹⁰⁷ y, nuevamente, el glutatión demostró ser protector contra la nicotina en fibroblastos (FB) del ligamento periodontal (LP) ¹⁰⁸.

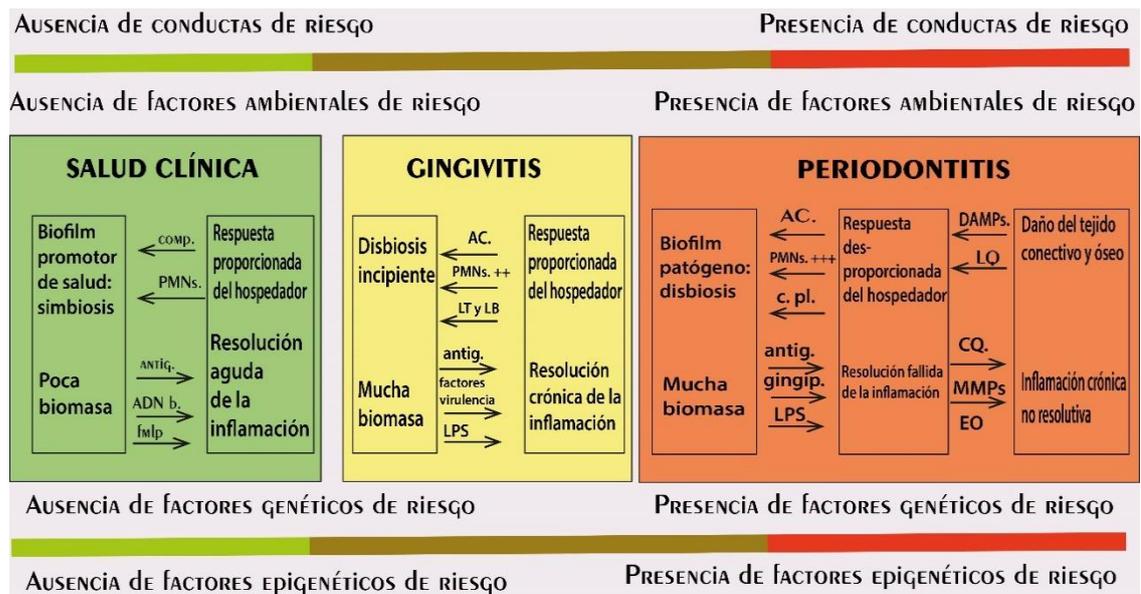


Figura 11 Modelo contemporáneo de periodontitis. Se aprecia que hay una relación circular entre respuesta immuno-inflamatoria del hospedador y una flora, que puede ser simbiótica o bien llegar a ser francamente disbiótica. También se tienen en cuenta modificadores como hábitos de riesgo, epigenéticos y genéticos. Referencias: comp: complemento. PMNs: Neutrófilos olimorfonucleares. Antig: antígenos. ADN_b: ADN bacteriano. Fmlp: N-formilmetionil-leucil-fenilalanina. AC: anticuerpos. C.pl.: células plasmáticas. Gingip: gipainas. DAMPs: patrones asociados a daño molecular. CQ: citoquinas. MMPs: metaloproteinasas LPS: lipopolisacaridos. Modificado de Meyle et. al 2015. Ilustradora científica: Verónica M. Solá.

3.3. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por una serie de cambios morfológicos en la estructura de la célula junto con numerosos procesos bioquímicos dependientes de enzimas específicas. El resultado es la eliminación de diversas células sin daño alguno para el tejido circundante. La célula que comienza el proceso de apoptosis, se retrae y condensa, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura y el ADN nuclear se desensambla. La superficie de dicha célula se altera para luego atraer a los macrófagos. Dichos macrófagos fagocitan a la célula apoptótica para evitar que esta derrame su contenido al espacio extracelular ¹⁰⁹.

Existen dos vías mediante la cual se activa la apoptosis. Estas son la extrínseca y la intrínseca. La vía extrínseca, está relacionada a ligandos de muerte celular secretados principalmente por células NK y macrófagos, dichos ligandos comprenden a la superfamilia de los TNF. Una vez unido el ligando a su receptor de muerte en la célula, se activa la procaspasa 8, iniciadora a caspasa 8 para, luego de unas sucesivas reacciones

en cadena, finalizar con la caspasa 3, efectora. Esto derivará en el clivaje del ADN nuclear y en la posterior formación de cuerpos apoptóticos ¹¹⁰.

La vía intrínseca está asociada a una multiplicidad de estímulos tales como ROS, daño de ADN mitocondrial y permeabilización de la membrana mitocondrial y liberación de factores apoptogénicos desde la misma hacia el citosol. A diferencia de la vía extrínseca, se activa primeramente la caspasa 9 para confluir en la vía común efectora de la caspasa 3 con los efectos posteriores arriba mencionados ¹¹¹.

Estudios recientes han demostrado que la apoptosis está relacionada con respuestas inflamatorias ¹¹². Sin embargo, su papel en la periodontitis no es del todo claro. Es sabido que la apoptosis produce muerte celular y daño tisular, conduciendo a una disfunción orgánica ¹¹³. Se demostró que la actividad de las caspasas 3 y 7 está aumentada en tejido gingival de pacientes con periodontitis ¹¹⁴, indicando una relación entre apoptosis y periodontitis.

Más aún, otro estudio, Kurita-Ochiai *et al.* ¹¹⁵ reportó un aumento en la proporción de las células apoptóticas y con el potencial de membrana mitocondrial reducido en fibroblastos gingivales humanos, aislados de pacientes con periodontitis, tienen más alto nivel de ácido butírico en el grupo infectado que en el control sano, y que estos cambios pueden ser atenuados al anular las caspasas. Wang *et al.* ¹¹⁶ trató una línea celular de cementoblastos inmortalizada (OCCM-30) con TNF- α , y hallaron que la actividad de la FAL se bloqueaba y que se suprimía la expresión de genes claves tales como osterix, sialoproteína ósea y osteocalcina. A su vez, el número de células apoptóticas OCCM-30 incrementaron la expresión de caspasa 3 tanto a nivel genético como proteico. Estos resultados indican que la apoptosis podría contribuir a una menor mineralización. Más aún, la expresión de genes relacionados con la apoptosis en tejido gingival ¹¹⁷ y monocitos de sangre periférica ¹¹⁸ estuvieron sobreexpresados en pacientes con periodontitis comparados con los controles sanos.

En suma, la apoptosis parecería estar relacionada a los eventos inflamatorios suscitados en las células del ambiente periodontal ocurridos durante la periodontitis.

3.4. Terapias periodontales de modulación de la inflamación e ingeniería de tejidos

El tratamiento actual de la periodontitis se focaliza en la remoción de la biopelícula dental y el control a largo plazo de la acumulación de dicha biopelícula. La terapia periodontal no quirúrgica es exitosa para detener el avance de la enfermedad activa y promover la reparación de los tejidos ⁸⁵. Esto no se logra de modo completo, tal como se aprecia en la figura 12 A y B en la que luego de realizada la terapia básica persisten defectos óseos periodontales. Si bien estos son los lineamientos, la terapia periodontal debería ser cada vez más personalizada, según cada paciente, teniendo en cuenta las características particulares de cada uno ⁸⁶. Es por ello que, la regeneración completa del periodonto persiste como una meta difícil de lograr y se investigan nuevas alternativas antiinflamatorias y regenerativas.¹¹⁹.

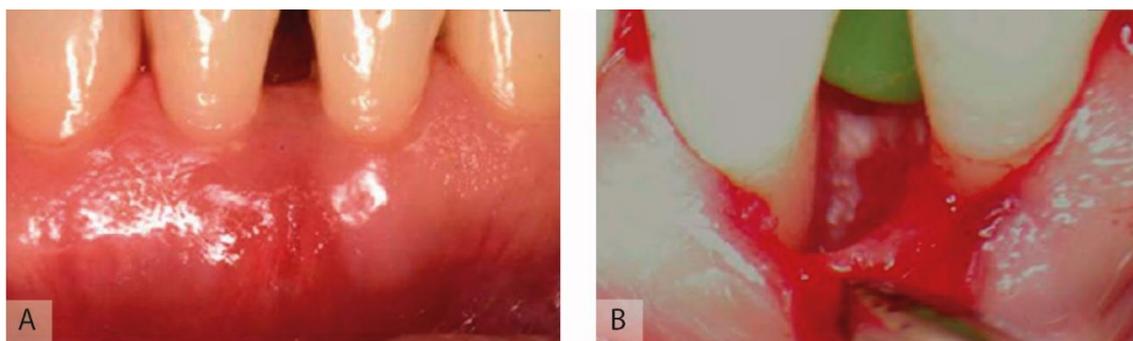


Figura 12 A. Aspecto clínico de un defecto óseo periodontal. **B.** Aspecto del defecto óseo periodontal una vez decolada la encía. Extraído de Sallum *et al.* 2019 ¹¹⁹.

La regeneración periodontal se define como la reconstitución de tejidos de inserción periodontal perdidos de la arquitectura original y de la función del periodonto ¹²⁰. Se estudiaron diversas estrategias regenerativas, incluyendo acondicionamiento de la superficie de la raíz, rellenos óseos de origen animal y cadavérico, y regeneración tisular guiada. Algunas, inclusive, son consideradas el *'gold standard'* de la periodoncia regenerativa tales como las proteínas derivadas de la matriz del esmalte, las cuales ofrecen gran predictibilidad en los procedimientos regenerativos ¹²¹. No obstante, las mismas significan un altísimo costo para los pacientes. Resulta necesario entonces, investigar distintas posibilidades de regeneración teniendo en cuenta los pilares de la ingeniería tisular como se señala en la Figura 13.

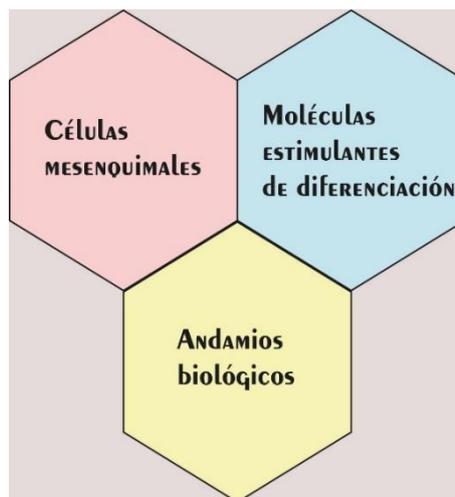


Figura 13. Pilares de la regeneración tisular. El proceso regenerativo requiere la combinación de eventos fundamentales, tales como cascadas de señalización regulatorias, presencia en cantidad apropiada de células mesenquimales que respondan a las señales biológicas y también un andamio que contenga y guíe esa regeneración y que aporte un caudal sanguíneo adecuado. Ilustradora científica: Verónica M. Solá.

3.5. Células Madre Mesenquimales gingivales

Las células madre son células indiferenciadas, con la capacidad de autorenovarse y de dar origen a otros tipos celulares, según el nicho y los estímulos recibidos ¹²². Según su capacidad para comprometerse a diversos linajes diferenciados, se clasifican como totipotentes, pluripotentes multipotentes, oligopotentes, o progenitoras (Figura 14) ¹²³.

Las células madre totipotentes son capaces de dar origen a todas las células de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). El cigoto, y los tejidos extra-embriónicos son un gran ejemplo de este subgrupo ¹²⁴.

Las células pluripotentes o embrionarias, son capaces de dar origen a las células de las tres capas embrionarias, pero no a los tejidos extraembriónicos ¹²⁵.

Las células madre multipotentes, se encuentran en tejidos adultos, y solo pueden dar origen a células del tejido, del cual le dio origen a las mismas ¹²⁶ (Figura 14).

Dentro de estas poblaciones multipotentes, encontramos a las células mesenquimales (MSCs). Dicho término fue acuñado para representar su capacidad de diferenciar a distintos linajes ¹²⁷. Dichas células, fueron aisladas y caracterizadas en primera instancia por Friedenstein *et al.*, a partir de tejidos medulares ¹²⁸. Estas células fueron distinguidas y aisladas del resto de las células del componente hematopoyético, en base a su adherencia al plástico de cultivo. A su vez, demostraron diferenciarse del linaje osteogénico al ser transplantadas *in vivo*.

Las MSCs fueron, en una segunda instancia, aisladas y caracterizadas a partir de la piel ^{129,130}, de tejidos adiposo ¹³¹, de la sangre menstrual ¹³², de tendones ¹²², de la placenta ¹³⁴, de líquido amniótico ¹³⁵, y de otros órganos, tales como el hígado y el pulmón ¹³⁶.

Las MSCs comparten con las células embrionarias los genes Octamer-4 (Oct 4) y el estadio específico embrionario AG 4 (SSEA) ^{137,138}.

El creciente interés por las MSCs llevó a que se investiguen sobre los diferentes tejidos bucales. De esta manera, se aislaron MSCs de la pulpa dental (DPMSCs) ¹³⁹, de los dientes deciduos (SHED) ¹⁴⁰, del ligamento periodontal (PLSCs), de las papilas apicales (SCAP) ¹⁴¹ y de la encía (GMSCs) ¹⁴² (Figura 15).

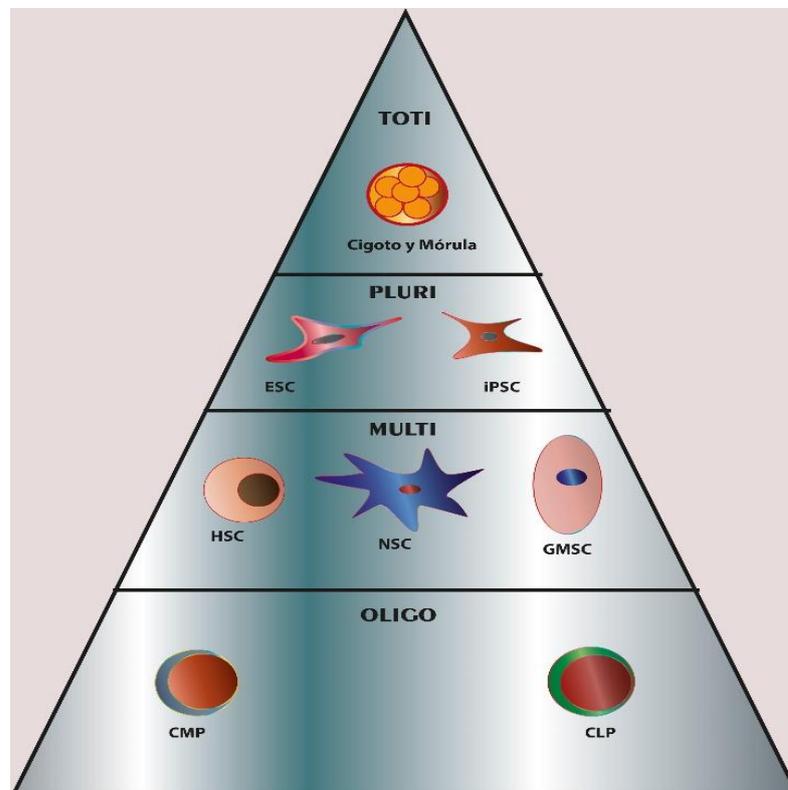


Figura 14 Jerarquía de las subpoblaciones madre. Toti: totipotente, **Pluri:** pluripotente, **Multi:** multipotente, **Oligo:** oligopotente. **ESC:** Célula madre embrionaria. **Ipsc:** Célula madre pluripotencial inducida, **HSC:** Células madre hematopoyéticas, **NSC:** Célula madre neuronal. **CMP:** Célula progenitora mieloide. **CLP:** Célula progenitora linfoide. adaptado de Sugawara *et. al.* Ilustradora científica: Verónica M. Solá.

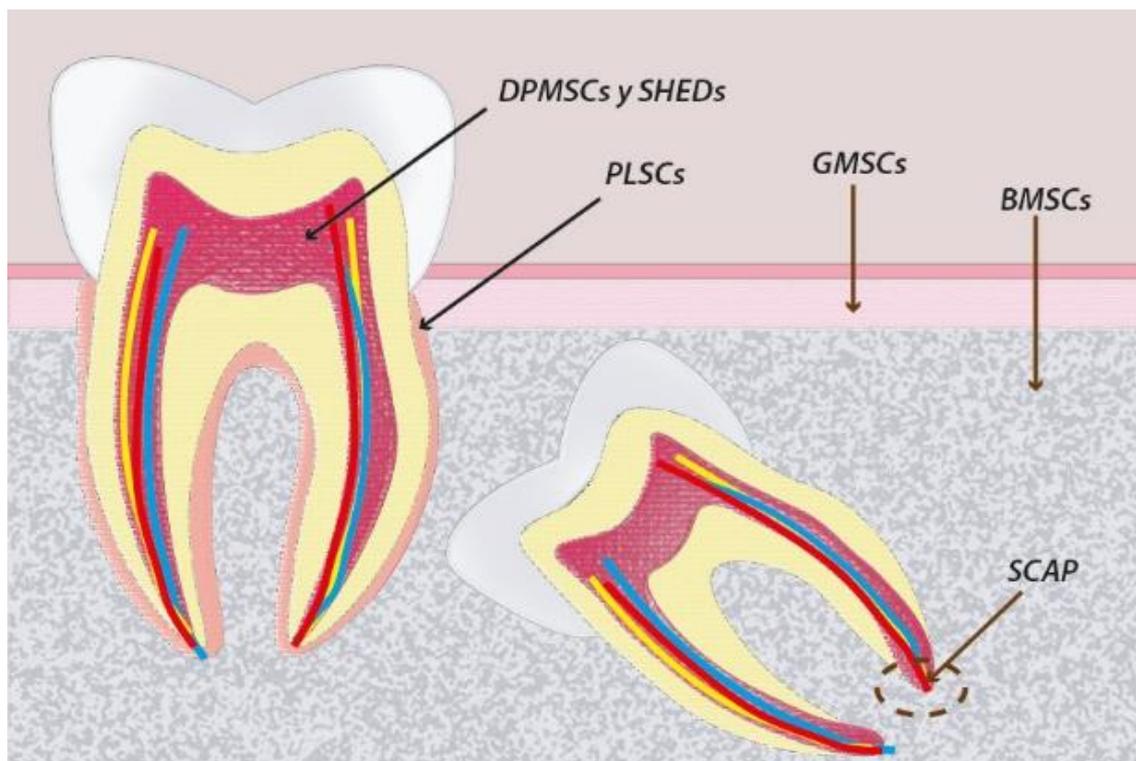


Figura 15. MSCs en el ambiente bucal. **DPMSCs**: células mesenquimales de pulpa. **SHEDs**: células mesenquimales de dientes deciduos. **GMSCs**: células mesenquimales de encía. **BMSCs**: células mesenquimales de médula ósea. **SCAP**: células mesenquimales de papila apical. Ilustradora científica. Verónica M. Solá.

Su identificación resulta compleja, puesto que no poseen un único marcador de identidad. Por ello comparten marcadores de superficie con células hematopoyéticas ¹⁴³.

Dada la heterogeneidad de las mismas y de la falta de criterios estandarizados para su aislamiento y cultivo, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció criterios mínimos. Dichos criterios incluyen: la adherencia al plástico de cultivo con morfología fibroblastoide y el patrón de crecimiento clonogénico; la expresión de marcadores de superficie CD73, CD90, y CD105, con ausencia de CD14, CD34, CD45, CD19, CD11b, CD79a, y HLA-DR. Por último, incluye la capacidad de diferenciación celular hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico ¹⁴⁴.

Las GMSCs, se aíslan del tejido conectivo de la encía libre y adherida. La encía es la primera barrera del sistema inmune innato, no solo físico, sino también a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias y de péptidos antimicrobianos. Tiene su origen embriológico en el ectomesenquima de la cresta neural, y se compone de un tejido epitelial y conectivo. Posee una notable capacidad de reparación de heridas, caracterizada por una marcada reducción de inflamación, una rápida re-epitelización y sin dejar

cicatrices, similar a la de un tejido fetal, contraria a la cicatrización propia de la piel ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. El tejido gingival no solo se obtiene de cirugías periodontales de rutina -con un mínimo discomfort para el paciente -, sino que en muchos casos es tejido de descarte. Estas células, contrariamente a otras MSCs -cuyos orígenes pueden ser de otros tejidos -, poseen la ventaja, anteriormente mencionada, de una facilidad en la obtención y en la cantidad de materia aislable ¹⁴².

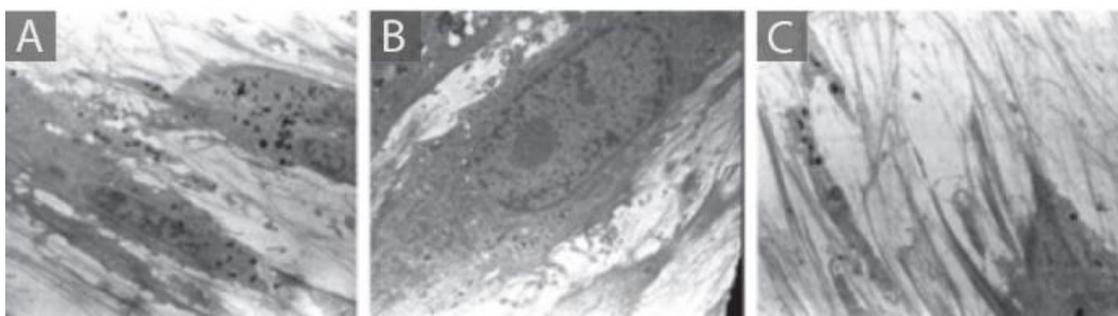


Figura 16. GMSCs de tejido gingival humano diferenciadas a osteoblastos. A. Forma similar a fibroblastos y núcleo extendido B Mitocondrias con morfología extendida y expresión de vacuolas. C Fibras de colágeno que forman la matriz extracelular *in vitro*. Microscopio electrónico de transmisión.3000X. Extraído de Sanz *et. al.* 2015¹⁴⁸.

Las GMSCs han cobrado interés en la investigación regenerativa, y se las postula como una opción terapéutica, por sus propiedades de diferenciación osteogénica. en la figura 16, se observa a las GMSCs, diferenciadas de los osteoblastos, vistas desde el microscopio electrónico de transmisión, donde puede observarse su aspecto fibroblastoide y la secreción de la matriz extracelular, principalmente el colágeno ¹⁴⁸.

Tal como ya ha sido explicitado, el ambiente periodontal está constantemente expuesto al desafío bacteriano y las GMSCs pueden co-existir en este ambiente inflamado. Además de las características anteriormente mencionadas, las GMSCs poseen propiedades inmunomoduladoras. Esto se sabe en base a las acciones de las mismas sobre la respuesta inmune innata y adaptativa, tal como la supresión de linfocitos NK, de células dendríticas y de linfocitos T y B.

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa y comprende numerosos tipos de células y moléculas ¹⁴⁹. Las GMSCs muestran una potente capacidad inmunomodulatoria sobre los receptores tipo *toll* (TLRs), las células dendríticas (CDs), los macrófagos y los mastocitos ^{150, 151}. Los TLRs, moléculas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), promueven la activación de la respuesta inmune ^{152,153}. Un estudio que constaba en colocar GMSCs en un medio proinflamatorio, el cual contenía TNF α , IL-1 β , IFN- γ , y IFN- α , demostró la sobreexpresión de los TLRs

1, 2, 4, 5, 7 y 10, disminuyendo así la expresión del 6¹⁵⁴. De esta manera, se probó en grandes medidas que, son células altamente competentes a la hora de proteger al huésped.

Las CD, son quienes median la respuesta inmune innata y adaptativa, por el hecho de ser células presentadoras de antígenos¹⁵⁵. La prostaglandina PGE2, un mediador de la inflamación derivada del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (COX), comanda acciones proinflamatorias como la pirexia, el dolor y la inflamación. La PGE2 tiene una actividad antiinflamatoria, mediada por el receptor EP3 expresado principalmente en células mastocíticas. Las CDs expresan EP4 y su unión a PGE2 normalmente induce a la producción de IL-23, la cual es proinflamatoria y desencadena en la activación de los Th 17¹⁵⁶. De todos modos, a través de la producción de PGE2, se reportó que las GMSCs deprimen la maduración y activación de las CDs, reduciendo así su capacidad de presentación de antígenos y de esta manera, atenuando la respuesta/capacidad inflamatoria¹⁵⁶. Esto podría deberse a la activación de la IL-10, mediante la activación mediada por PGE2 del sistema E-prostanoide¹⁵⁷.

Los macrófagos, por su parte, son componentes esenciales en la respuesta inmune innata. Poseen subpoblaciones que pueden ser clasificadas en M1 (proinflamatorios) y en M2 (antiinflamatorios)^{159,160}. Los M2 poseen actividades antiinflamatorias debido al perfil de las citoquinas segregadas, estas son, IL-10 y TGF- β ¹⁶¹, las cuales afectan a los linfocitos T, como se detallará a continuación. Las GMSCs mostraron una polarización hacia un fenotipo M2 vía la secreción aumentada de IL-6, IL-10, GM-CSF y PGE2^{162, 163}.

Las células mastocíticas (CMs), claves en la respuesta inmune innata, son críticas en procesos alérgicos y en desordenes inflamatorios¹⁵⁵. Las GMSCs demostraron efectos supresivos de las CMs *in vitro* e *in vivo*, incluyendo la producción de *novo* de la citoquina proinflamatoria TNF- α , de células mastocíticas activadas humanas (HMC-1) de modo contacto célula-célula. Las GMSCs indujeron un bloqueo en la producción de *novo* de citoquinas proinflamatorias por parte de las CMs y se postula que en parte está mediada por el eje TNF α /PGE2. Más aún, la administración de GMSCs *in vivo* suprimió la degranulación de las células mastocíticas. Estos efectos fueron descritos como dependientes de la vía COX2/PGE2, mediados por los receptores de PGE2-EP¹⁶². Dichos receptores sugieren que el eje TNF- α /COX2/PGE2 constituye un *feedback* negativo entre GMSCs y CMs¹⁴².

Las GMSCs poseen un efecto supresor dosis dependiente sobre la proliferación y la activación de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC),

estimuladas con phytohemaglutinina (PHA) ¹³⁹ o por linfocitos alogénicos en una mezcla de linfocitos reactiva (MRL) ^{151,152}. Aparentemente, las GMSCs poseen la habilidad de suprimir la proliferación de los linfocitos activados *in vitro* ¹⁴². Las GMSCs suprimieron la proliferación linfocitaria promovida por PHA *in vitro* por la sobre expresión de IL 10 y la inhibición de la secreción del triptófano de modo contacto célula-célula, aunque también sin contacto célula-célula vía indolamina 2,3-dioxigenasa ¹⁵⁰. La citoquina proinflamatoria INF γ , secretada por linfocitos activados en el sistema de co-cultivo, fue descrita como la señal *feedback* entre GMSCs y células T ¹⁴². Además, se demostró tanto *in vitro* como *in vivo* que, las GMSCs pueden inhibir la proliferación de las células TH 17 y simultáneamente promover la expansión de CD4+, CD25+, FoxP3+, células T regulatorias (T Regs) -una subpoblación T que es conocida por sus acciones en el control en la autoinmunidad ¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Se cree que esto es debido a un mecanismo mediado por TGF- β , involucrando a los macrófagos M2, siguiendo la captación de las células T apoptóticas.

El último efecto es inducido mediante la vía Fas-ligando, secretada por las GMSCs, una proteína transmembrana tipo II, perteneciente a la familia TNF. Esta, mediante la unión con su receptor, induce la apoptosis de los LT. ¹⁶⁹.

En síntesis, las GMSCs son inmunomoduladoras mediante un complejo entrecruzamiento de células y moléculas inflamatorias. Las mismas representan una promisorio área a explorar para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, tales como la periodontitis y las autoinmunes ¹⁴².

3.5 Las GMSCs en la periodoncia regenerativa.

Las GMSCs se consideran una prometedora fuente de células madre, para lograr un avance en la regeneración periodontal. Esto es, la restitución completa de cemento radicular funcional, ligamento periodontal y hueso alveolar. En un estudio realizado en cerdos, se aislaron GMSCs del margen gingival y mediante la selección magnética, colocadas en una matriz de colágeno o hueso bovino inorgánico, se demostró una notable capacidad para la regeneración *in vivo* ¹⁷⁰. Esto desafía el clásico postulado de la compartimentalización en la periodoncia, donde se expone que la encía debe ser excluida vía regeneración tisular guiada, para lograr la regeneración del ligamento periodontal y del hueso ¹⁷¹. Dicho de otro modo, esto demuestra que su tejido conectivo posee células multipotentes con un significativo potencial regenerativo. En otro estudio, se utilizaron GMSCs en un modelo de defecto óseo de furcación tipo III en perros. Las GMSCs

trasplantadas mejoraron significativamente la regeneración de los tejidos periodontales, incluyendo el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar ¹⁷².

A su vez, su potencial regenerativo periodontal fue evaluado en otro estudio, donde se combinaron GMSCs con una matriz extracelular de ácido hialurónico en un modelo porcino de periodontitis. Esto regeneró el periodonto perdido, incluyendo al hueso, al ligamento periodontal y al cemento neoformado ¹⁷³.

Interesantemente, cuando se transplantaron GMSCs a ratones C57BL/6J por vía sistémica, mediante la vena de la cola, las GMSCs migraron a los defectos óseos generados en las ratas, promoviendo, de esta manera, la regeneración ósea ¹⁶³. Estos resultados demuestran la capacidad de las GMSCs de migrar hacia el sitio con inflamación, donde son requeridas ¹⁷⁴.

4. Melatonina

4.1 Síntesis pineal

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una molécula ubicua en la naturaleza. Su síntesis no está limitada a los vertebrados, sino que está presente en plantas ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, bacterias ¹⁷⁸, unicelulares ¹⁷⁹, e invertebrados ^{180,181}. La melatonina está presente en las diferentes especies a lo largo de la evolución en el planeta Tierra, con la estructura molecular altamente conservada. Se ha evidenciado su presencia en cianobacterias, las cuales datan de millones de años atrás en la evolución ¹⁸². Su ubicuidad en los diferentes organismos -tanto unicelulares como multicelulares-, desde eras prehistóricas, indica su importante función en las células. En mamíferos, es sintetizada principalmente por la glándula pineal ¹⁸³ y otros órganos, tales como el intestino ^{184,185}, los pulmones ¹⁸⁶ y el páncreas ¹⁸⁷.

La melatonina, se aisló por primera vez en 1958 por Lerner *et. al.* ¹⁸⁸, los cuales intentaron aislar el factor pineal responsable del aclaramiento en la piel de los anfibios.

La síntesis de dicha hormona inicia con el aminoácido apolar triptófano, el cual sufre transformaciones hasta su conversión en serotonina. Esta, luego va a ser intervenida por dos enzimas claves. El primer paso es la N-acetilación por la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) y su forma fosforilada, PAANAT, para dar como producto a la N-acetil serotonina. La AANAT sufrirá un drástico aumento de su actividad durante la noche, contrariamente, su actividad se inhibe con el inicio de la luz y se considera una enzima clave en la síntesis de esta hormona. Más aun, se considerará como un limitante primario de la síntesis de melatonina. El último paso, consiste en la transferencia de un grupo metilo de la adenosilmetionina al grupo 5 hidroxilo de la N-acetilserotonina para dar como producto final a la melatonina. Esta última reacción es catalizada por la enzima acetil serotonina -O-metiltransferasa (ASMT), antiguamente denominada hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT) o acetilserotonina O-metiltransferasa. Esta enzima, a diferencia de la AANAT, no sufrirá variaciones según el ciclo nocturno-diurno, por lo cual se la considera un regulador circadiano menor. ¹⁸⁹⁻¹⁹¹. La conservación de estos pasos de síntesis, a lo largo de las diferentes filogenias, demuestra su alta conservación de estructura molecular ¹⁹² (Figura 17).

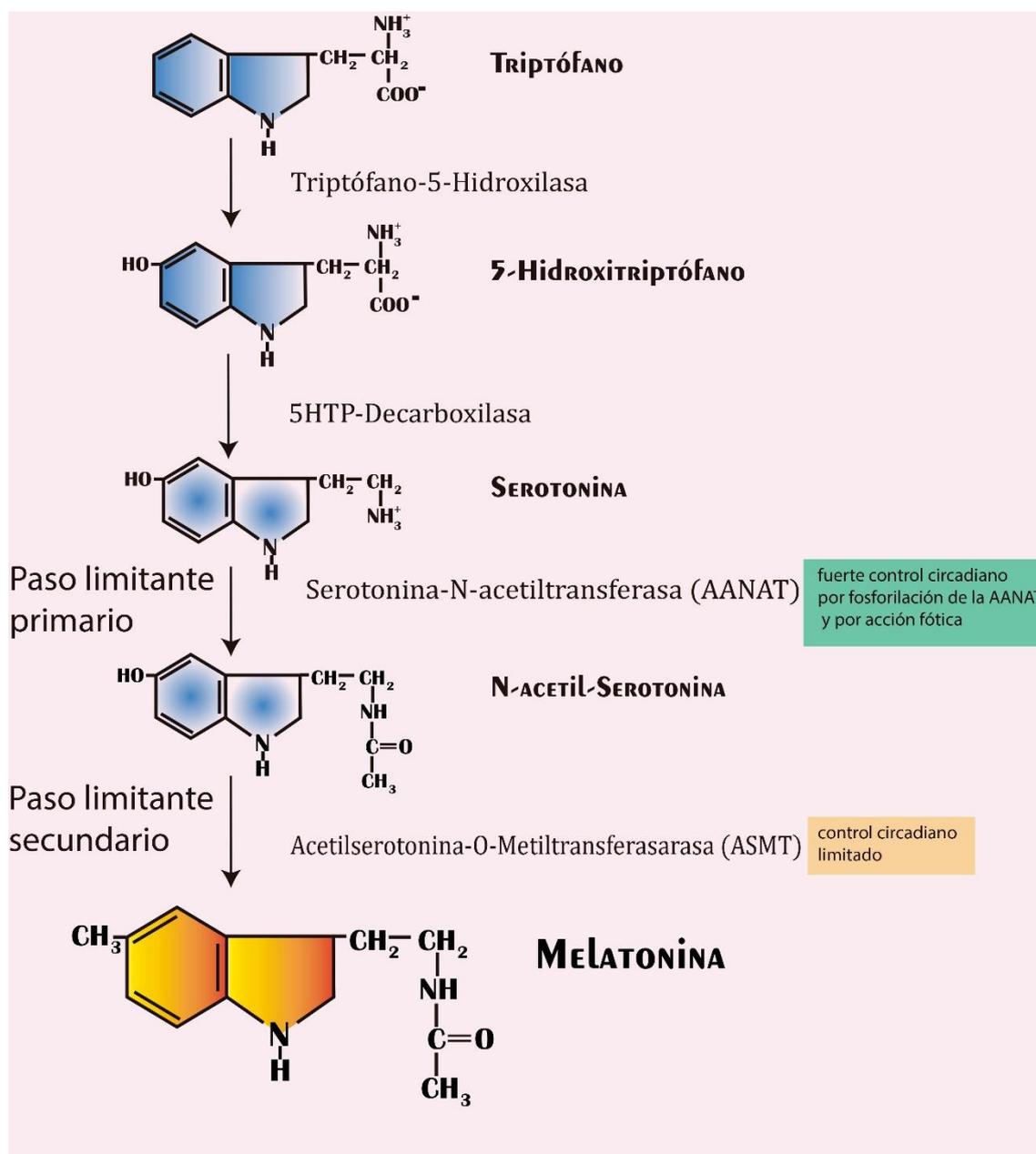


Figura 17. Síntesis de melatonina. Esquema de su síntesis a partir del aminoácido triptófano con las enzimas participantes. Ilustradora científica: Verónica M. Solá.

La retina de los mamíferos ejerce una importante función en cuanto a la síntesis de la melatonina, mediante el sistema fotoneuroendócrino. Mientras que la luz estimula de manera directa a la glándula pineal en vertebrados inferiores y aves. Esto se ve reflejado en que los animales expuestos a la luz artificial nocturna, experimentan un decrecimiento de la síntesis de melatonina.

En base a diferentes estudios, se estableció un modelo de regulación pineal. La vía neural que es influenciada por la luz ambiental y sigue el circuito neuronal retina-tracto retinohipotalámico, núcleo supraquiasmático, hipotálamo periventricular, columna

intermediolateral torácica de la médula espinal, ganglio cervical superior, nervios carotídeos internos y glándula pineal. A su vez, la neurotransmisora norepinefrina liberada de las terminales simpáticas en la noche, activa receptores β -adrenérgicos postsinápticos acoplados al sistema adenilato ciclasa-AMPC. De esta manera, con un aporte de receptores α 1B-adrenérgicos se activa la fosfolipasa C β , lo que conduce a aumentos en Ca²⁺, proteína quinasa C y calmodulina quinasa. Estos procesos conjuntamente estimulan la síntesis de melatonina y su liberación. Debe notarse que la presencia adicional de vías pinealopetales centrales peptidérgicas y de numerosos receptores hormonales, indica que la regulación de la biosíntesis de la melatonina es más compleja y multifactorial de lo que comúnmente se infiere del esquema de la figura 18

192 .

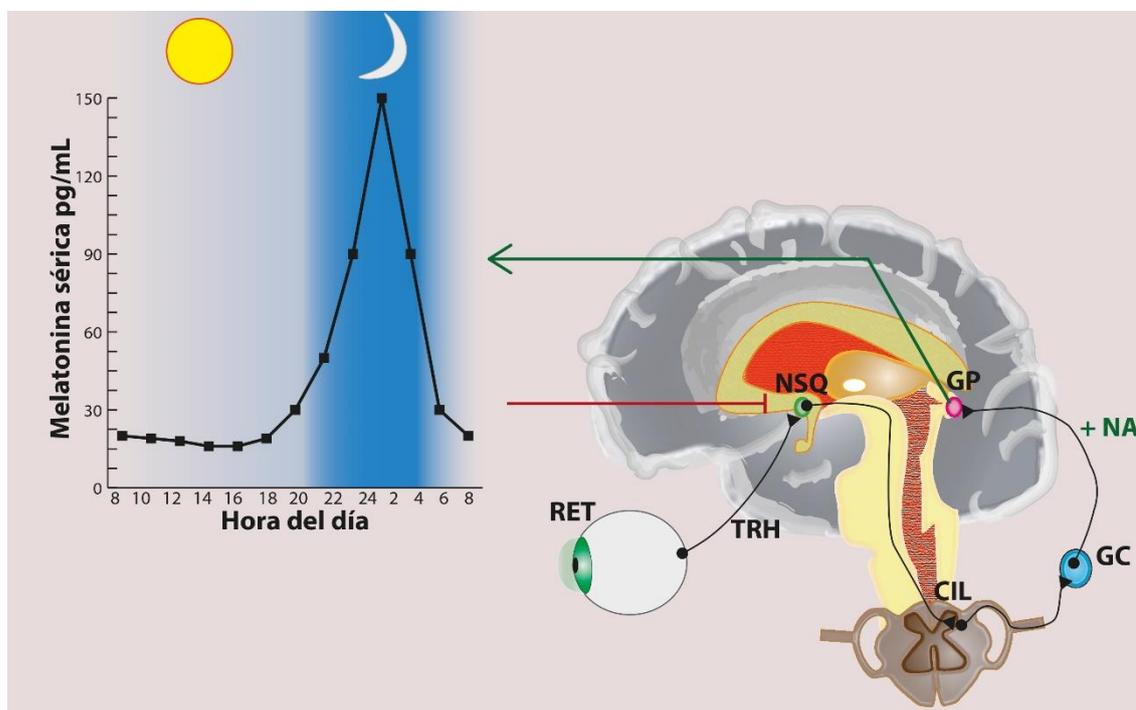


Figura 18. Sistema fotoneuroendócrino. RET: Retina, TRH: Tracto retinohipotalámico, CIL: Columna intermedia lateral de la médula espinal, GC: Ganglio cervical superior, GP: Glándula pineal, +NA: noradrenalina, efector positivo de la síntesis de glándula pineal. Ilustradora científica: Verónica M. Solá.

De esta manera, el pico máximo de melatonina se logra a las 2 am con 150 pg/ml séricos.

El metabolismo de la melatonina es rápido. Su vida media oscila entre los 45 y 65 minutos. Más del 90% de la melatonina es metabolizada en el hígado. En primer lugar, es hidroxilada en la posición 6 por subunidades del citocromo p450. La 6-

hidroximelatonina es conjugada con sulfato y en menor medida, con ácido glucurónico. Estos conjugados son excretados por orina ¹⁹³⁻¹⁹⁶.

4.2 Síntesis extrapineal

La melatonina no solo es sintetizada en la glándula pineal, sino que también se han identificado múltiples sitios de síntesis como en el tracto reproductivo ¹⁹⁷, en el gastrointestinal ¹⁹⁸, en la leche materna, en riñones e hígado, entre otros, donde cumpliría funciones parácrinas ¹⁹⁹. Interesantemente, también se identificó su síntesis en glándulas salivales ²⁰⁰ y en la encía ²⁰¹.

4.3 Receptores de Melatonina

Los efectos de la melatonina en el organismo incluyen dos vías principales, dentro de las cuales una está mediada por receptores y la otra es independiente de los receptores, de la cual se detallará en posterioridad. Los receptores de melatonina incluyen los de membrana y los nucleares. Los dos receptores de membrana, pertenecientes a la familia de proteínas fijadoras de nucleótido de guanina (proteína G), son el MT1 Y MT2. La activación del MT1 está vinculada a las respuestas asociadas a la inhibición de AMPc a través de proteínas G. Esto logra el incremento del calcio citosólico vía Gq11 ¹⁹⁵.

Tanto el MT1, como el MT2, se acoplan a vías dependientes de fosfolipasas. Los receptores MT1 se encuentran relacionados a funciones metabólicas y vasoconstricción, mientras que los MT2 están envueltos en el control de los ritmos circadianos y en la liberación de dopamina en la retina y en la vasodilatación. A su vez, están involucrados en la diferenciación osteogénica de MSCs. Además de los ya mencionados receptores, se identificó una quinona reductasa, a la cual se la llamó MT3. Sin embargo, esta enzima no cumple con los requisitos para ser llamada 'receptor' y está relacionada al metabolismo de la célula ²⁰².

En este sentido, se reportaron receptores huérfanos en el núcleo. Estos son los ROR, dentro de los cuales hay tres subclases, estos son (α , β , γ) y cuatro variantes de empalme para el subtipo α -. Solo la variante de empalme c de los subtipos ROR α y ROR γ , están relacionados a las acciones de melatonina en el núcleo. Algunos de los efectos a nivel genómico de la melatonina están relacionados a su interacción con estos tipos de receptores. Esta, a su vez, interactúa con proteínas citosólicas incluyendo la calmodulina y calreticulina, las cuales están vinculadas a la regulación del citoesqueleto y al control de los receptores nucleares respectivamente ²⁰³.

4.4 Acciones protectoras de la Melatonina

La melatonina estimula la síntesis de enzimas antioxidantes. Se incluye la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa ^{204, 205}. Más aun, la melatonina regula positivamente la síntesis del glutatión, mencionado previamente ²⁰⁶.

De esta manera, cuando la melatonina funciona como removedora de radicales libres, uno de sus resultantes es el metabolito C3OHM. En el testeo de dicho metabolito, teniendo en cuenta su capacidad antioxidante, se probó su efectividad en la remoción de radicales libres. Así como lo son también los siguientes metabolitos que forman N-acetil-N-formil-5-methoxykynuramina y N-acetyl-5-methoxikinuramina. A partir de lo definido como la 'cascada antioxidante de la melatonina', la primera, la segunda y la tercera generación de metabolitos ha demostrado ser efectiva, como 'barredor' de radicales libres. Esta cascada neutraliza cerca de diez radicales, lo cual contrasta con los antioxidantes clásicos, los cuales detoxifican una sola molécula oxidante ^{207,208}.

La habilidad de melatonina para reducir el EO mediante la remoción de radicales libres, es directamente proporcional a su concentración. A mayores concentraciones, mayor disponibilidad de moléculas para interactuar con los ROS, y de esta manera disminuyendo el daño oxidativo y enfermedades relacionadas ²¹.

Más aun, cuando la melatonina aumenta la síntesis de glutatión ²⁰⁹, se produce un efectivo antioxidante intrínseco celular. También es sinérgica con otros antioxidantes clásicos, para la mejora del potencial reductor de los tejidos y de los fluidos ^{196,197}. Estas acciones antioxidantes indirectas llevaron a postularla como un factor clave endógeno en la limitación del daño por estrés oxidativo.

Cuando se comparó la capacidad antioxidante total de la sangre humana con las concentraciones endógenas de melatonina tanto diurnas como nocturnas, se encontró que estos parámetros estaban positivamente correlacionados. Esta correlación documenta, que no solo los niveles farmacológicos de melatonina, sino también las concentraciones fisiológicas, probablemente brinden protección contra los ROS ²¹⁰.

4.5 Melatonina inmunomoduladora

La melatonina, regula de modo pleiotrópico al sistema inmune. Algunos autores la proponen como una estimuladora de dicho sistema, mientras que otros describen propiedades antiinflamatorias. Por este motivo fue denominada como un 'buffer inmunológico' ²¹¹.

Para comenzar, las células del sistema inmune sintetizan melatonina ²¹². El sistema inmune actúa mediante dos formas, una innata y otra adquirida. La primera incluye mecanismos de defensa presentes de modo constitutivo en el organismo, incluso antes de que se presente el desafío patogénico. Esto garantiza una rápida respuesta. Estos mecanismos responden, con la misma intensidad, al mismo desafío patogénico. Los PAMP, son estructuras compartidas entre varios patógenos, esto es, por ejemplo, el lipopolisacárido en las bacterias Gramm negativas. Los componentes celulares de dicho sistema inmune incluyen a las CD, macrófagos, los PMN, los basófilos, los eosinófilos y a las células *natural killer*. Su componente soluble comprende citoquinas como el TNF α , IL 6 y 8 ²¹³.

La respuesta inmune adquirida, en contraste, se ve incrementada ante la exposición creciente de un patógeno específico ²¹⁴. El componente celular está representado principalmente por los linfocitos B y T, mientras que el componente soluble comprende las inmunoglobulinas, las citoquinas 17, 18, 23, entre otras. Los anticuerpos se unen a patógenos específicos y los marcan para que posteriormente los macrófagos activados los fagociten. La inmunidad celular actúa sobre microorganismos intracelulares y mediados principalmente por LT CD8+, quienes reconocen y destruyen células infectadas. Los linfocitos T *helper* (TH CD4+) son claves en la regulación y coordinación de la respuesta inmune innata, mediante la producción de una amplia variedad de citoquinas. Basadas en estas últimas, las células TH se pueden diferenciar en cuatro fenotipos TH1, TH2, TH17 (fenotipos efectores), y células T reguladoras. Estas últimas controlan que no haya respuestas excesivas por parte de los fenotipos efectores. Las TH1 secretan citoquinas como IFN γ , promoviendo así la inflamación. Por otro lado, las TH2 producen citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Este fenotipo de células T contribuye a la regulación humoral y a las respuestas antiinflamatorias. Por su parte, los TH 17, producen IL-17, que posee un efecto pro inflamatorio. En suma, se considera a los TH1/TH 17 de perfil pro inflamatorio y a las TH2/TH reguladoras, antiinflamatorias ^{215,216}.

Hay evidencia de la existencia de comunicación entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino, siendo la misma bi-direccional. La glándula pineal y la melatonina, son miembros de este sistema. La ablación pineal provoca pérdida de peso en tejidos linfoides primarios y secundarios, y un decrecimiento en los componentes celulares asociados con la respuesta innata y adquirida. También se producen reajustes a nivel circadiano en las diferentes estaciones.

La glándula pineal también es un *target* inmune. El IFN γ demostró un incremento en la producción de melatonina, en cultivo *in vitro* de glándula pineal de rata. La administración de IL-1 β inhibió la melatonina sérica por un mecanismo mediado por receptores. También, el factor estimulante de colonias de granulocitos estimuló la síntesis de melatonina tanto *in vivo* como *in vitro* ²²¹. Más aún, se ha formulado la hipótesis de que la supresión de producción nocturna de melatonina está acompañada por el incremento de la inflamación. La transcripción de la AANAT, fue suprimida mediante la administración de TNF α . Sumado a esto, el incremento del TNF α , luego de las cesáreas, va acompañado de la supresión de la melatonina nocturna ²¹⁸.

Muchos estudios sugirieron la síntesis de melatonina por parte de las células del sistema inmune, es por ello que se postula que actuaría como una hormona ²⁰⁸. Ya, en los años 80, se descubrió que las células de sangre periférica eran capaces de sintetizar melatonina *in vitro* en presencia de IFN γ y serotonina ²²¹. Esto es consistente en un reciente de estudio donde se describieron la AANAT, su forma fosforilada P AANAT y ASMT, en células del sistema inmune en bazo y médula ósea ²²².

Si bien se conoce la producción de melatonina en células y en órganos del sistema inmune, poco se sabe acerca de los mecanismos de acción de la misma. Sin embargo, Carrillo-Vico *et. al.*, demostraron que los linfocitos humanos producen grandes cantidades de melatonina *in vitro* y que la misma modula las citoquinas IL-2 ²²³. Estas reacciones, estarían mediadas por el receptor de la IL-2, el R IL-2.

Cuando a células Jurkat, se le suministraba el antagonista de receptor de melatonina no selectivo, el luzindol, producía una disminución en la IL-2. Esto muestra la acción de melatonina mediada por receptores ²²⁴.

En la respuesta inmune innata, la melatonina aumenta la cantidad de linfocitos NK y su actividad ²²⁵. En adición, aumenta el tamaño de los órganos inmunes, tanto en animales inmunocomprometidos como normales ^{226, 227}.

A su vez, la melatonina aumenta la quimiotaxis de células inmunes. Los efectos quimiotácticos se demostraron con neutrófilos de sangre periférica *in vitro* en respuesta a la aplicación de melatonina ²²⁸.

Las citoquinas clave de la inflamación son el TNF α , IL-1 β e IL-6. Los esplenocitos tratados con altas dosis de melatonina (500 mg/kg) produjeron altos niveles de IL-1 β ²²⁹. A su vez, el trauma causado por hemorragia producida en ratones, originó un estado de inmunosupresión, con bajos niveles de IL-1 β e IL-6, los cuales fueron restaurados por el suministro de melatonina ²³⁰. Más aun, la preincubación con melatonina

de los monocitos, aumentó la respuesta de los mismos al LPS. De esta manera, la melatonina actúa de modo diferente en distintas situaciones del sistema inmune. Por ejemplo, la melatonina redujo los niveles de citoquinas proinflamatorias en la inflamación pulmonar producida por ataque cardíaco ^{231,232}. La melatonina disminuyó, a su vez, la expresión de la quemoquina IL-8, en fibroblastos humanos ²³³ y en neutrófilos de sangre periférica activados con LPS ²³⁴. Otro ejemplo de la acción dual de la melatonina, consta en que en los neutrófilos cultivados con bajas dosis de melatonina (10 nM) se incrementó la respuesta, mientras que a altas dosis (2 mM) la inhibió ²³⁵.

La respuesta inmune adquirida, es aumentada cuando el estado basal es la inmunosupresión ²³⁶. Del mismo modo, la melatonina restauró los niveles de Ig G e Ig M en ratas con déficits de las mismas, producidas por la edad ²³⁷. Más aun, la melatonina restauró la inmunosupresión producida tanto por dexametasona o por edad avanzada en ardillas ²³⁸. La melatonina también incrementa la proliferación de LB y la respuesta TH 1 (por producción de IL-2 e IFN γ), decreciendo la respuesta TH 2 e IL-10 en ratones viejos ²³⁹. Por otro lado, la melatonina ha demostrado estimular la producción de IL-4 por parte de los LTH 2 en la médula ósea ²⁴⁰. El sueño temprano produce un balance de citoquinas inclinado hacia la LTH 1, mientras que la TH 2 domina durante el sueño tardío. Se observa también durante esta etapa del sueño, una abrupta caída en los niveles de LT CD 8+ productores de TNF α ²⁴¹ sugiriendo, de este modo, una correlación entre melatonina y respuesta de perfil TH 2 ²⁴².

En conclusión, la melatonina parece tener efectos duales en el sistema inmune y podría ser denominada como 'buffer' inmunológico debido a su gran adaptabilidad a los diferentes desafíos que se plantean en la complejidad del sistema inmune.

4.6 Melatonina en el ambiente periodontal

Sobre la base de los conceptos anteriormente abordados, y teniendo en cuenta la personalización de las terapias periodontales ²⁴³, se propondrán nuevas estrategias para la prevención y el control de la periodontitis. Dichas estrategias implicarán el control del estado inflamatorio y de enfermedades asociadas, como la diabetes, la obesidad ²⁴⁴, el tabaquismo y el alcoholismo crónico ⁷⁰. Es decir, que al controlar la respuesta inflamatoria asociada con la gingivitis (a través del desbridamiento mecánico y la quimioterapia adyuvante), el cambio resultante en el entorno subgingival reducirá el suministro de nutrientes a la microbiota subgingival (particularmente los patógenos periodontales

asacrolíticos que degradan los péptidos de colágeno a aminoácidos libres, que proporcionan una fuente de energía). Por lo tanto, al controlar o resolver la respuesta inflamatoria, es posible contener la infección y crear un ambiente propicio para la reversión de la disbiosis bacteriana, a una bacteria comensal comparable con la salud periodontal.

Dado que la periodontitis se relaciona con una inflamación promotora del crecimiento y del desarrollo de bacterias periodontopáticas, se debe controlar el estado inmunoinflamatorio para poder controlar el desarrollo de la biopelícula periodontopática. Por ello, se estudiará a la melatonina como agente quimioterápico adyuvante en las terapias periodontales básicas y correctivas.

Kara *et al.*, demostró las acciones protectoras de la melatonina en periodontitis inducida en ratas. Luego de la inducción de la periodontitis mediante la técnica de ligadura, se midieron diversos marcadores de inflamación y de estrés oxidativo. Se redujeron drásticamente la IL-1 β , TNF α e 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en el tejido gingival. Más aún, la melatonina estimuló la producción de glutatión ²⁴⁵.

Otro estudio similar de Arabaci *et al.* demostró la efectividad de la melatonina mediante varios marcadores. Luego de inducir periodontitis en ratas, obtuvieron muestras de sangre y mandíbulas. La melatonina redujo el marcador sérico de resorción ósea, el carboxilo-terminal del colágeno tipo I e incrementó la fosfatasa alcalina (FAL). Por otra parte, la resorción ósea alveolar y la mieloperoxidasa fueron notablemente mayores en el grupo con periodontitis sola. Más aún, el RANKL y la actividad de los osteoclastos fueron menores en los grupos tratados con la melatonina ²⁴⁶.

La melatonina también demostró efectividad en ratas con periodontitis y comorbilidades tales como la diabetes ²⁴⁷ y estrés oxidativo inducido por radiaciones ionizantes ²⁴⁸.

A su vez, en estudios clínicos realizados por Cutando *et al.* ^{249, 250} se demostró que la aplicación de la melatonina en el ambiente periodontal inflamado, reducía los biomarcadores de inflamación y aumentaba los de formación ósea.

En suma, la melatonina es ampliamente estudiada en el ambiente periodontal, con resultados prometedores para poder luego llevarlos a la práctica

4.7. La Melatonina modula la homeostasis ósea

La melatonina posee influencia en el remodelado óseo. Es así que se encontró una relación inversamente proporcional entre los picos de la melatonina en la fase nocturna y la resorción ósea^{18, 252}. Esto se justifica con el hecho de que genes de los osteoblastos también presentan aumentos y disminuciones siguiendo un ciclo de 24 h. Estos genes son inducidos por la melatonina. En ratones, *Runx2*, *Bmp2*, *Bmp6* y *Bglap* poseen un ritmo circadiano que coincide con el ciclo de luz-oscuridad. Sumado a esto, la proteína 'reloj' *Per2* también tiene un notable aumento durante la noche cuando los picos de melatonina son altos²⁵¹. Recientemente se descubrió la síntesis de melatonina siguiendo un ritmo circadiano en células de la médula ósea. La enzima clave para su síntesis, la AANAT, su forma activa, la P-AANAT y en menor medida la ASMT, tienen variaciones circadianas. Más aún, la cantidad de melatonina encontrada en homogenatos de médula ósea eran miles de veces mayores que los encontrados en glándula pineal de ratas²¹¹.

La melatonina ejerce funciones en la remodelación ósea principalmente por su influencia en el desarrollo y mantención de los osteoblastos. Esto es, mediante los receptores MT2, en MSCs, promueve su diferenciación a osteoblastos²⁵². Dichos osteoblastos suprimen la actividad de los osteoclastos mediante la secreción de osteoprotegerina. Sumado a esto, la melatonina neutraliza a los ROS que existen en el ambiente de resorción ósea, de esta manera también inhibe la diferenciación del osteoclasto⁶. Para lograr esto, la melatonina se une al receptor MT2, que, mediante la cascada de señalización vinculada a las MAPK, estas son la ERK1/2, p-38 o JNK, inducen la expresión de genes osteogénicos tales como *Runx2*, *Bmp2*, y *osterix* y *osteocalcina*. Las BMPs son críticas para la osteoblastogénesis. Las mismas se unen a los receptores de las mismas localizados en osteoblastos y fosforilan a las proteínas Smad. La melatonina también puede aumentar la producción de FAL. En un estudio, demostraron que este incremento es producido por la vía anteriormente descrita, esto es, MT2, MEK, ERK1/2²⁵³⁻²⁵⁵.

Más aún, la melatonina tiene inferencia en cuanto a la comunicación entre osteoblastos y osteoclastos. En una investigación reciente, se observó que la melatonina ejerce sus efectos inhibitorios en la osteoclastogénesis solo en los co-cultivos de MSCs humanas con monocitos de sangre periférica que estaban en contacto entre sí, a diferencia de las células que no estaban en contacto entre sí, solo sus citoquinas (*RANK-RANKL-OPG*) interactuaban a travez de un sistema de cultivo donde se separaban los dos tipos

celulares anteriormente mencionados. Este estudio confirmó también, la relevancia del receptor MT2 de melatonina en la diferenciación y de la cascada ERK1/2, ERK5. El aumento de MEK 1/2 ERK 1/2 inhibe la vía de PPAR γ . Esta última, es clave para que la MSC se diferencie a célula adipogénica y no osteogénica. Por otro lado, el MEK5/ERK5 aumenta la expresión de Runx2, NF κ B y GLUT4, esenciales para la diferenciación osteogénica²⁵⁴.

En resumen, se puede afirmar que la melatonina es una molécula extremadamente clave, para el proceso de la osteogénesis, sumado a su rol activo en la integridad de las células óseas (Figura 19).

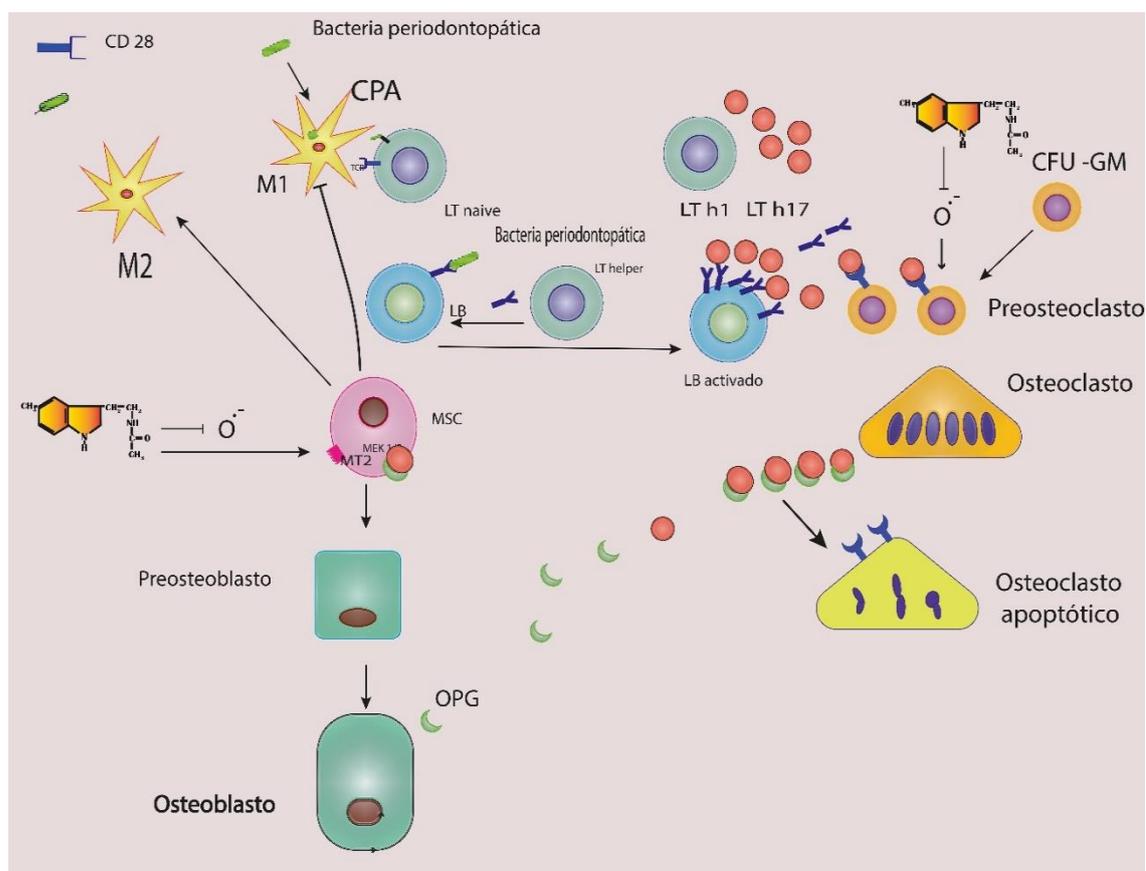


Figura 19. Efectos de la Melatonina y de las GMSCs sobre células inmunes y óseas. Las GMSCs estimulan la subpoblación macrofágica antiinflamatoria M2, a su vez que inhibe la subpoblación proinflamatoria. El anión superóxido es removido por la melatonina, impidiendo que el mismo destruya a las MSCs, a la vez que mediante el receptor MT2, promueve la diferenciación del osteoblasto. Dicho osteoblasto producirá OPG, la cual se unirá al RANKL, produciendo que el OC entre en apoptosis. El anión superóxido puede generar la diferenciación de OC con y sin mediación del receptor nuclear NF κ B. Las células T y B, estimuladas por la agresión bacteriana, producirán también RANKL. Por ende, la melatonina actuará, por un lado, protegiendo la integridad de las GMSCs ante la injuria oxidativa y, por el otro, promoviendo su diferenciación de OB, que disminuirá la proporción RANKL: OPG, favoreciendo así el anabolismo óseo. Ilustradora científica: Verónica M. Solá.

5. Trabajos previos de nuestro laboratorio

Nuestro laboratorio tiene vasta experiencia en el estudio de la melatonina y de los ritmos circadianos por cuanto ha estudiado los efectos de la desregulación de los mismos, a través de denervaciones y pinealectomías y de su repercusión en crías de rata ²⁵⁶⁻²⁵⁸. La alteración del status oxidativo y anímico en ratas con alteraciones de fase en los ciclos diurnos-nocturnos ²⁵⁹. Así mismo, se han estudiado los efectos del diazepam y de la melatonina en la regulación de dichos ritmos alterados ²⁶⁰. Más aún, se estudiaron las oscilaciones circadianas de síntesis de melatonina en células ganglionares de embriones de pollos ²⁶¹.

Dada la importancia del glutatión, como defensa antioxidante en las células, el laboratorio también ha estudiado las actividades protectoras de la melatonina en células intestinales, ante las injurias que implicaban la depleción de glutatión en las mismas. Dicho estudio investiga la depleción anteriormente mencionada, mediante el agregado de DL-buthionina sulfoximina (BSO) ²⁶². Más adelante, este modelo fue usado con algunas modificaciones mediante el agregado del glutamato (GLUT) *in vivo* e *in vitro* en células ganglionares, demostrando el efecto protector de la melatonina. Dicho modelo produce EO endógeno mediante la depleción de glutatión con el consecuente aumento de las ROS tales como anión superóxido (Figura 20). El GLUT, por un lado, inhibe la captación de cisteína, aminoácido limitante, clave para la síntesis de glutatión al mismo tiempo que aumenta la captación de iones Ca^{2+} . El BSO, por su parte, inhibe la enzima glutamato-cisteína ligasa, enzima clave y limitante en la síntesis del glutatión. Este aumento de las ROS desencadena la muerte celular por apoptosis ²⁶³. Este modelo nunca se probó en GMSCs, y como se mencionó anteriormente, la periodontitis está asociada, no solo al EO producido principalmente por los PMN, sino también a una depleción del glutatión en las células del ambiente periodontal ⁶.

En las últimas décadas, la melatonina ha sido estudiada como potenciadora de la diferenciación osteogénica, aunque no se conocen sus efectos sobre la subpoblación madre GMSCs, cuya función regenerativa es dicha diferenciación. En otras palabras, existe una necesidad de estudios que contribuyan al entendimiento del comportamiento de GMSCs en el daño relacionado al EO, de la melatonina como diferenciadora a células osteogénicas en dicha subpoblación madre y, por último, la influencia de este daño a la capacidad diferenciadora y al rol protector de melatonina que conducen a la realización de este trabajo de tesis.

Modelo propuesto de daño celular y de acción de la Melatonina

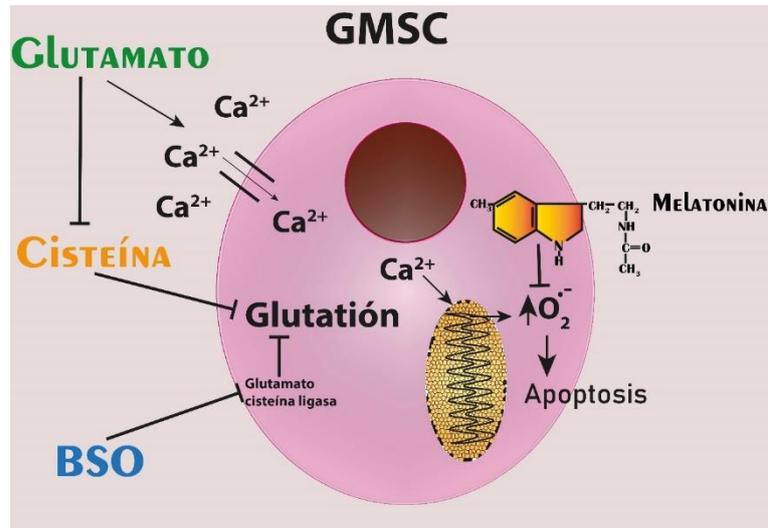


Figura 20. Representación gráfica del mecanismo propuesto para el modelo de daño celular relacionado al estrés oxidativo endógeno de BSO+Glutamato sobre las GMSCs. El glutamato, por un lado, limitaría el ingreso de la cisteína a la célula, y por otro, promovería el ingreso de Ca^{+2} a la célula, que en daría como resultado la apoptosis. En adición, el BSO inhibiría a la enzima clave para la síntesis del GSH. melatonina neutralizaría el exceso del anión superóxido y de esta manera rescataría a la célula de una muerte programada. Ilustración científica: Verónica M. Solá.

Hipótesis

La melatonina ejerce un efecto protector y favorece la diferenciación osteoblástica de células mesenquimales de origen gingival.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar el efecto antioxidante, antiapoptótico y diferenciador de la Melatonina (melatonina) sobre un sistema *in vitro* de células mesenquimales de encía de rata.

Objetivos específicos

Parte 1

- 1) Establecer y caracterizar cultivos primarios de células mesenquimales de encía de rata.

Parte 2

- 2) Desarrollar un modelo de daño celular en cultivos primarios de células mesenquimales de encía de rata.
- 3) Estudiar los efectos antioxidantes y antiapoptóticos de la melatonina en el modelo de daño celular establecido en células mesenquimales de encía de rata.

Parte 3

- 4) Promover y caracterizar la diferenciación de células mesenquimales de encía a osteoblastos utilizando melatonina.
- 5) Estudiar la influencia del daño celular del modelo desarrollado en el objetivo 2 en la diferenciación osteogénica de GMSCs y el rol protector de la melatonina en cada estadio.

Materiales y Métodos

1. Animales de laboratorio

Consideraciones bioéticas

Los protocolos utilizados para la experimentación con animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y el uso de animales de Laboratorio, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba [CICUAL-FCM. (RHCD 674/09)] en base a lo abordado en la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio del *National Institute of Health*, Directiva 86/609 Comunidad Económica Europea y otras. Las ratas sometidas a eutanasia fueron tratadas siguiendo las recomendaciones expuestas por la *American Veterinary Medical Association* (AVMA) en su Guía para la Eutanasia de Animales²⁶⁴. Para ello, se utilizó Isoflurano [1-cloro-2, 2, 2-trifluoroetil difluorometil éter; (Baxter health care)] y se cercioró el deceso de los animales mediante la dislocación cervical.

El modelo animal utilizado fue la cepa Wistar hembra de 150 ± 50 gr. de peso corporal. Se utilizaron diez ratas para realizar todos los experimentos. Las mismas estuvieron bajo un ciclo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad. La rutina de limpieza del bioterio es de 3 veces/semana. El bioterio posee temperatura y humedad controlada en la sala. El alimento balanceado (Pilar-Gepsa, Córdoba) y el agua fueron administrados en forma *ad libitum*. Dichas cepas proceden del bioterio de INICSA-UNC y fueron hospedadas en jaulas convencionales.

2. Tejido gingival para la realización del cultivo primario de GMSCs.

Luego de la eutanasia y bajo campana de flujo laminar, se aseptizaron los animales con etanol al 70% y se procedió a realizar el preotocolo según Gronthos *et al.*¹⁴⁰ con algunas modificaciones. Brevemente, se resecoó la encía vestibular y palatina superior e inferior con bisturí 15 c (Ribbel, India). Se eliminó el epitelio de las muestras y se enjuagaron los restos de sangre con PBS seccionándolo en trozos más pequeños. Luego, fueron colocados en una solución de tripsina al 0,6% (Gibco, USA) en agitación continua, a temperatura ambiente, durante tres horas. La agitación mecánica permitió que la solución penetrase en este tejido, caracterizado por ser muy fibroso, actuando de manera sinérgica con el efecto de disgregación enzimática.

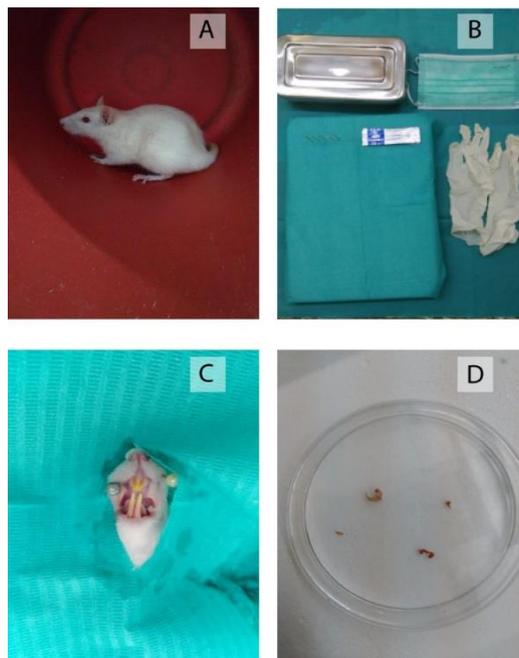


Figura 21 Secuencia quirúrgica para la obtención de encía de rata **A.** Rata hembra de 1.5 meses de edad **B.** Mesa de trabajo que aseguraba la asepsia en la escisión de la encía. **C.** Aislamiento absoluto del campo quirúrgico **D.** Trozos de encía ressecada y desepitelizada lista para su posterior procesamiento.

Una vez obtenidas las células en suspensión, se centrifugaron a 1000 rpm durante 6 minutos y el pellet de células fue resuspendido y trasladado a una botella de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio mínimo esencial (MEM, Invitrogen, USA) y SFB 10% (Natocor, Córdoba, Argentina) con gentamicina al 1% (Klonal, Argentina) en una estufa para cultivo celular a 37°C con 5% de CO₂ y humedad al 90%.

Cuando las células llegaron a una confluencia del 90% (pasaje 0, P0), se repicaron en una proporción de 1:2 con una solución de tripsina-EDTA 0,25% en PBS durante dos minutos. Para expandir las células y reducir el número de animales necesarios, todas las células del P1 fueron trasladadas a botellas de 75 cm².

3. Cultivos celulares

Los cultivos celulares fueron realizados en colaboración con el Laboratorio de Cultivo Celular, Instituto de Virología JM. Vanella, dirigido por el Bioq. Juan Javier Aguilar.

Los medios de cultivos fueron preparados según instrucciones del fabricante, y su esterilización se realizó mediante filtros de nitrocelulosa [0,22 µm (Jet Bio-Filtration Co.)]. Los suplementos y drogas de pequeño volumen fueron esterilizados con filtros para jeringas de nylon [0,22 µm, (Jet Bio-Filtration Co.)]. Las puntas para micropipetas [10 µl, 200 µl, 1000 µl; (Jet Bio-Filtration Co.)] y microtubos [1 ml, 1,5 ml; (Axygen Scientific)] fueron esterilizados por autoclave (descartable). Las pipetas graduadas de vidrio fueron esterilizadas a 180 ° C. Los tubos de reacción [15 ml, 50 ml; (Jet Bio-Filtration Co.)], placas de cultivo [p100, p150; (Greiner Cellstar, Sigma-Aldrich)], placas de múltiples pocillos [MW12, MW24, MW48, MW96; (Jet Bio-Filtration Co.)], y botellas para cultivo [T25, T75, (Jet Bio-Filtration Co.)] fueron descartables. El manejo de cultivos celulares se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad clase II (ESCO AC2-451), en condiciones de esterilidad con uso de guantes, barbijo y cofia.

Los cultivos utilizados fueron incubados en sus respectivos medios de cultivo en estufa de cultivo (Sanyo MCO 17 AC) a 37 °C, atmósfera saturada de agua y 5 % de CO₂. Para la cuantificación de células, se utilizó un hemocitómetro y para estimar la viabilidad celular general se utilizó el colorante vital Trypan Blue (Sigma, USA). Luego, para cada experimento se hizo el conteo celular correspondiente.

Los cultivos se sometieron a controles institucionales por contaminación con *micoplasma spp.*, mediante visualización fluorescente de Hoeschst 33342 [Molecular Probes, (Invitrogen)].

De algunos cultivos celulares primarios, se generó un *stock* criopreservado a -200 ° C en N₂ líquido. Brevemente, los cultivos de células adherentes fueron lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS) y tratados con Tripsina/EDTA (Gibco, Life Technologies) durante 4 min y dicha reacción enzimática se detuvo con SFB (Natocor, Córdoba, Argentina). Las células recolectadas en suspensión, fueron centrifugadas (Spectrafuge 24D) a 1000 rpm por 3 minutos, cuantificadas y resuspendidas en SFB con el aditivo del crioprotector Dimetil Sulfoxido [DMSO (Cicarelli, Argentina)] en crioviales (Tarsons). Dichos crioviales fueron atemperados a -80 °C durante 48 h antes de ser trasladados a tanque de nitrógeno para su almacenamiento (Taylor Wharton). Para su descongelado, los crioviales

fueron sometidos T° ambiente y su contenido inmediatamente volcado en botellas de cultivo celular de 25 cm² a densidad óptima acorde a la cuantificación de células viables. Se les adicionó MEM (invitrogen), Al día siguiente, al ver células pegadas, se retiraba todo el medio para evitar la toxicidad del DMSO y se lo reemplazaba por medio fresco (MEM+SFB 10%). Todos los experimentos se realizaron en dicho medio, con diversas modificaciones como se detallará más adelante. Previamente a cada experimento, se realizó un conteo celular mediante cámara de Neubauer, para lograr uniformidad en el número inicial en cada siembra.

Se monitorearon los cultivos todos los días por observación directa al microscopio óptico, observándose un crecimiento lento en los primeros días, acrecentando su velocidad a partir del día 7 u 8. Sólo se hizo cambio de medio en el día uno, en el cual adherieron a la botella de cultivo, a fin de enjuagar las células hematopoyéticas, principalmente eritrocitos. El medio se mantuvo igual en los subsiguientes días para favorecer los factores de crecimiento secretados por las células.

4. Análisis de la expresión de genes característicos de MSCs

Las células madre mesenquimales deben presentar marcadores positivos para CD 73, CD 105 y negativos para CD 45, CD 34¹⁴⁴. Es por ello que se procedió a realizar el análisis de los transcritos de RNAm codificantes para dichos marcadores de superficie. Esto se realizó mediante la reacción de la cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Todos los experimentos de RT-PCR fueron realizados en colaboración con el Dr. Adrian Farías del laboratorio de Enterovirus del INVIV, siguiendo un protocolo preestablecido para la extracción del ARNm²⁶⁵. La restante parte del protocolo se realizó de acuerdo a la caracterización de Yusop *et al.*²⁶⁶ para el diseño de los *primers* y las diferentes T° de *annealing*.

4.1. Extracción de ARNm

Para la extracción de ARNm se utilizó el método comercial EASYPURE RNA Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se colocaron 560 µl de buffer de lisis BB5 (Roche, Alemania) y se agregaron 200 µl de la suspensión de células, y se mezcló con vortex por 15 segundos. Luego se incubó a 56°C durante 15 segundos. A cada muestra se le agregó 240 µl de etanol (96-100%) y se mezcló con vortex nuevamente

durante 15 segundos. Y luego se incubó a T ° ambiente por 15 segundos. Posteriormente se transfirió la solución en la columna para luego centrifugarla durante 1 min. a 12000 G y se descartó el fluido. Luego se volvió a centrifugar durante 1 min. a 6.000 r.p.m. y posteriormente, se colocó la columna en un tubo nuevo de 2ml descartando el tubo con su filtrado. Se repitió el paso 6 (se centrifugó durante 1 min. a 6.000 r.p.m. y posteriormente, se colocó la columna en un tubo nuevo de 2ml descartando el tubo con su filtrado.) y luego se centrifugó el tubo durante 1 minuto a 12000 G para secar la columna. Finalmente, se descartó la misma, los ARNm totales fueron almacenados a -80°C hasta su posterior reacción de amplificación.

4.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc). Reacción de transcripción inversa (RT)

Los fragmentos de ADNc de CD 73, CD 105, CD 34, CD 45, se sintetizaron y amplificaron a partir de 10 µl de ARN, en presencia de 200 µl de la enzima transcriptasa inversa MMLV (Moloney Murine Leucemia Virus; Promega, Madison, WI), 0.2 mM de dNTPs, 10 µl de Inhibidor de RNAsas (RNase OUT; Invitrogen, Carlsbad, CA) y 10 pmol de “*random hexámeros primers*” (oligonucleótidos hexaméricos que hibridan al azar) o del oligonucleótido externo de polaridad negativa -K11as- en un volumen final de 20 ml. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 60 minutos y posteriormente colocadas en un baño a 65°C, durante 5 min. Las reacciones se realizaron en un termociclador (Biometra), con un paso de desnaturalización inicial de 94 ° C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94 ° C de templado de 30 ° C, 55 de paso de sellado de 30 ° C, 72 ° C de extensión de paso, y con un final de 72 ° C de extensión durante 7 minutos. Dichas condiciones se aplicaron a los cebadores CD 34 y CD 45 mientras que a CD73 y CD105, utilizaron una temperatura de *annealing* de 52 ° C.

Se utilizaron los siguientes *primers* sintetizados por IDT (integrated DNA technologies):

CD 73: F: 5' TCCCGCGGCTGCTACGGCACCCAAGTG-3',

R: 5 ACCTTGGTGAAGAGCCGGGCCACGCCG-3'

CD 105 F: 5'-ACATGGTGCCACACCCGCAGCTGGCA-3''

R: 5'-CACTGCCACCACGGGCTCCCGCTTGCT-3'

CD 45: F: 5'-AGCAATACCAGTTCCTCTATGA-3'

R: 5'-TCCGTCCACTTCGTTATGA-3

CD 34: F: 5'-GTCACACTGCCTACTACTTC-3'

R 5'-TCCTCGGATTCCTGAACAT-3'

4.3. Electroforesis en gel de agarosa

La detección de los productos de la amplificación, se realizó por electroforesis en gel de agarosa, empleando 1,4 g de agarosa (Sigma, USA) y 70 ml de buffer TAE 1X [(Tris base, ácido acético glacial y EDTA) (Cicarelli, Argentina)]. Se reveló con 5 µL/ml de bromuro de etidio (Sigma, USA) y se colocó en el soporte para su gelificación. Se sembraron 15 µl de cada muestra y 4 µl del marcador 100 pb de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, EUA) y se aplicaron 95 V con una corriente de 400 mA durante 20 min.

5. Ensayo de la capacidad de Unidades formadoras de colonias

Para este ensayo, en donde se mide la capacidad clonogénica de las células, se sembraron 150 células por pocillo en una placa de 12 pocillos con 2 ml de medio basal ¹⁴³. Las células se tiñeron a los 7 y 10 días con cristal violeta y se midió la capacidad de formación de UFCs a través del conteo de 50 células como mínimo por colonia con lupa de MO a 10 X. Se realizaron tres experimentos independientes.

Se utilizó este mismo ensayo para medir la capacidad clonogénica con el modelo de daño celular y con la diferenciación osteogénica, midiendo las UFCs con los diferentes medios a los diez días.

6. Ensayo de la herida

La migración celular se evaluó mediante el ensayo de la herida. El ensayo de herida o rasguño es un ensayo simple y reproducible. Comúnmente se utiliza para medir la migración celular básica. Las células crecen hasta confluencia y se introduce una delgada "herida" rascando con una punta de pipeta en la monocapa. Las células en el borde de la herida se polarizan y migran hasta cerrar la misma. Las ventajas de este ensayo son que no requiere el uso de quimioatrayentes o gradientes específicos generando una fuerte respuesta migratoria direccional ¹⁴³.

Para ello, se sembraron $3,5 \times 10^5$ células en placas de 12 pocillo con el medio basal y las condiciones de cultivo anteriormente descritas. Luego de 24 horas de incubación, se realizó una cicatriz con un *tip* de una pipeta de 200 μ l la cual dejó una marca de 400 ± 25 μ m de longitud y se tomaron imágenes a varios tiempos (24 h., 48 h. y 72 h.) con el microscopio (Olympus Motorized Inverted Research IX81. Imaging Software: Cell M). Sobre las fotos tomadas se midió en μ m la longitud de la herida en tres puntos diferentes por cada pocillo y se sacó un promedio en cada una de las fotos tomadas. Se realizaron tres experimentos independientes.

Este mismo ensayo se utilizó también para los experimentos del modelo de daño celular y diferenciación osteogénica, con los medios correspondientes a cada ensayo tal como será descrito posteriormente, con la salvedad de que la herida se midió a las 72 horas.

7. Ensayo de XTT

Para evaluar la proliferación celular se empleó el ensayo de reducción enzimática del XTT. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de 48 pocillos con medio basal. Se midió la proliferación en diferentes tiempos (1, 7, 14, 18 días) con el ensayo de reducción enzimática del XTT [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 2H-tetrazolio - 5-carboxianilida] (Sigma, EUA) mediante el agregado de solución de 0,5g/l de XTT en PBS, con la adición de menadiona en el momento del ensayo (Sigma, 10 mM en acetona) hasta una concentración 1 mM e incubando en oscuridad a 37°C por 2,5 horas. En ensayo de XTT es dependiente de su reducción por parte de las succinato deshidrogenasas mitocondriales de células viables, originando como producto, sales de formazan hidrosolubles que representan la cantidad de células viables²⁶⁷. Luego, se transfirieron 100 μ L de sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos y se midió en un lector de ELISA a 450 nm. Los resultados se normalizaron referidos al día 1 de proliferación. Se realizaron tres experimentos independientes.

Para medir la proliferación celular con los medios osteogénicos, como se detallará más adelante, también se utilizó la técnica de XTT. Los datos se presentan como una regresión lineal de la relación entre diferenciación y proliferación, los cuales siempre fueron normalizados con los controles OS-.

Modelo de daño celular relacionado al estrés oxidativo

8. Determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria

Para determinar la mínima concentración sinérgica de las drogas BSO (Sigma, USA) y glutamato (Cicarelli, Arg.) que produzcan un daño a las células, se realizó la prueba de microdilución, comúnmente conocida como “tablero de ajedrez” según la metodología de Wei *et al.*²⁶⁸ y el *National Committee for Clinical Laboratory Standards*²⁶⁹. En dicho ensayo, se determinó la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF).

Se usaron placas donde se sembraron 2×10^5 de GMSCs con medio basal. Se dejó reposar toda la noche para que se establecieran en las placas. En las filas se colocaron las concentraciones finales de GLUT (300 μ M, 400 μ M, 600 μ M, 800 μ M, 2000 μ M, 4000 μ M y 8000 μ M) y en las columnas, concentraciones finales de BSO (100 μ M, 300 μ M, 500 μ M, 700 μ M, 900 μ M, 1100 μ M y 1300 μ M). Se incubaron durante 48 horas en la estufa de cultivo celular y se midió su viabilidad mediante la técnica de rojo neutro (RN). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se calculó la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF), considerando la CIF de las drogas solas o combinadas, donde CIM, es la concentración inhibitoria mínima: Esto es, la dosis mínima requerida para inhibir la viabilidad celular.

$$CIF = \left(\frac{CIM_{BSO} + GLUT}{CIM_{BSO}} \right) + \left(\frac{CIM_{BSO} + GLUT}{CIM_{GLUT}} \right)$$

Los valores de $CIF \leq 0,5$ corresponden a un efecto sinérgico, $CIF > 4$ indica antagonismo y valores intermedios ($0,5 < CIF \leq 4$) implican un efecto indiferente.

9. Técnica de rojo neutro

La técnica de captación de rojo neutro (RN), sirve para determinar la viabilidad, ya que las células inviables son incapaces de captar el RN²⁷⁰. Dicho rojo neutro es un colorante supravital, captado por organelas con membranas (lisosomas, endosomas, entre otras) que poseen un gradiente de pH diferente en células viables no lesionadas²⁷¹.

Se incubaron las células con una solución de RN [3-Trimethyl-2,8-fenazinediamina (Gybco)] al 1% durante una hora en una estufa de cultivo celular. Luego se extrajo el colorante con una solución de alcohol: agua: ácido acético (50:49:1) y se leyeron las

placas en el lector de ELISA a 540 nm. Los resultados se expresaron como un porcentaje de los valores de los controles.

10. Técnica de cristal violeta

Se fijaron las células de las placas con etanol al 99 % (Cicarelli, Argentina), y se colocó una solución de cristal violeta al 1 % (Anedra, Argentina).

11. Determinación del daño celular a diferentes tiempos

Para establecer el mínimo tiempo necesario para observar el daño en las células, se sembraron placas con 3×10^5 de células con medio basal y se dejaron reposar toda la noche para que se establecieran en las placas.

Luego se le adicionaron las dosis de BSO+GLUT determinadas por la CIF (300 μ M para ambas drogas) y se midió la viabilidad mediante la técnica de rojo neutro (RN) a las 24 h., 48 h., 72h. y 96 h. tal como se describió anteriormente, y los resultados se presentan como un porcentaje de los controles de cada tiempo medido. Se realizaron tres experimentos independientes.

12. Determinación de la concentración de anión superóxido

Se sembraron en placas de 24 pocillos 5×10^5 GMSCs con medio basal y se les permitió reposar toda la noche, para que adhieran al plástico. Luego se les añadieron las soluciones de BSO 300 μ M, GLUT 300 μ M y su combinación durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se midió el O_2^- por reducción de sales de nitro blue de tetrazolium (NBT) (Sigma, USA), el cual es una solución incolora que ante la presencia de O_2^- se reduce y forma una sal insoluble de color azul.²⁷²

Para ello, se lavaron las células con PBS y se les colocó una solución de NBT de 0,1 mg/ml con PBS y dimetil sulfóxido (DMSO) al 1 % y se las dejó incubar durante 1 h en estufa de cultivo celular. Posteriormente, se frenó la reacción con HCl 0.1 M durante 15 minutos a T ° ambiente. El medio fue removido y lavado con PBS para luego extraer las sales de formazán de las células con una solución de DMSO y KOH 2M, en una proporción 50:50 en agitación continua durante 10 minutos y luego se leyó la densidad óptica en el lector de ELISA a 570 nm. Los resultados se expresaron como un porcentaje referido a los valores de los controles con medio basal solo.

Para estudiar la capacidad antioxidante de melatonina, sobre el modelo de daño celular establecido en el objetivo 2, se sembraron 3×10^5 de células en placas de 48 pocillos

con los siguientes grupos: control con medio basal, BSO, GLUT (300 μM), melatonina (500 μM) y sus combinaciones. Reposaron 48 h. y se midió la concentración de anión superóxido como se detalló en la sección 4.4. Dichos estudios se hicieron por cuadruplicado.

13. Determinación de toxicidad de melatonina

Para estudiar la seguridad del uso de melatonina sobre las GMSCs, se sembraron 3×10^5 de células en placas de 48 pocillos y el reposo nocturno permitió que se adhirieran al plástico.

Para preparar la melatonina (Sigma, USA), se la diluyó primero en etanol al 99% en una proporción de 0,1% y luego se la diluyó en MEM, añadiéndoles a las células las siguientes concentraciones: 1000 μM , 500 μM , 200 μM , 40 μM , 8 μM , 0,160 μM , 0,032 μM , durante 48 h. Luego se midió la viabilidad con RN de la misma forma descripta anteriormente en la sección 4.2. Los datos se expresan como un porcentaje de los controles con medio basal solo. Se realizaron cuatro experimentos independientes.

14. Técnica inmunohistoquímica TUNEL

Para estudiar la actividad antiapoptótica de la melatonina, en una placa de 24 pocillos, se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por pocillo con el control de células, BSO y GLUT solos o combinados junto con melatonina y se dejaron incubar por 48 h. Dichos ensayos se hicieron por triplicado.

Se identificaron las células apoptóticas utilizando la técnica de marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL por sus siglas en inglés) para detectar fragmentación de ADN marcando el fragmento terminal de los ácidos nucleicos [In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)]²⁶³.

Luego de fijar las células con paraformaldehído al 4% (Cicarelli, Argentina), se incubaron con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinasa K (Merck, USA) por 15 min. Se enjuagó con agua destilada e incubadas con una solución de peróxido de hidrogeno al 3% en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de enjuagar 3 veces con PBS por 5 minutos, se colocaron las placas en cámara húmeda a 37°C por 60 minutos con el reactivo de TUNEL.

Después se colocó diaminobenzidina (DAB) durante 5 minutos. Las muestras fueron contrastadas con verde de metilo al 0,5%. Se sacaron 10 microfotografías al azar

de diez campos por cada grupo a un aumento de 20X (Olympus Motorized Inverted Research IX81. Software de imagen: Cell M) y se calculó el índice apoptótico (IA) el cual consiste en un porcentaje de células, con núcleos apoptóticos, por sobre el total de 100 células utilizando el software Image J del NIH con el método ciego simple y los datos fueron así expresados.

Por último, se midió la capacidad protectora de la melatonina con el ensayo de las UFCs y de la herida. Toda la metodología para estos experimentos fue descrita en el apartado 3.2 y 3.3, con la salvedad de que en este proceso se midió en células sometidas a los diferentes medios con drogas y con tiempos establecidos para el modelo de daño celular.

15. Protocolo de diferenciación osteogénica

Para producir la diferenciación osteogénica *in vitro*, se sembraron 3×10^5 células en placas de 48 pocillos en donde se colocaban los siguientes medios: basal o no osteogénico (OS-), el cual consistía en el medio de cultivo basal descrito en el apartado 2.2. Por otro lado, el medio osteogénico (OS+) contenía medio basal con 10 nM de dexametasona (Sigma), 20 mM de β -Glicerofosfato (Sigma, USA), y 50 μ M ácido ascórbico (Sigma, USA).

La dexametasona es un adrenocorticoide sintético que posee actividades antiinflamatorias, inmunosupresivas y reguladoras del Ca^{2+} sanguíneo. A concentraciones fisiológicas (10 nM) promueve la diferenciación osteogénica *in vitro* vía la MAPK que activa al gen Runx 2, crítico para la diferenciación osteogénica²⁷³. El β -Glicerofosfato es utilizado como sustrato de fosfato orgánico de la fosfatasa alcalina ósea, para la producción de fosfatos inorgánicos para la posterior constitución de cristales de hidroxiapatita por parte de las células²⁷⁴. Por último, el ácido ascórbico, actúa mediante la hidroxilación de la prolina y lisina, aminoácidos claves para la síntesis de colágeno por parte de las células osteogénicas²⁷⁵.

En un primer momento, se realizó una curva donde se midió la diferenciación osteogénica en los días 1, 6, 12, 14, 18, 20 y 22 con el medio OS+ y el OS- como control. Los resultados se expresan como un porcentaje del medio OS-.

Una vez establecido el tiempo para el protocolo de diferenciación, se procedió a evaluar la capacidad de diferenciación osteogénica de la melatonina tanto al medio OS- y OS+, se le añadió melatonina 50 Nm, quedando, por consiguiente, cuatro medios

experimentales [(OS-), (OS-/MEL), (OS+), (OS+/MEL)]. Se preparó una solución madre de melatonina 5 mM en etanol al 99% (Cicarelli, Argentina) que se dejó en el freezer a -20°C.

Se las sometió a las células bajo estos medios durante 18 días, cambiando a los mismos cada 2 o 3 días durante el protocolo de diferenciación ²⁵³.

Para medir la influencia del daño celular establecido en los objetivos específicos 2 y 3 sobre las células, se estudió la relación entre el daño celular en la diferenciación celular osteogénica y, cómo ese daño afecta en diferentes estadios de esta diferenciación y si existe alguna diferencia en dañar a células indiferenciadas que a células que ya están comprometidas al linaje osteogénico.

Los experimentos fueron realizados por sextuplicado en placas de 48 pocillos, donde se sembraron $2,5 \times 10^5$ células. Las placas contenían medio OS-/MEL o bien medio OS+/MEL. A las placas se les adicionó en los diferentes estadios del protocolo, las soluciones de BSO+GLUT 300 μ M con y sin melatonina 500 μ M. Estos medios fueron colocados en las primeras 48 h. de iniciado el protocolo (Días 0-2), durante el estadio medio del mismo (Días 9-11) y en las últimas 48 h. previas a finalizar el protocolo (Días 16-18). Una vez transcurridas las 48 h. de exposición al daño celular, se cambiaban los medios ya sea OS-/MEL u OS+/MEL -coincidiendo con el recambio de medios periódicos que se realiza durante el protocolo- y se finalizó el mismo a los 18 días.

A su vez, en placas de 48 pocillos, se sembraron $2,5 \times 10^5$ células y se colocaron los medios OS+ y las drogas BSO y GLUT (300 μ M) por separado y se midió la diferenciación en los mismos momentos que en el ensayo descrito previamente. La viabilidad se midió con RN y la diferenciación osteogénica con alizarina roja (AR). Los datos se presentan como un porcentaje de la viabilidad de los grupos OS-.

16. Validación de la técnica de Alizarina Roja

La técnica de AR es utilizada para determinar, tanto en forma cualitativa como cuantitativa, mediante espectrofotometría, la presencia de depósitos de calcio en las células de una línea osteogénica. Es un marcador de primeras etapas de mineralización de matriz extracelular inorgánica en las células óseas.

Para demostrar que el medio OS+ por sí solo no produce la precipitación de los cristales de Ca^{2+} , se procedió a colocar este medio en una capsula de Petri bajo las mismas condiciones que las células, es decir, en estufa de cultivo celular durante 18 días. A partir

de lo cual se siguió exactamente el mismo protocolo que para las células fue anteriormente descrito.

En la fig 22 A se podrá observar el AR sobre la cápsula de Petri y en la Fig 22 B, se podrá apreciar que el AR dio negativo.

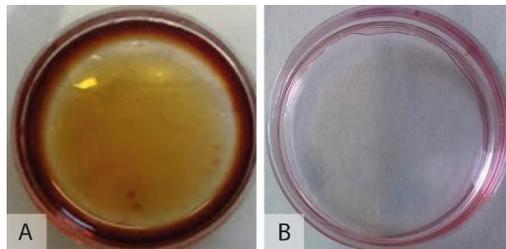


Figura 22 Validación de la técnica de Alizarina Roja. A. Cápsula de Petri con la solución de AR. B. Cápsula de Petri una vez enjuagada la solución de AR.

17. Técnica de alizarina roja

Para medir la diferenciación osteogénica mediante los depósitos de los cristales de Ca^{2+} , precipitados en los pocillos, se retiraron los medios de las placas y se enjuagó con abundante PBS para luego fijar con etanol al 99% (Cicarelli, Argentina) durante 10 minutos. Transcurridos los mismos, se enjuagó nuevamente con PBS y se colocaron 100 μl de una solución de alizarin red 40 mM (AR) (Anedra, Argentina). Se permitió que actúe por 20 minutos para luego enjuagarse cuatro veces con H_2O bidestilada.

Para su análisis cuantitativo, se diluyó el colorante con 250 μl de ácido acético al 10% y se midió que el pH de la solución estuviera entre el 4.1-4.5. Una vez confirmado esto, se midió en lector de ELISA a 405 nm. La densidad óptica representa la cantidad de cristales de hidroxapatita. Los resultados se expresaron como un porcentaje referido a los valores de los controles (OS-).

18. Medición de actividad de fosfatasa alcalina

Se realizó el protocolo de diferenciación anteriormente descrito con los medios OS-, OS-/MEL, OS+, OS+/MEL, para proceder a medir la actividad de la FAL.

La FAL es considerada un marcador temprano de diferenciación y actividad osteogénica ²⁵⁵. Esta enzima se considera un marcador fenotípico en líneas celulares osteoblásticas tales como la SaOS-2 ²⁷⁸. La FAL se encuentra ampliamente distribuida en tejidos óseo donde hidroliza el enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico (pH óptimo entre 9 y 10), liberando un fosfato inorgánico.

Como sustrato de la fosfatasa alcalina se utiliza un compuesto artificial, p-Nitrofenil- fosfato (Sigma), que, al poseer un resto orgánico con un grupo fosfato unido, puede ser reconocido por la enzima. El sustrato al ser hidrolizado origina un producto, el p-nitrofenol, compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe una longitud de onda de 570 nm, por lo que su aparición en el transcurso de la reacción puede observarse colorimétricamente

Concluido el experimento, se retiraron los medios y se incubaron las células 2 h. en una solución de 100 ml de tris maleato pH 9.2 + 20 mg de NBT para determinación de FAL (Sigma). Para la extracción del colorante se utilizó 200 µl de DMSO y 10 µl de KOH 2 M. Los resultados se expresaron como un porcentaje referido a los valores de los controles (OS-). Se realizaron cuatro experimentos independientes.

19. Análisis estadístico

Los experimentos que se presentan fueron repetidos al menos tres veces, con muestras por triplicado o sextuplicado en cada grupo. Los gráficos representan las medias de los experimentos y las barras, su desviación estándar.

La distribución normal de los datos se verificó utilizando el test de Shapiro Wilks modificado y se analizaron usando los test de ANOVA de una y dos vías y *post hoc* de Tukey, también el test de regresión lineal. Se estableció un valor de significación de $<0,01$ y $\leq 0,05$ (Software GraphPad Prism versión 6, San Diego, California, EE.UU.).

Resultados

Capítulo I: Obtención de cultivos primarios de GMSCs de encía de rata

1.1. Establecimiento de cultivo primario de GMSCs

A fin de comenzar con los experimentos de GMSCs, mediante el cultivo primario de encía de rata, se realizó una técnica mixta de disgregación mecánica y enzimática con una solución de tripsina al 0,6 %. La misma demostró alta predictibilidad y efectividad. El tejido gingival luego de pasar por este proceso, desprendió aproximadamente 1×10^4 células. Finalmente, las células pudieron establecerse y, de esta manera, formar monocapas luego de un promedio de 15 ± 2 días. Las células demostraron adherencia y una forma ahusada.

Se observaron las células adheridas al plástico con un microscopio óptico invertido al 20X. Se registró la evolución de los cultivos, y los cambios en su morfología.

Fueron células adherentes, con forma ahusada, fibroblastoide, lo que las diferenció de células hematopoyéticas (Figura 23).

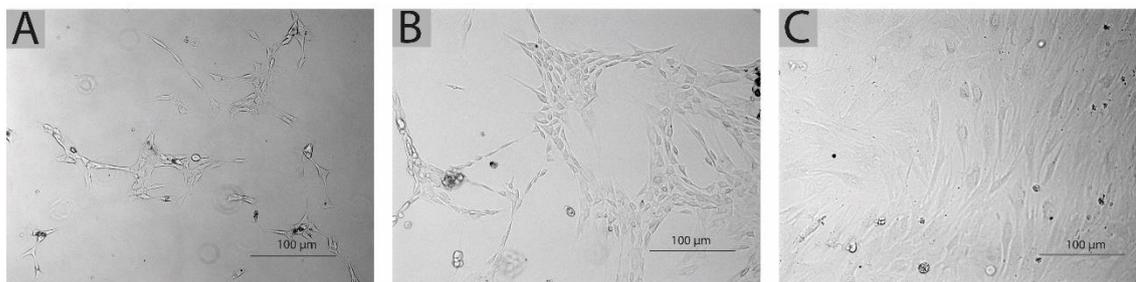


Figura 23. 1. Imágenes representativas de cultivos primarios de GMSCs derivadas de rata. Las células alcanzaron una confluencia a partir del cultivo primario a los 15 ± 2 días. **A.** Cultivo al día 1. **B.** Cultivo al día 7. **C.** Cultivo día 15. Aumento 20X.

1.2. Caracterización de las GMSCs

Las células aisladas, fueron evaluadas en una primera instancia, al pasaje número 3 (P3), en búsqueda de transcritos de marcadores de superficie característicos de las MSCs mediante la técnica RT-PCR. Dichos transcritos fueron CD 73, CD 105, y para células hematopoyéticas, CD 45 y CD 34. Se observó, no solo la expresión de los marcadores de mesenquimales, sino también su conservación hasta el pasaje número 9 (P9), como mínimo (Figura 24).

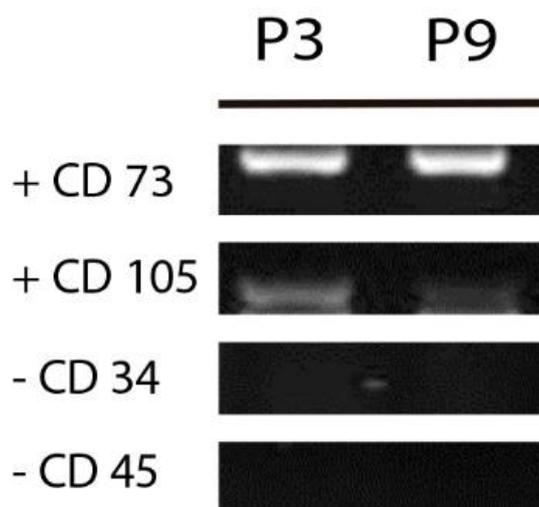


Figura 24. Gel representativo del perfil transcripcional de las GMSCs. Se observa que las células expresan marcadores positivos para MSCs, (+CD73, +CD105) y negativos para células hematopoyéticas (-CD34, -CD45). Dichos marcadores se mantuvieron constantes entre pasajes.

1.3. Capacidad migratoria y proliferativa de las GMSCs

Con el objeto de estudiar la capacidad clonogénica de las células aisladas, se realizó el ensayo de UFCs. Se puede observar que en el día 7 hay 10 ± 5 UFCs. Esto se ve aumentado a casi el doble en el día 10, denotando su alta capacidad de replicación (Figura 25).

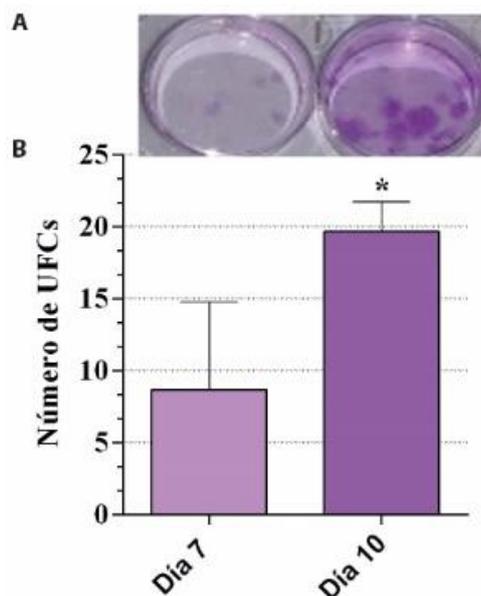


Figura 25 Cantidad de UFCs. A. Fotografía representativa de los cultivos para el ensayo de UFCs con medios B. Gráfico de UFCs. El gráfico representa tres experimentos independientes con un n de cuatro y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. Medio OS- vs. OS+ y OS+/MEL (* $p < 0,001$). Medio OS-/MEL vs. OS+ y OS+/MEL (** $p < 0,001$).

La capacidad migratoria es una característica funcional de las GMSCs. Por ello, se procedió a evaluarla mediante un ensayo de herida. Se observó que en el tiempo 0, la herida medía $450 \pm 25 \mu\text{m}$, las células próximas a la herida se mantuvieron unidas a cada lado de la cicatriz generada. A las 24 h. se podía observar el comienzo de la polarización de algunas células aisladas, tal como es señalado con flechas negras en la figura 26 B. Las células de cada lado de la herida a las 48 h. mostraban proximidad entre sí, para finalmente cubrir la herida de modo completo a las 72 h (Figura 26).

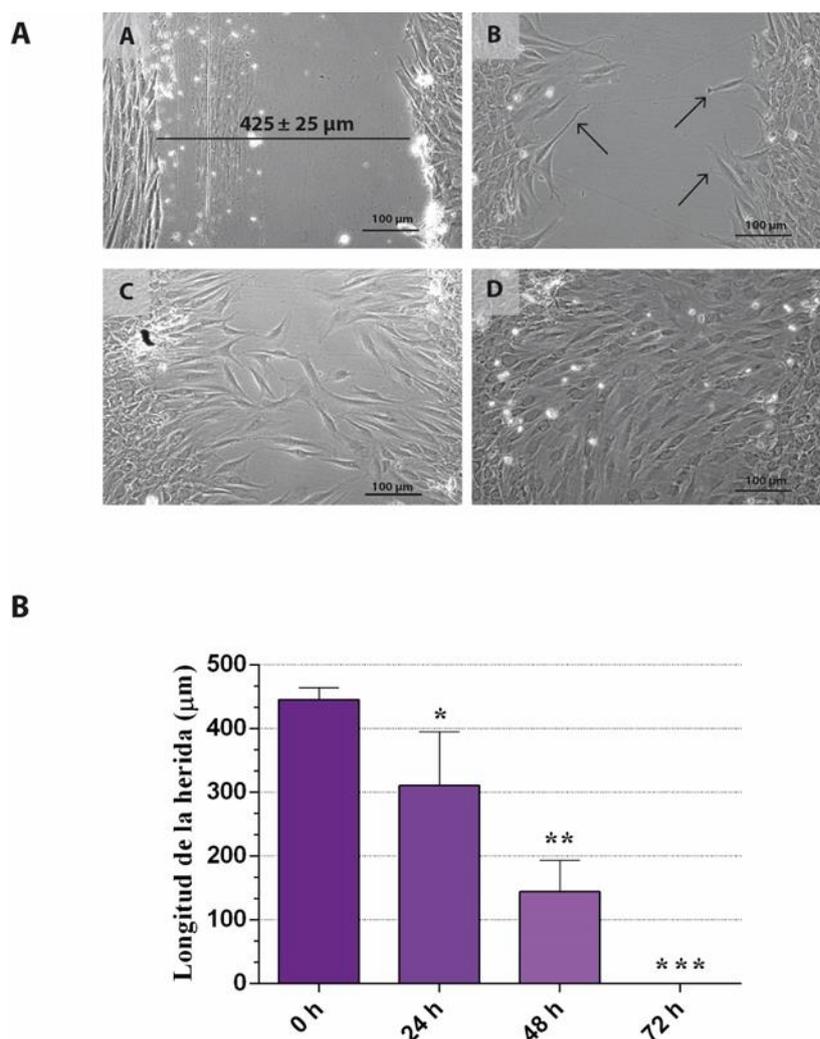


Figura 26 A. Imágenes representativas del ensayo de la herida. Las microfotografías representan el promedio de tres experimentos tomados en el transcurso de 72 horas. **A.** tiempo 0 h. Se puede observar la herida con bordes definidos. **B.** tiempo 24 h. se observan las células con desplazamiento horizontal sobre la herida. **C.** tiempo 48 h. se observa un número mayor de células desplazadas, ocupando la superficie de la herida. **D** tiempo 72 h. Cierre completo de la cicatriz. Aumento **20X**. **B Medición de la cicatriz en µm.** Las barras representan tres experimentos independientes con un n de tres y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey ($p < 0,01$) se pueden observar diferencias con respecto a las 0 h. (*), 24 h. (**), y a las 48 h. (***).

A fin de profundizar con las características funcionales del cultivo aislado, se evaluó su proliferación mediante el ensayo de XTT. Se observa un aumento en la proliferación celular a partir del día siete, que luego se amesetó hasta el día 18 (Figura 27).

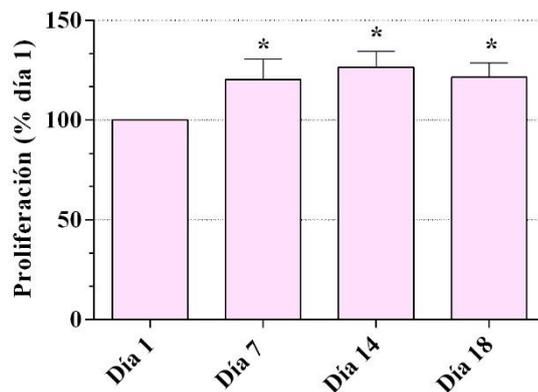


Figura 27. Ensayo de Proliferación medida con XTT sobre las GMSCs. El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. Se ven diferencias con respecto al día 1 (* $p < 0,01$) luego no se observan diferencias en los días 7, 14 y 18.

Capítulo II: Efecto protector de la Melatonina

2.1. Determinación de la concentración y tiempo de acción citotóxico de BSO y GLUT como modelo de daño celular

El ensayo de microdilución, comúnmente conocido como “tablero de ajedrez”, resulta útil para determinar si las combinaciones de drogas son sinérgicas, antagonistas o indiferentes. A continuación, se buscó si existe sinergia entre el BSO y GLUT, y su mínima dosis para lograrlo. En este modelo de GMSCs, es desconocida la mínima dosis necesaria para lograr por lo menos el 50% de pérdida de viabilidad.

Se observa que la BSO administrada sin acompañante, a bajas y altas dosis, no afecta la viabilidad celular medida mediante la técnica de RN. En forma contraria, el GLUT, produjo una disminución de la viabilidad celular del 60 %, a partir de una concentración de 4000 μM (Figura 29 A). La concentración mínima de drogas que produjo el mayor daño, fue la combinación de BSO + GLUT a 300 μM . Esto permitió inferir que son sinérgicas y se corroboró mediante la fórmula previamente detallada, siendo el resultado 0,075. En la figura 29 B se observa la representación gráfica de la viabilidad de las células con algunas concentraciones elegidas para el ensayo de microdilución. En el caso del GLUT 600 μM se observa una diferencia significativa con respecto a los valores basales. Esto, sin embargo, no disminuye la viabilidad a más del 50%. Todas estas dosis cuando son acompañadas por el BSO aumentan dramáticamente la muerte celular, tal como se aprecia en la figura 28 B. El GLUT 800 μM de manera individual origina una gran pérdida de viabilidad, y en este caso es indistinto el agregado o no de BSO.

Todos estos datos en conjunto, demuestran que las GMSCs son muy sensibles al GLUT y que se necesitan muy bajas dosis de BSO y GLUT para lograr un modelo de daño relacionado al estrés oxidativo.

Por microscopia óptica se evidenció el ostensible daño producido por las concentraciones anteriormente mencionadas (Figura 28). De esta forma, se fijaron las concentraciones a utilizar en los siguientes experimentos, es decir BSO y GLUT a concentraciones de 300 μM .

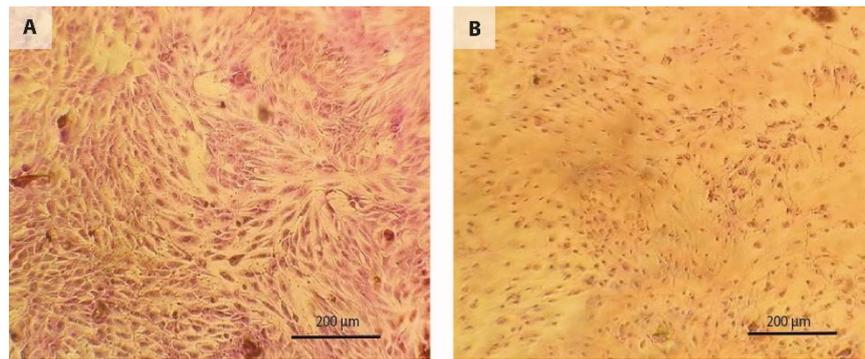
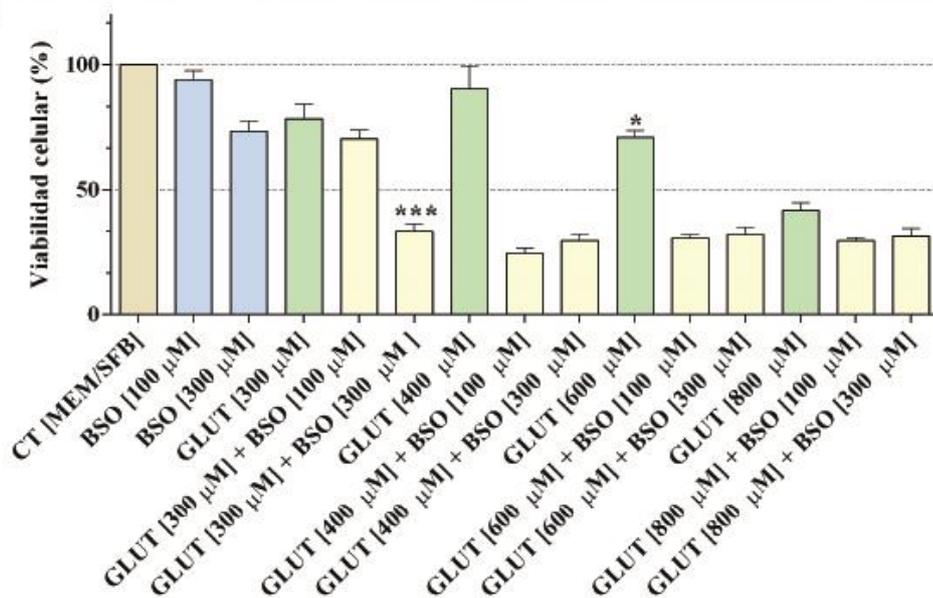


Figura 28. Imágenes representativas del daño celular provocado por BSO + GLUT. Las células fueron teñidas con cristal violeta. A Control B. BSO 300 μ M + GLUT 300 μ M. Aumento 10X.

A

		GLUT							
		300 μ M	400 μ M	600 μ M	800 μ M	2000 μ M	4000 μ M	6000 μ M	
Control		95	87	74	42	43	41	37	
BSO	100 μ M	90	67	27	29	29	34	35	35
	300 μ M	70	34	30	32	32	34	33	34
	500 μ M	63	31	30	32	33	34	33	32
	700 μ M	75	29	30	34	30	32	35	35
	900 μ M	70	31	28	29	32	34	33	36
	1100 μ M	71	30	29	28	32	33	33	36
	1300 μ M	78	30	30	30	34	32	30	35

B



Resultados

Figura 29. Determinación de la dosis de BSO y GLUT. A. El cuadro está representado por columnas (dosis de GLUT) y filas (dosis de BSO). La viabilidad > 60% es señalada en rosa. La viabilidad <50% con las dosis mínimas de BSO y GLUT es señalada en amarillo. **B Gráfico con los datos más representativos del ensayo de microdilución.** El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey Consideré como una sola variable al tratamiento (sea BSO, GLUT o combinados). Se observan diferencias de la combinación de BSO+GLUT 300 μ M ($p < 0,01^{***}$) con respecto al grupo control y el GLUT 600 μ M reduce la viabilidad significativamente ($p < 0,01^*$) comparado con los controles.

Una vez establecidas las dosis a utilizar, se determinó el tiempo mínimo en el cual se produjo el mayor daño celular. Se observa que el mismo se produjo a las 48 h., sin encontrar diferencias significativas a las 72 h. y 96 h. (Figura 30). De esta forma, se estableció el tiempo de exposición al dúo BSO + GLUT 300 μ M por 48 h.

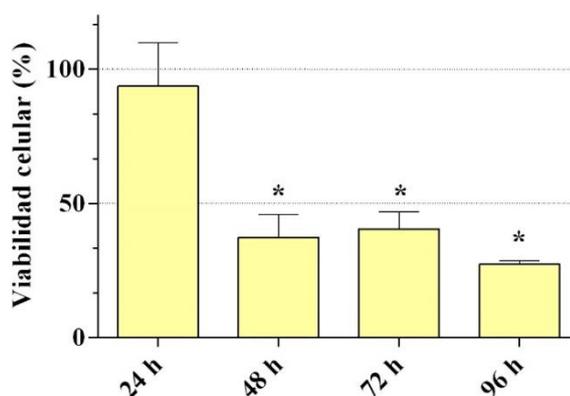


Figura 30. Viabilidad celular ante el efecto de BSO + GLUT 300 μ M a diferentes tiempos. El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. Se observan diferencias significativas con respecto a las 24 h. ($p < 0,01^*$), no hallándose diferencias una vez pasadas las 48 h.

2.2. Determinación de la producción de anión superóxido en el modelo de daño celular

Las concentraciones de anión superóxido se midieron a fin de establecer si el daño celular observado previamente en los ensayos de microdilución, se encuentra relacionado con aumento del estrés oxidativo. En efecto, la combinación de BSO y GLUT 300 μM suscitó un aumento de $\text{O}^{\cdot-}_2$ con respecto a los controles y a las drogas por separado (Figura 31).

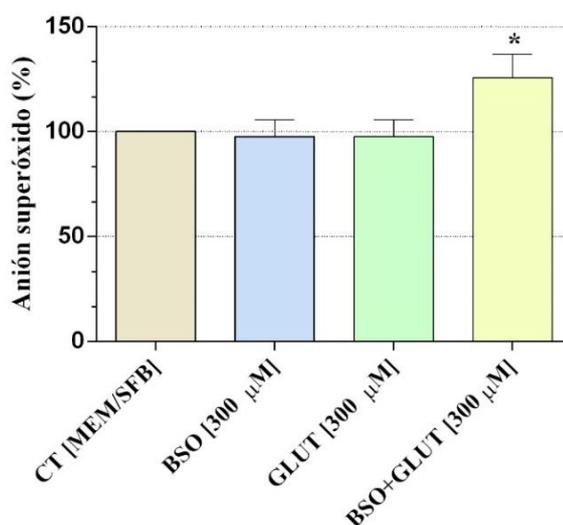


Figura 31. Determinación de niveles de Anión superóxido ante el estímulo de BSO + GLUT. El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey ($p < 0,01$) puede observar diferencias con respecto al control (*), y a las drogas BSO y GLUT por separado (**).

2.3. Determinación del rol de la melatonina en el modelo de daño celular

2.3.1. Efectos citotóxicos de la melatonina en GMSCs

Dado que la molécula de interés es la melatonina, se determinó su toxicidad sobre las GMSCs. Para ello, se realizó una curva de viabilidad, en la cual se observa que las dosis testeadas (0,032 μM a 1000 μM), no afectan a la viabilidad medida con RN (Figura 32). Se estandarizó la dosis de melatonina a 500 μM para los subsiguientes experimentos.

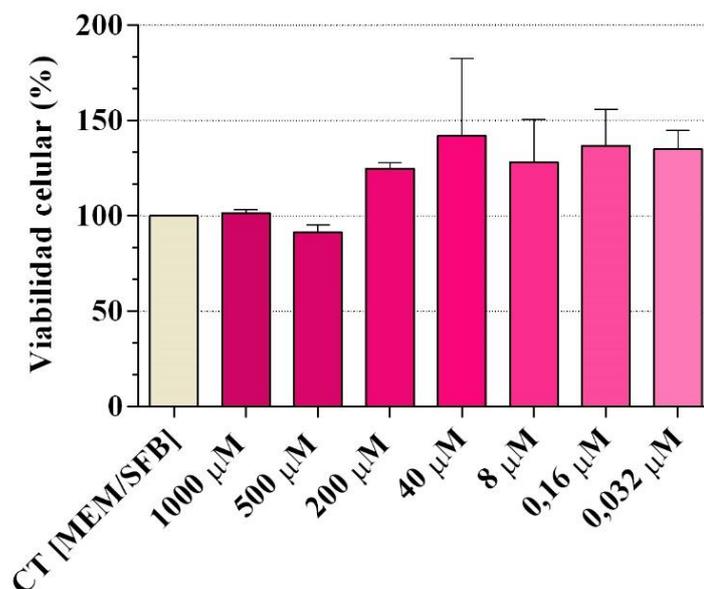


Figura 32. Curva de viabilidad de melatonina sobre las GMSCs. El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en ninguna de las concentraciones testeadas.

2.3.2. Rol de la melatonina en la viabilidad celular

A fin de conocer en profundidad el rol protector de la melatonina, se realizaron estudios de viabilidad sobre GMSCs ante el daño celular inducido. Se observa una drástica disminución de la viabilidad celular en el grupo tratado con BSO + GLUT. Asimismo, la melatonina restaura la viabilidad a los valores controles. (Figura 33). De igual manera, debe notarse que el BSO y el GLUT, por separado, no afectan a la viabilidad celular.

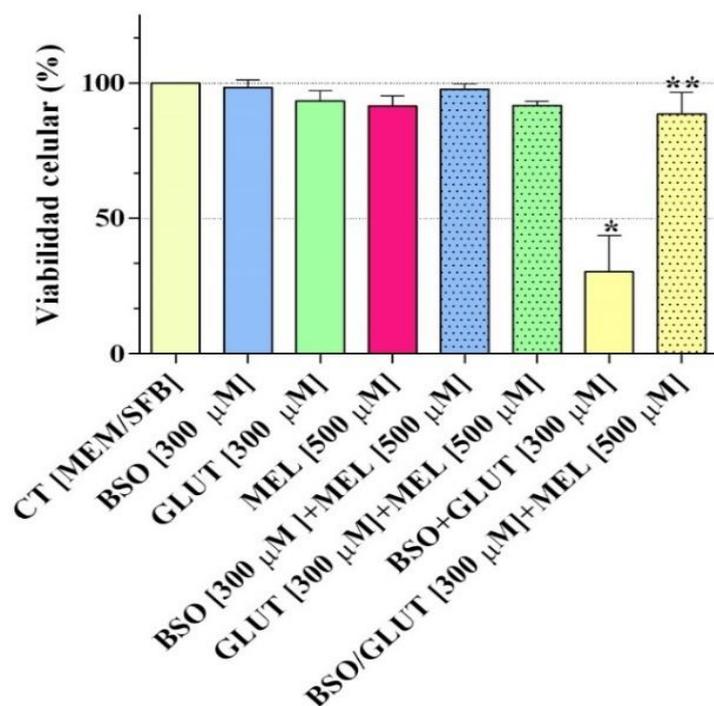


Figura 33 Ensayo de Viabilidad celular ante la melatonina y el daño celular. Los cultivos de GMSCs fueron sometidos a daño celular mediante BSO y GLUT, administradas en forma única o en conjunto a 300 μ M. La melatonina fue administrada a 500 μ M. El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. BSO+GLUT vs. Control (** $p < 0,01$) BSO+GLUT+MEL vs. BSO+GLUT (* $p < 0,01$) BSO+GLUT+MEL vs. Control (ns).

2.3.3. Efectos antioxidantes y antiapoptóticos de la Melatonina

Una vez establecido, que la melatonina posee un efecto protector ante el daño celular inducido químicamente, se buscó conocer si el mismo está relacionado con su actividad antioxidante. Para ello, se determinaron los niveles acumulativos del O_2^- en presencia o ausencia de melatonina. Se observa que la melatonina es capaz de inhibir el aumento de dicho anión (Figura 34).

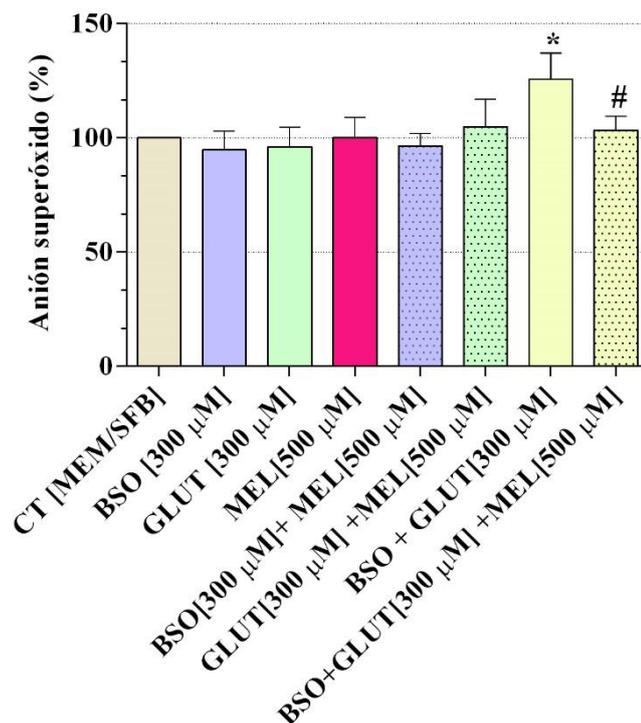
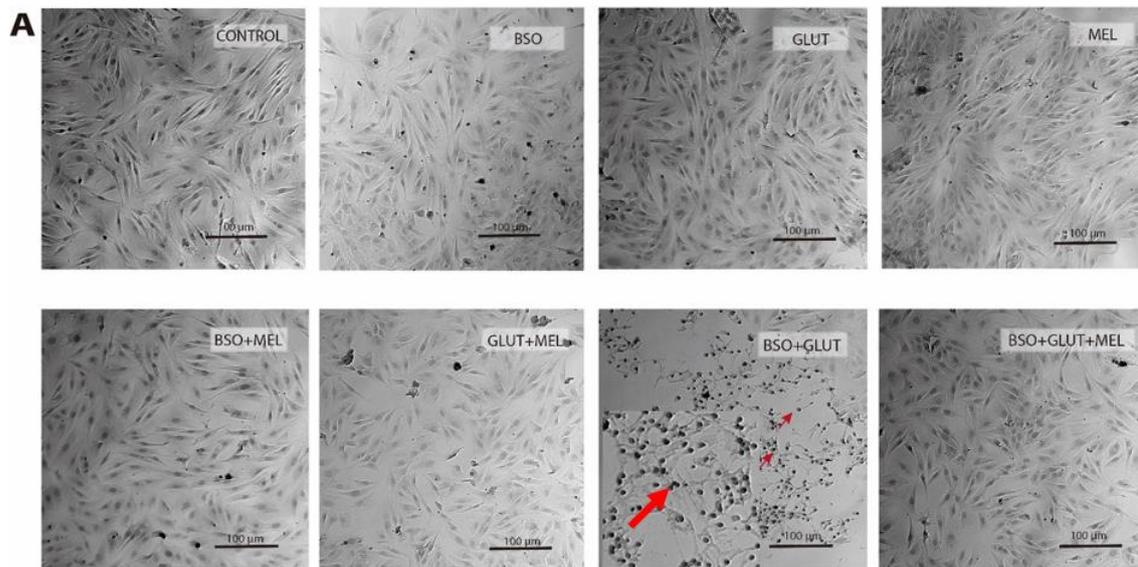


Figura 34 Porcentaje de producción de anión superóxido ante daño celular y en presencia de melatonina. Los cultivos de GMSCs fueron sometidos a daño celular mediante BSO y GLUT administradas en forma única o en conjunto a 300 μM , en presencia de melatonina, administrada a 500 μM . El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. * $p < 0.01$ vs. Controles, # $p < 0.01$ vs. BSO+GLUT. Aca coloqué los datos faltantes de BSO Y GLUT solos.

2.3.4. Efecto antiapoptótico de la Melatonina

A continuación, se analizó la actividad antiapoptótica de la melatonina, mediante la técnica de inmunohistoquímica TUNEL. Se observa, en concordancia con los resultados anteriormente presentados, que la administración de BSO [300 μM] y GLUT [300 μM], administradas en forma conjunta, producen el mayor daño celular que cuando son administradas individualmente, tal como se aprecia en las microfotografías de la figura 35 A. Se demuestra que la melatonina resulta un protector apoptótico, llevando los valores del índice apoptótico a los valores basales. A su vez, se observa que las drogas por separado no ejercen el efecto apoptótico. Todos estos datos llevan a reforzar la evidencia mostrada en la fórmula de la CIF en donde se observó el efecto sinérgico del BSO y GLUT 300 μM .



B

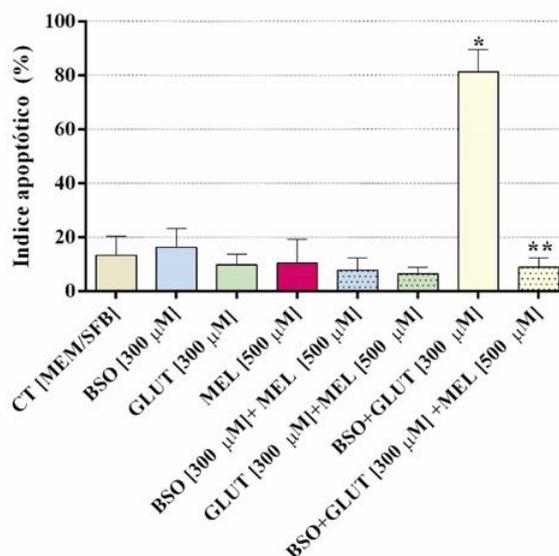


Figura 35. Actividad antiapoptótica de la melatonina en cultivos GMSCs ante el daño celular. A. Fotografías representativas de la técnica TUNEL. Las flechas rojas señalan ejemplos de núcleos apoptóticos. Aumento: 20X. **B. Gráfico del índice apoptótico.** Las barras representan tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. Se observan diferencias con respecto al control en la combinación de BSO+GLUT 0,3 mM (* $p < 0,001$) y el grupo con BSO+GLUT+MEL (* $p < 0,001$) con respecto al de BSO+GLUT y no hay diferencias entre este grupo y el control.

2.3.5. Rol clonogénico y migratorio de la melatonina sobre las GMSCs sometidas a daño celular

A fin de proporcionar información sobre el efecto protector de la melatonina, ante el daño ocasionado por la combinación de BSO y GLUT, sobre las características funcionales de las GMSCs, se evaluó la capacidad de formación de colonias.

Cuando se estudió la capacidad clonogénica mediante el ensayo de UFCs, se observó que la melatonina no fue capaz de revertir el daño provocado por el modelo (Figura 36 A y B).

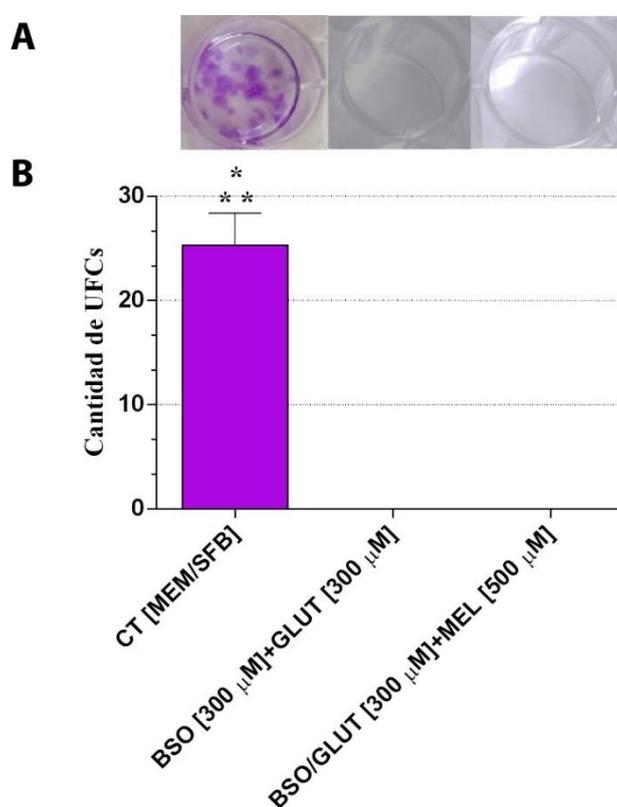


Figura 36 Capacidad de formación de UFCs ante daño celular. A. Imágenes representativas de los cultivos utilizados para el ensayo de UFCs. Se observa ausencia de colonias ante los tratamientos con daño celular. B. Gráfico representativo de la cantidad de UFCs generadas ante los distintos tratamientos. El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. * $p < 0,001$ vs. BSO+GLUT. *** $p < 0,001$ vs. BSO+GLUT+MEL.

Sin embargo, cuando se midió la capacidad migratoria de las células, se observó que la melatonina fue efectiva para la preservación de su motilidad ante el daño celular (Figura 37 A y B).

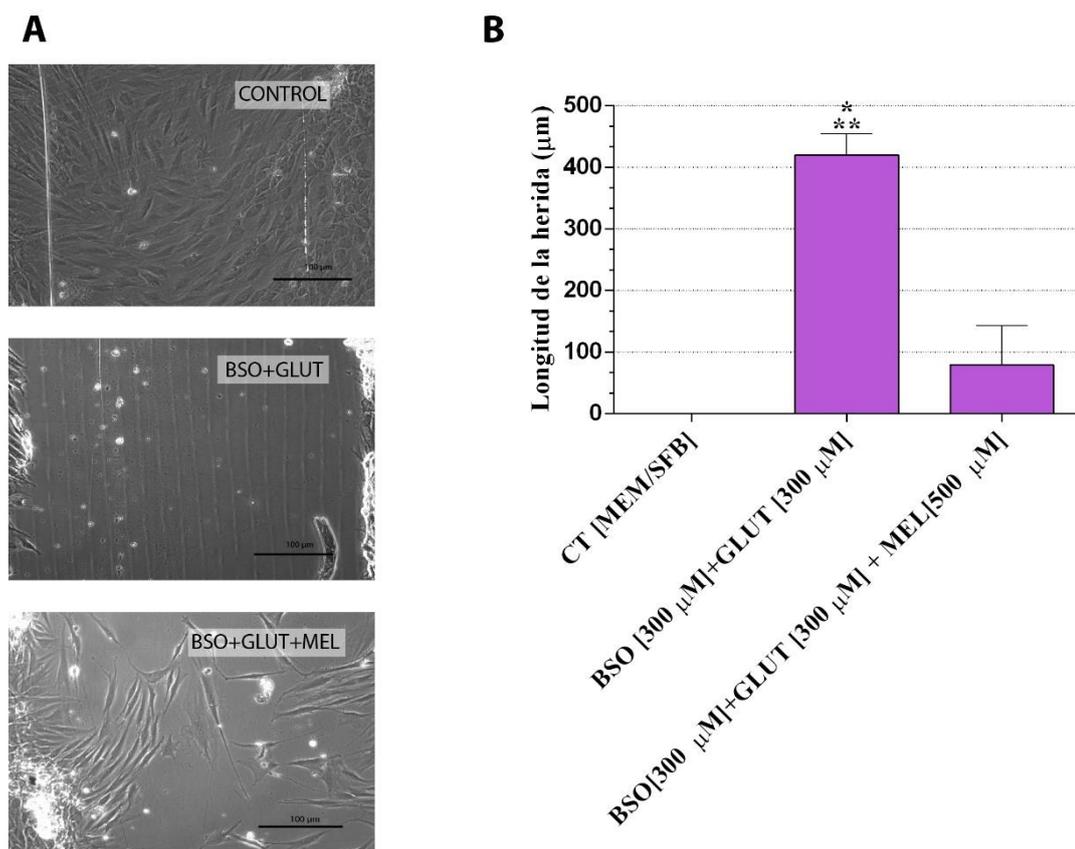


Figura 37 Capacidad motil de la célula ante el daño celular, en presencia de melatonina **A.** Fotografías representativas del ensayo a 72 h. Aumento: 20X. **B. Medición de la cicatriz en µm.** Los gráficos representan tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. $**p < 0,001$ vs. Control, $**p < 0,001$ vs. BSO+GLUT+MEL. No hubo diferencias significativas entre los controles y el BSO+GLUT+MEL.

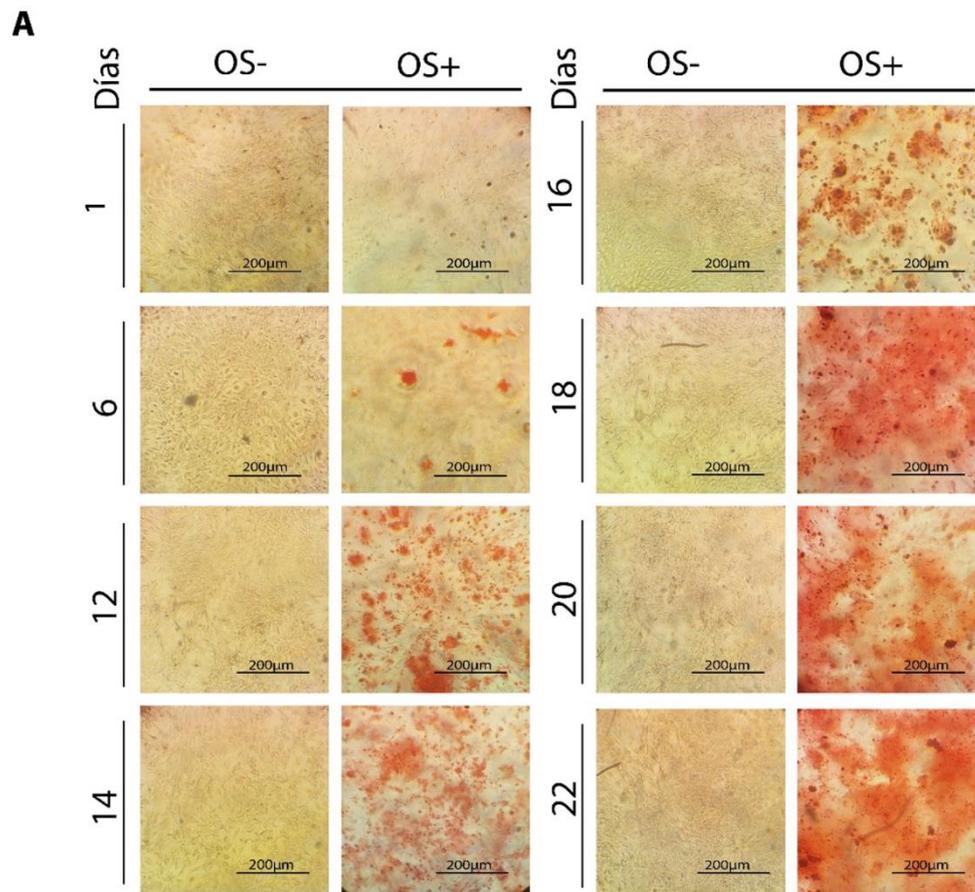
Todos estos datos, en conjunto, muestran la efectividad de melatonina en cuanto a la protección de esta subpoblación madre, ante la injuria relacionada con el estrés oxidativo provocado por la depleción de glutatión mediante la combinación de BSO+GLUT 300 µM.

Capítulo III: La Melatonina y su efecto osteodiferenciador

3.1. Diferenciación osteogénica *in vitro* de GMSCs

Entre los múltiples fenotipos celulares al que las GMSCs pueden diferenciarse, el tipo osteogénico resulta de gran relevancia, ya que su aporte a la neoformación ósea se encuentra estrechamente asociada al buen pronóstico pos-operatorio en los defectos óseos periodontales, siendo de gran interés para las terapias regenerativas.

A fin de conocer el efecto diferenciador de la melatonina hacia el linaje osteogénico, se realizó la técnica de AR. En primer lugar, se estableció un protocolo a 22 días, adquiriendo datos de su estadio de diferenciación osteogénica al día 1, 6, 12, 14, 16, 18, 20 y 22. De esta forma, se estableció una curva de diferenciación, que revela, ante medios inductores osteogénicos (OS+), nódulos de calcificación a partir del día 6 (Figura 38 A). Al día 16, se observa una diferencia significativa de dichos nódulos con respecto al día 0. El día 18 muestra el pico máximo de nódulos de calcificación, es decir, su diferenciación osteogénica. Su cuantificación por espectrofotometría confirmó lo observado *in vitro* (Figura 38 B). En base a estos resultados, se decidió que en los próximos experimentos de diferenciación se hicieran a 18 días.



B

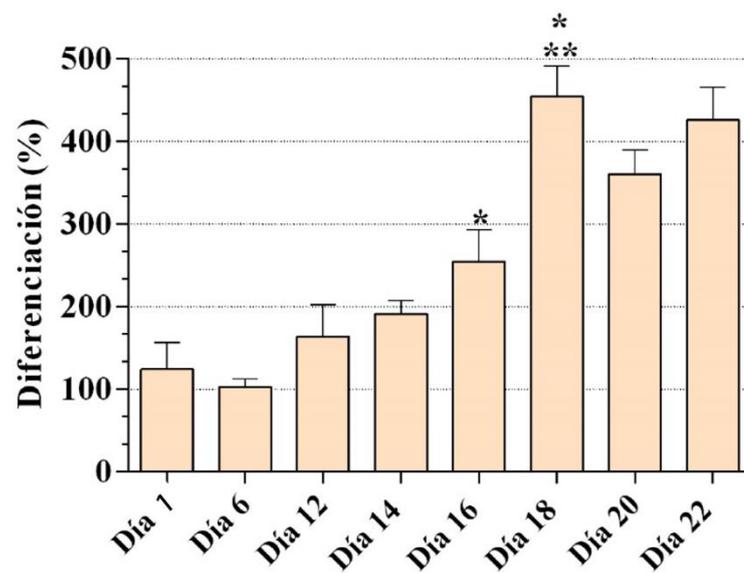


Figura 38. Diferenciación osteogénica de GMSCs. A Microfotos representativas de la diferenciación en distintos días, revelada mediante tinción con AR. Aumento: 10X. **B. Curva de diferenciación osteogénica medida como el porcentaje de depósitos cálcicos a distintos días.** El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. * $p < 0,01$ vs. Día 1 y ** $p < 0,01$ vs. Día 16. No hubo diferencias significativas entre el día 18, el 20 y el 22.

Una vez establecido el tiempo idóneo para el protocolo de diferenciación osteogénica, las GMSCs fueron sometidas al protocolo con diferentes medios, estos fueron: medio de cultivo basal sin medio de diferenciación (OS-), medio inductor osteogénico (OS+), con y sin melatonina (OS-/MEL) y (OS+/MEL).

Se observa que las células tratadas con los medios OS- y OS-/MEL, mantienen un estado indiferenciado, dada la nula presencia de nódulos de calcificación. Mientras que, las células tratadas con los medios OS+ y OS+/MEL exhiben nódulos de calcificación, lo cual demuestra la efectiva diferenciación osteogénica (Figura 39 A). En el grupo OS-/MEL, no hubo signos de diferenciación osteogénica, mostrando que la melatonina por sí sola no genera diferenciación osteogénica en estas células. Por el contrario, cuando la melatonina es suministrada en conjunto con el medio OS+, ejerce un efecto diferenciador más potente que el medio OS+ solo.

En la Figura 39 A, se observa en los grupos OS+ y OS+/MEL las células con una morfología diferente que los grupos OS-. Los depósitos de Ca^{+2} se disponen de forma tridimensional, quedando las células en un distinto plano cuando son observadas detenidamente al MO.

Estas observaciones fueron confirmadas por la cuantificación de la densidad óptica con AR por espectrofotometría. El gráfico muestra una diferencia significativa de la diferenciación osteogénica ante la presencia de melatonina (Figura 39 B).

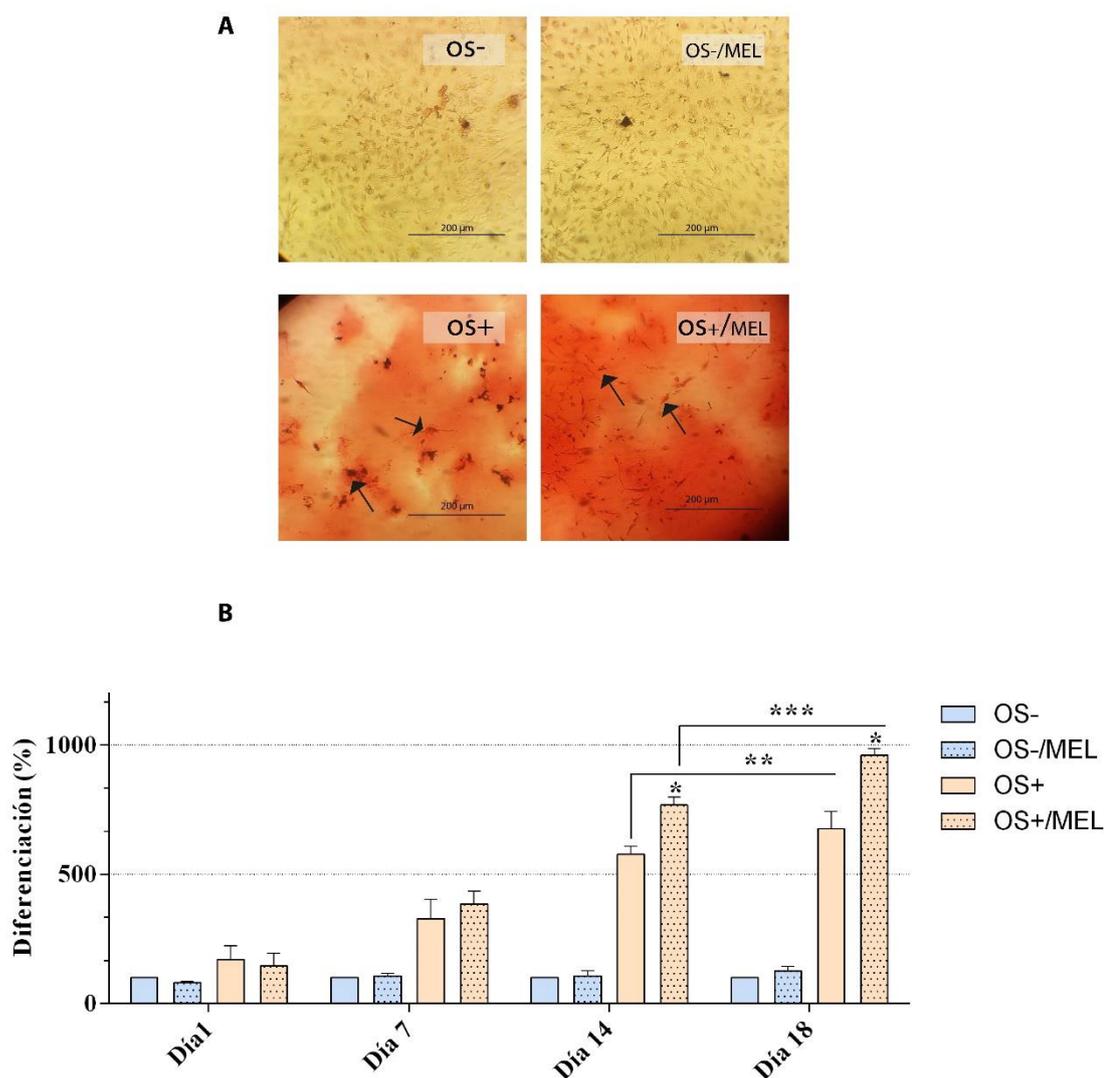


Figura 39. El rol de la Melatonina en la diferenciación osteogénica. A Microfotografías representativas al día 18 ante el tratamiento con o sin medio de inducción y en presencia o ausencia de melatonina [50 nM]. Las flechas negras indican ejemplos de células osteogénicas en medio de un depósito cálcico teñido por AR. Aumento 10X. **B. Porcentaje de depósitos de calcio detectados por espectrofotometría.** El gráfico representa cinco experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de dos vías (Aquí medí tratamientos y diferentes tiempos, es decir consideré esas dos variables por eso de dos vías) con *post hoc* de Tukey. * $p < 0,01$ vs. OS+. ** $p < 0,01$ OS+ Día 18 vs. 14. *** $p < 0,01$ OS+/MEL Día 18 vs. 14.

La proliferación medida con XTT en los distintos grupos, reveló que las GMSCs sometidas a los medios de diferenciación OS+ y OS+/MEL cesaban su proliferación abruptamente desde el día 7, manteniéndose esto constante hasta el día 18. Con respecto al grupo OS-/MEL, no hubo diferencias significativas en cuanto a su proliferación, esto

es concordante con los resultados anteriormente presentados, donde la melatonina no ejercía un efecto proliferativo en las células (Figura 40).

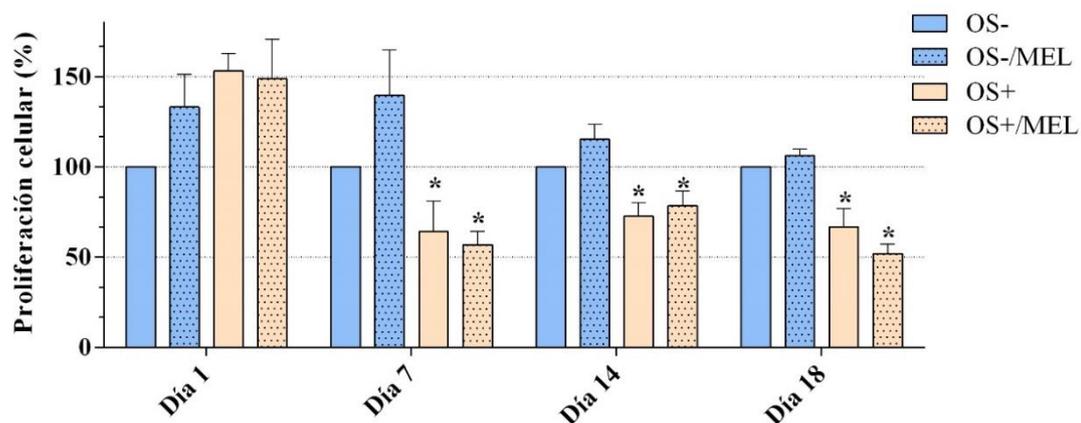


Figura 40 Proliferación celular de las GMSCs sometidas a diferentes medios detectados por espectrofotometría. El gráfico representa cinco experimentos independientes con un n de seis y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de dos vías con *post hoc* de Tukey. Día 7: OS+ y OS+/MEL vs. OS- (* $p < 0.01$). Día 14 OS+ y OS+/MEL vs. OS- y OS-/MEL (* $p < 0.01$). OS+ y OS+/MEL día 18 vs. OS- y OS-/MEL día 18 (* $p < 0,05$).

A modo de aumentar las evidencias de la acción de la melatonina sobre el proceso de diferenciación, se midió la fosfatasa alcalina, marcadora de diferenciación osteogénica por parte de las GMSCs. Los resultados muestran un aumento significativo en presencia del medio osteogénico, y este aumento es aún mayor con la melatonina (Figura 41).

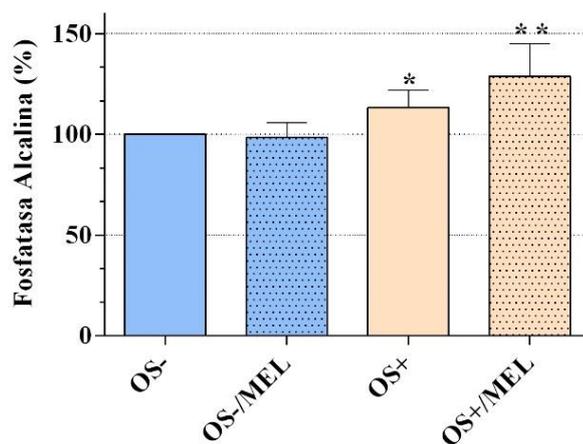


Figura 41. Porcentaje de actividad de fosfatasa alcalina. El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. Medio OS+ (* $p < 0,01$) vs. OS- y el grupo OS+/MEL (** $p < 0,01$) vs. OS- y OS+.

3.2. Características funcionales relevantes de células diferenciadas al linaje osteogénico

Resultó de interés conocer los aspectos funcionales de las células sometidas a los diferentes medios. Se comenzó por evaluar si existía una correlación entre diferenciación y proliferación en estas células. Se observó, esperablemente, una relación inversa entre las mismas ($R^2 = 0,90$ $p < 0,05$) (Figura 42), dado que una célula en proceso de diferenciación cesa su división. De esta forma, al estimular a los cultivos con OS+, y más aún con OS+/MEL, las células interrumpieron su división, y comenzaron su compromiso al linaje osteogénico.

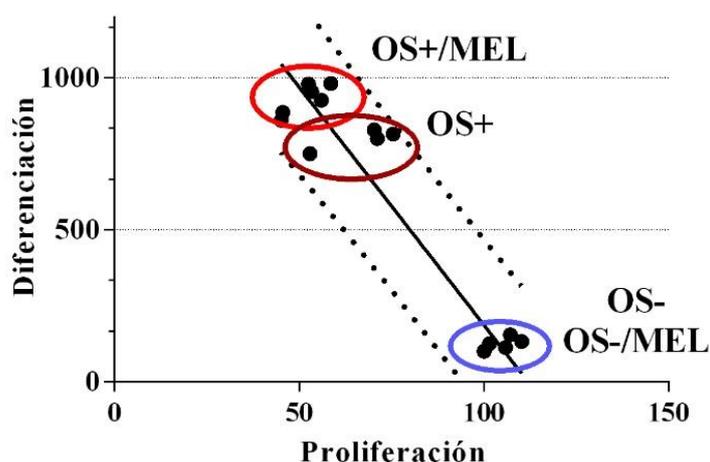


Figura 42 Gráfico representativo de la relación inversa entre la diferenciación osteogénica y la viabilidad de las células. ($R^2=0,909$, $p < 0,0001$)

Para confirmar lo observado en el análisis de regresión lineal, se evaluó la capacidad clonogénica mediante el ensayo de UFCs, en las células sometidas a los diferentes medios de cultivo. Los resultados muestran consistentemente con los resultados previos, que los medios osteodiferenciadores, OS+ y OS+/MEL, producen disminución de la capacidad de formación de UFCs. Esto confirma el cese de la proliferación para comprometerse al linaje osteogénico. No obstante, no se aprecia una diferencia significativa entre los medios OS+ y OS+/MEL (Figura 43 A y B).

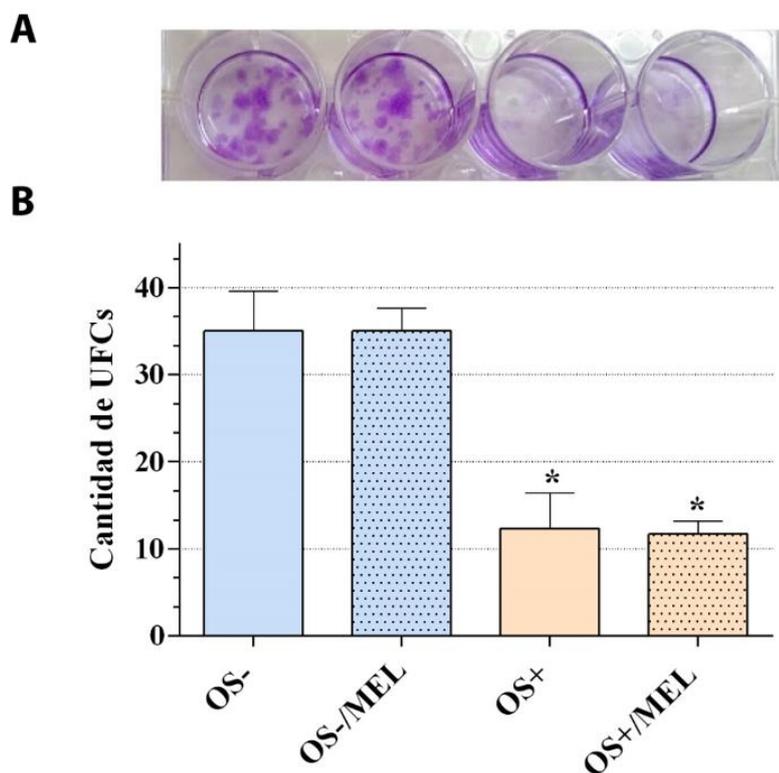


Figura 43 Capacidad de UFCs ante medios inductores osteogénicos y melatonina. A. Fotografía representativa de los cultivos para el ensayo de UFCs con medios B. Gráfico de UFCs. El gráfico representa tres experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. Medio OS- vs. OS+ y OS+/MEL (* $p < 0,001$). Medio OS-/MEL vs. OS+ y OS+/MEL (* $p < 0,001$).

Finalmente, se realizó el ensayo de herida, a fin de cuantificar la capacidad migratoria de los cultivos tratados. Igualmente, en forma prevista, las células estimuladas con medios osteodiferenciadores, no cerraron la herida. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de melatonina en células diferenciadas, consistentemente con lo observado en el estudio de la capacidad de formación de UFCs (Figura 44 A y B).

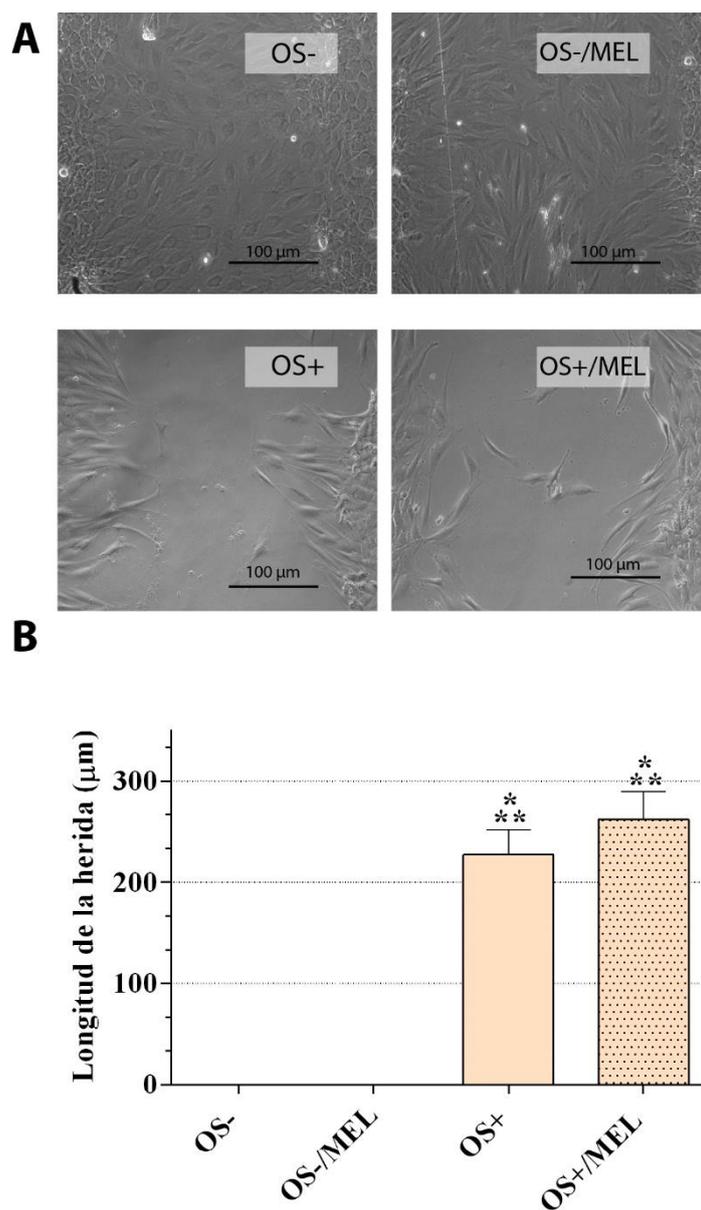


Figura 44 Capacidad migratoria de cultivos diferenciados con los diferentes medios en presencia o ausencia de la melatonina. A. Microfotografías representativas de la herida provocada en cultivos, bajo los distintos tratamientos. Tiempo final a 72 h. Aumento: **20X**. **B. Longitud (µm) de la herida y su cierre.** El gráfico representa tres experimentos independientes (n=3) y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. *p< 0,001 vs. OS-, **p< 0,001 vs. OS-/MEL.

Capítulo IV: Relación entre el daño celular y los diferentes estadios de diferenciación osteogénico

4.1. Viabilidad y diferenciación

En una última etapa del presente trabajo de tesis, se investigó si el daño ocasionado a las GMSCs influye en la diferenciación osteogénica según el estadio en que se encuentren las mismas. Para ello, se realizaron experimentos combinando el protocolo de diferenciación con el modelo de BSO+GLUT [300 μ M] con y sin melatonina [500 μ M] adicionado en diferentes momentos. Esto es, la adición del daño celular durante 48 horas en los días 0-2, 9-11 y 16-18. Una vez ocasionado el daño, se recambiaron los medios hacia los OS- y OS+, según el caso. Se utilizaron como control, placas con GMSCs y medio OS-.

Las células tratadas solo con OS-, permanecieron indiferenciadas. El tratamiento con BSO + GLUT [300 μ M], disminuyó la viabilidad celular, medida con RN, significativamente independientemente del tiempo. La melatonina, no solo fue capaz de revertir dicho efecto, sino también demostró un aumento de viabilidad comparada con los controles en el grupo 0-2 y 16-18 días (Figura 45 A). Por otro lado, no se observó diferenciación osteogénica en ninguno de los tratamientos ensayados, medida por AR, como era esperable (Figura 45 B).

De estos resultados se infiere que las GMSCs inmaduras son muy sensibles al daño celular relacionado con el aumento del daño relacionado al estrés oxidativo relacionado por la depleción de glutatión.

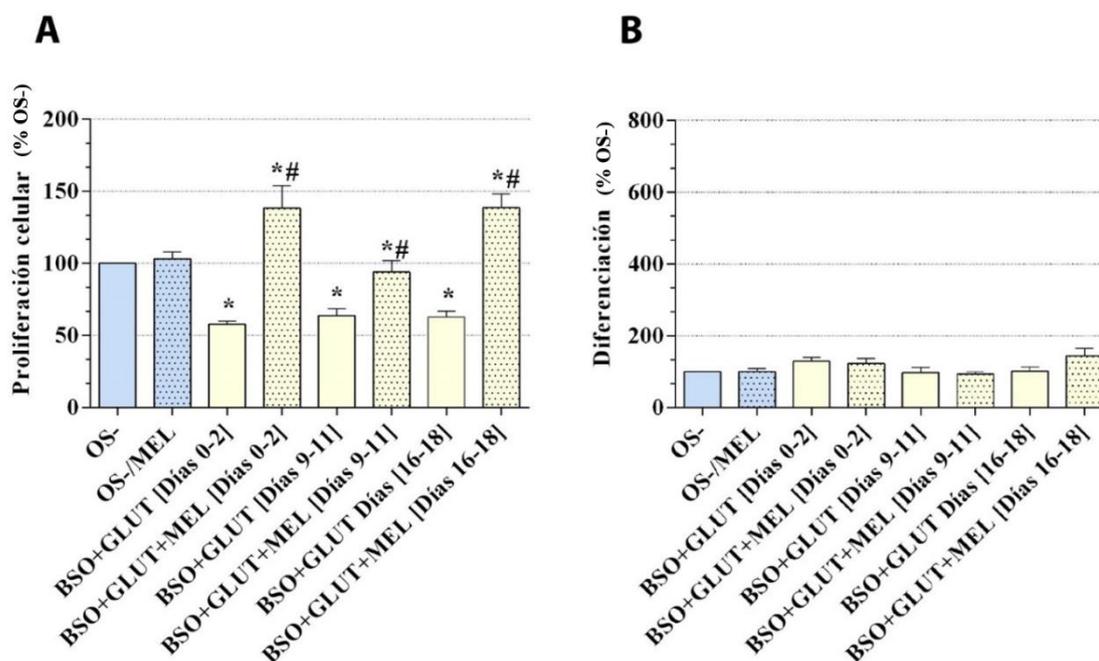


Figura 45 GMSCs en el modelo de daño celular con medios controles y en presencia o no de melatonina. **A. Porcentaje de proliferación.** La concentración de BSO y GLUT se mantuvieron a 300 μ M, y melatonina a 500 μ M. El gráfico representa seis experimentos independientes con un n de tres y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. * $p < 0,01$ vs. Control (OS-), # $p < 0,01$ vs. BSO+GLUT. **B. Porcentaje de diferenciación** No se detectó presencia de cristales de Ca^{2+} , esperablemente, en ausencia de medio inductor osteogénico.

En el protocolo de diferenciación con medios osteogénicos, se observó una clara disimilitud en cuanto a la diferenciación comparado a las GMSCs sometidas al medio OS- (Figura 46 B). Por otro lado, también se evaluó la diferenciación y la viabilidad, ante el medio osteogénico y la presencia o la ausencia de melatonina. La proliferación demostró una tendencia a ser mayor hacia los días 16-18 del protocolo con medios osteogénicos, no observándose diferencias significativas (Figura 46 A).

En cuanto a la diferenciación, se observa, cómo se describió previamente, que su adición aumenta la diferenciación osteogénica. Interesantemente, BSO + GLUT, entre los días 0-2, 9-11, produjo un aumento de la diferenciación de los osteoblastos, y en este caso la melatonina no tuvo ningún efecto.

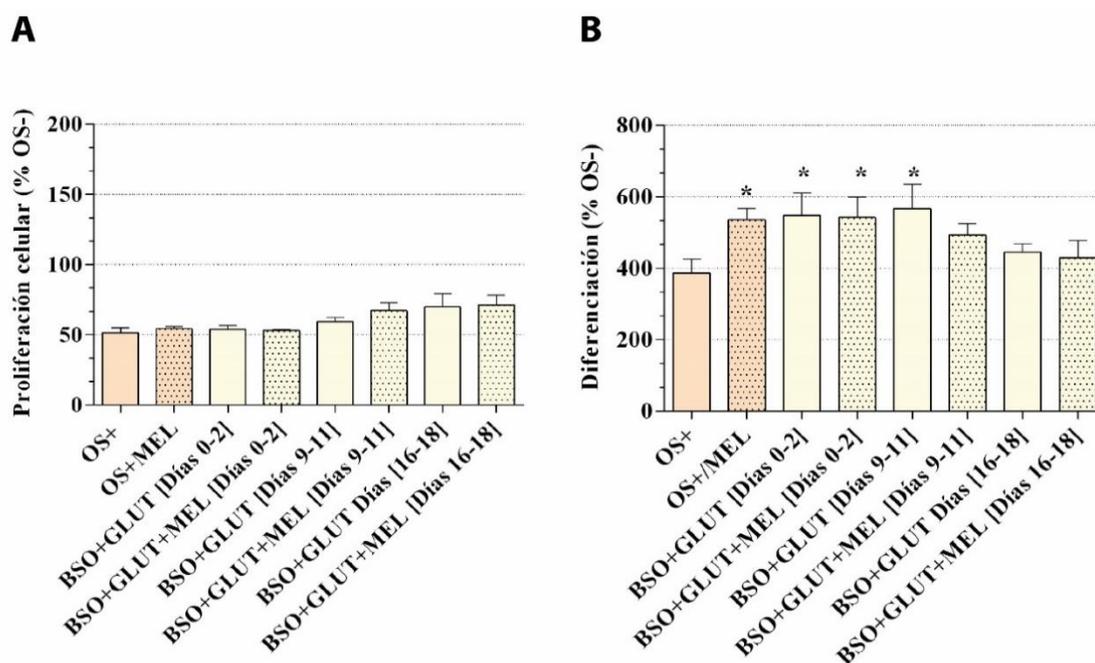


Figura 46 GMSCs en el modelo de daño celular, ante medios de inducción osteogénico y en presencia o no de melatonina. A. Porcentaje de Viabilidad. La concentración de BSO y GLUT se mantuvieron a 300 μ M, y melatonina a 500 μ M. El gráfico representa seis experimentos independientes y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. **B. Porcentaje de diferenciación.** * $p < 0.01$ vs. Control.

Para confirmar el efecto observado en los diferentes estadios, se analizó la posible relación entre la diferenciación y el momento del daño (medido como porcentaje de viabilidad de los controles). Se buscó analizar si existe o no relación entre la diferenciación y el momento del daño.

Se observó que existe relación lineal moderada en los días 0-2 [$R^2 = 0,44$] Figura 47 A] y 9-11 [$R^2 = 0,42$] Figura 47 B]. Por el contrario, no existe relación entre el daño ocasionado en los días 16-18 [$R^2 = 0,25$] Figura 47 C]. Tal como se observó en la figura 47 A y B (OS+), el estadio de diferenciación en que se encuentran las células es significativo si el daño es ocasionado en los días 0-2 y 9-11. En este caso, el daño ocasionado por el BSO y GLUT, ejercería un efecto positivo. Sin embargo, cuando el daño se ocasiona al momento de que las células llegan a una madurez osteogénica, en los días 16-18, el daño ocasionado no tiene relevancia.

En el caso de las GMSCs sometidas al medio basal, el daño es ostensible y la melatonina lo revierte.

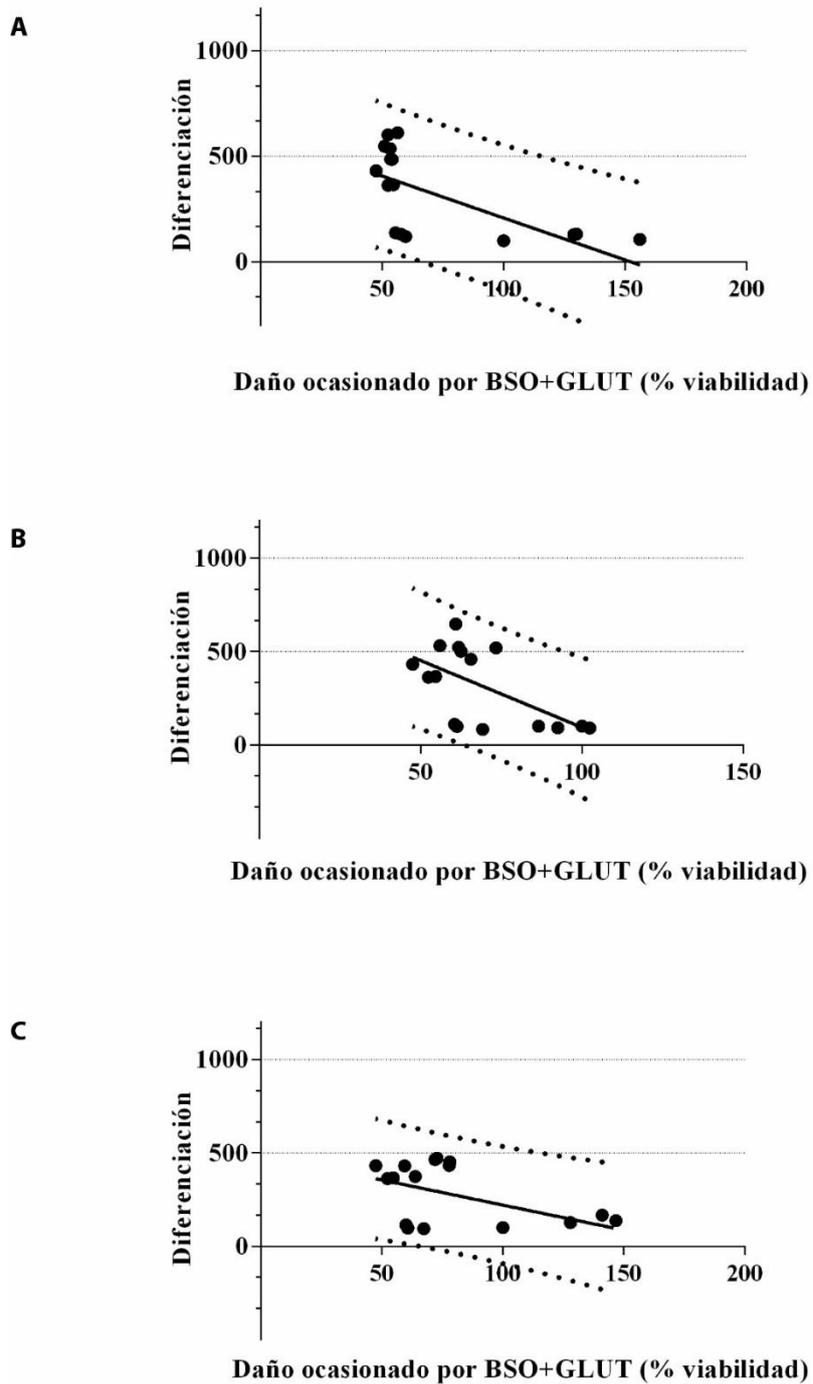


Figura 47 Relación entre el momento del daño celular y la diferenciación osteogénica. **A.** Regresión lineal con los datos obtenidos del daño producido entre los días 0 y 2 de diferenciación, R^2 : 0,44. $p=0,002$. **B.** Regresión lineal con los datos obtenidos del daño producido entre los días 9 y 11 de diferenciación, R^2 : 0,42. $p=0,003$. **C.** Regresión lineal con los datos obtenidos del daño producido entre los días 16 y 18 de diferenciación, R^2 : 0,25. $p=0,03$.

Dado que la mineralización de la matriz extracelular, con el tratamiento de BSO y GLUT, fue estadísticamente significativa, se procedió a conocer si dichas drogas ejercen efecto osteodiferenciador por sí mismas. Para ello se siguió el protocolo mencionado anteriormente, es decir, que se suministraron las drogas en los diferentes momentos del protocolo de diferenciación. Se observa que el GLUT induce la diferenciación, observada por el dramático aumento de la calcificación de la matriz extracelular en los días 0-2 (Figura 48). Y como se discutirá, es una función conocida de dicha molécula. Sin embargo, en los siguientes estadios de diferenciación, no se observó la injerencia del GLUT, ni del BSO, en cuanto a la diferenciación. Esto sugiere que las GMSCs sometidas a medios osteogénicos, comienzan su compromiso de modo temprano y esto las haría menos sensibles al daño celular ocasionado por la depleción del glutatión.

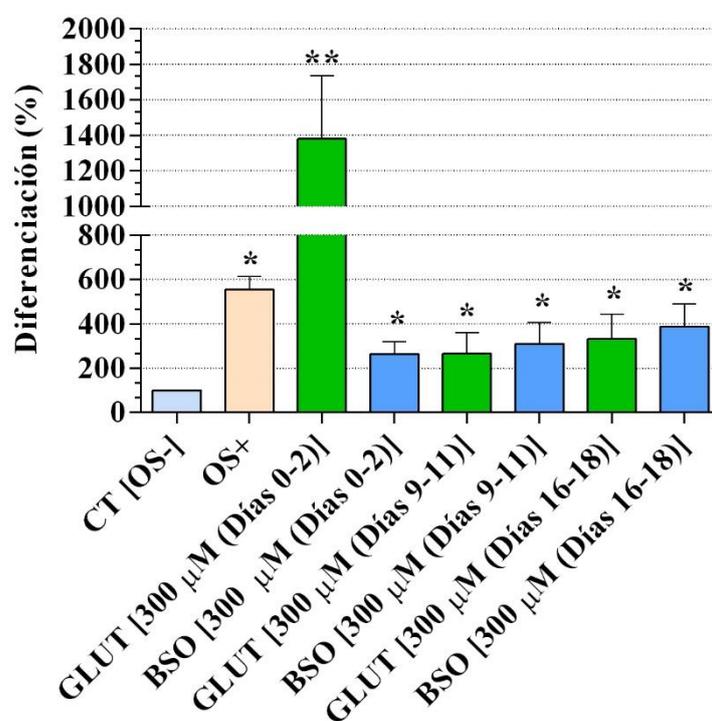


Figura 48. Porcentaje de diferenciación con las drogas individuales. Tanto BSO como GLUT fueron administradas a una de 300 μ M. El gráfico representa seis experimentos independientes con un n de tres y las barras de error representan SD. Se realizó ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey. * $p < 0,001$ vs. CT (OS-), ** $p < 0,001$ vs. OS+

Discusión

Obtención y caracterización de la subpoblación de células madre gingivales

En la primera etapa de esta tesis, se abordó la obtención y caracterización de GMSCs. La encía es un tejido de fácil acceso para el establecimiento de cultivos, mediante procedimientos de rutina odontológicos, que incluyen alargamientos clínicos de corona y tejido conectivo palatino, entre otros ^{159, 164}. Dado dichas características de la encía, y en especial su habilidad de generar hueso, resulta de especial interés para el área de terapias regenerativas ²⁷⁹. Las GMSCs aquí aisladas, al igual modo que postuló El Sayed *et. al.*, ¹⁴² podrían definirse como ‘gemas’ debido a su fácil acceso y a su disminuida invasividad para su obtención.

Durante la primera etapa de puesta a punto de la técnica de cultivos celulares de este trabajo, se intentó aislar MSCs de origen medular de mandíbula, de ligamento periodontal y de pulpa dental (datos no incluidos) sin demasiado éxito, por lo cual, se escogió proseguir con las GMSCs debido a su fácil acceso, aislamiento, expansión y a las propiedades regenerativas observadas con anterioridad.

Entre los múltiples métodos para la obtención de dichas células²⁸⁰, se eligió utilizar el método de disgregación enzimática, sumado al de disgregación mecánica, para así lograr de manera más eficiente la obtención de las GMSCs.

En la presente tesis fueron aisladas células que se caracterizaron como GMSCs, dado que las mismas cumplieron los requisitos mínimos para ser consideradas como tales. Los requisitos incluyen la adherencia al plástico de cultivo, la capacidad clonogénica y la expresión de ARNm positivo para CD73 y CD105, y negativo para CD34 y CD45, los cuales se mantuvieron a través de los sucesivos pasajes, tal como lo hizo Yusop *et al.* ²⁶⁶. Aún más, como se esperaría de un cultivo de origen madre mesenquimático, exhibió capacidad multipotente hacia el linaje osteogénico. Sin embargo, la ISCT requiere la caracterización proteica, mediante una técnica de citometría de flujo, de un panel ampliado de marcadores de superficie. Otro requisito de esta sociedad es la diferenciación hacia linaje adipogénico y condrogénico ¹⁴⁴, que no se realizó en esta tesis, implicando una limitación de este trabajo ²⁸¹. De esta manera, sería necesario, en un futuro, adherirse a dicho protocolo de caracterización.

En un estudio ²⁸², se compararon SHED, GMSCs, BMSCs, y MSCs derivadas del cordón umbilical. Todas las subpoblaciones madre mostraron los marcadores típicos

mesenquimales, y también capacidades proliferativas midiéndose las mismas hasta el día 7. En el presente trabajo, se midió la proliferación hasta el día 18, mostrando que el crecimiento que se ameseta podría deberse a la inhibición por contacto en los cultivos. Más aún, las GMSCs del mencionado estudio, probaron mayor capacidad de formación de UFCs comparadas con las SHED, BMSCs y MSCs derivadas de cordón umbilical.

Es interesante observar, que en los cultivos de GMSCs aquí estudiados, se requirió menor tiempo de exposición a factores de diferenciación osteogénicos, en comparación a los expuestos en diferentes estudios ^{253, 254}. Por otro lado, se demostró que, mediante el ensayo de herida, las células requerían un promedio de 72 h para migrar y proliferar hasta cerrar dicha herida, mientras que Angelopoulos *et al.* ¹⁴³, reporta que en sus cultivos requirieron 24 h. para el cierre de la misma. Esto puede deberse a que la distancia de cierre inicial, planteada por dicho investigador, fue de 150 μm , mientras que la del presente estudio fue de 425 μm . Este hecho es relevante, ya que, en el caso de la regeneración periodontal, es esencial que las MSCs puedan trasladarse hacia los lugares donde son requeridas, y esto se da frecuentemente en un ambiente con abundante EO. Yang *et al.* ²⁸³, extrajo y expandió BMSCs de rata y con éxito logró regenerar defectos óseos periodontales. Esto indicaría que las GMSCs también podrían aislarse, caracterizarse y utilizarlas en un modelo *in vivo*. En este sentido, en estudios previos, se utilizaron GMSCs como alternativas en los defectos periodontales con éxito ^{142,172}. Por tal razón es que estudios básicos como el presente, son requeridos para profundizar en el estudio de dicha alternativa de terapia celular.

Protección de la melatonina ante un modelo de daño celular relacionado al estrés oxidativo

Para la regeneración de un tejido, es necesaria la presencia adecuada de células madre progenitoras y factores que las activen ¹⁴⁸. Esto es cierto, a su vez, para los defectos óseos periodontales que quedan como consecuencia de la periodontitis ^{283, 285}. Es por ello que, en pos del estudio de este microambiente, se estableció un modelo de aplicación que mimetiza el ambiente de una periodontitis, generado por la depleción de GHS -dada su importancia en el ambiente periodontal - ⁶, mediante la adición de las drogas DL-Butionina sulfoximina y glutamato ²⁶³. Tal como se mencionó previamente, el estrés oxidativo es relevante en la aparición y progresión de la periodontitis, por su acción directa sobre la activación de osteoclastos sin mediación de RANKL. Esto sucede debido a que el factor de transcripción NF κ B es sensible al estado de óxido-reducción de la célula

⁶. A su vez, el estrés oxidativo, a través de la destrucción de biomoléculas claves, como lípidos de membrana y fibras colágenas, generan una reacción amplificada por parte de los PMN ²⁸⁶⁻²⁸⁷. Las citoquinas proinflamatorias, tales como TNF α -factor estimulante de granulocitos y macrófagos (IL-1, IL-6 e IL-8) -, y el LPS, entre otros, también estimulan a los PMN a producir mayores niveles de estrés oxidativo ²⁸⁸⁻²⁹⁰. El sistema de defensa antioxidante presente en las células es clave para contrarrestar dicho daño relacionado al estrés oxidativo. El glutatión, tanto oxidado como reducido, es un tiol ubicuo en el ambiente celular y cumple numerosas funciones: antioxidante -como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa, la cual remueve peróxido de hidrógeno (Figura 4) y un efecto regulador en la expresión y activación de genes sensibles a las ROS, entre otras ²⁹¹. ²⁹². A partir de ello es que para la presente tesis se eligió mimetizar el daño ocasionado por la depleción del glutatión.

Los resultados aquí obtenidos en cuanto a la disminución de viabilidad, aumento del anión superóxido y del índice apoptótico, son concordantes con los obtenidos por Maher *et al.* ²⁶², en líneas celulares de retina y luego en nuestro laboratorio ²⁶³ en cultivos primarios de retina. Las GMSCs resultaron ser muy sensibles al glutamato, ya que a partir de los 800 μ M se observó una drástica caída en la viabilidad, en contraste con los trabajos mencionados, donde se utilizaron concentraciones de glutamato en el orden de los 20 mM y BSO 5 mM. Esto podría deberse a la susceptibilidad de las células madre ante estímulos nocivos, como es en este caso la combinación de drogas depletoras del glutatión.

Como fue anteriormente detallado, el estrés oxidativo es constante en un ambiente periodontal inflamado ⁶. Es por ello que el estudio de sustancias capaces de contrarrestar dicho daño y restaurar el equilibrio del óxido reducción es importante para la terapia periodontal, tanto quirúrgica como no quirúrgica ^{6, 98, 291, 306}. En este sentido, la melatonina cumple varias funciones benéficas como antioxidante.

En este trabajo, se observó que la melatonina fue capaz de contrarrestar los efectos nocivos relacionados a las ROS, más específicamente al anión superóxido, ya que llevó los grupos tratados con BSO y GLUT a los valores control. Esto podría deberse a que la melatonina es antioxidante directo, así como también lo son sus metabolitos, que interaccionan con las ROS, neutralizándolas ¹². Se concuerda con estudios previos, donde se observó un dramático aumento de anión superóxido en enterocitos, ocasionado por drogas depletoras del glutatión: BSO y menadiona. La melatonina fue capaz de contrarrestar dicho anión a los niveles controles ²⁹⁵. Dicha hormona también es considerada un antioxidante indirecto por su estimulación a nivel transcripcional de la

síntesis de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa¹²⁻¹⁵. Suprime las enzimas pro oxidantes como la óxido nítrico sintasa. Es posible que melatonina pueda activar la enzima responsable de la síntesis de glutatión, haciéndola más efectiva para el proceso antioxidante. Además, podrían inducirse otros procesos involucrados en tales mecanismos, contrarrestando en ambos casos el efecto oxidante de BSO. Más aun, se ha observado que melatonina protege las mitocondrias contra las lesiones oxidativas y mejora la función respiratoria, tanto *in vivo* como *in vitro*¹⁷.

Este efecto podría explicar la acción antiapoptótica de la melatonina observada en los GMSCs *in vitro*. La melatonina resultó ser altamente efectiva para proteger a las células del daño relacionado con el estrés oxidativo en las GMSCs, por cuanto disminuyó los niveles de apoptosis, aumentados por el BSO y GLUT de modo dramático. Esto podría explicarse por la capacidad antiapoptótica de la indolamina^{294, 295}. En nuestro laboratorio se pudieron observar procesos donde las células ganglionares fueron devueltas a los valores basales de índice apoptótico²⁶³. Más aún, en otro trabajo de nuestro laboratorio, se midió la actividad antiapoptótica de la melatonina mediante la técnica TUNEL, mostrando nuevamente la disminución del índice apoptótico, y que esto estaba relacionado con el descenso de la actividad de la caspasa 3²⁹⁵. En este trabajo de tesis se observó una clara fragmentación del núcleo celular marcado con la técnica inmunohistoquímica TUNEL (Figura 35 A). Estos hallazgos podrían estar relacionados al modelo de daño celular elegido. La depleción de glutatión está asociada a un aumento de la apoptosis.²⁹⁶

Se podría explicar lo ocurrido en el trabajo aquí presentado, donde, por primera vez dentro de nuestro conocimiento, se testea la actividad antiapoptótica de la melatonina en GMSCs. La técnica de TUNEL aquí utilizada, no aporta información acerca de cuáles de las vías apoptóticas estarían involucradas, es decir, si los hallazgos fueron producto de la vía extrínseca o intrínseca. Sin embargo, por estudios anteriores se puede inferir que la vía intrínseca está principalmente involucrada, ya que previamente se contrastó lo observado en la técnica TUNEL con el aumento de caspasa 3 del citocromo C y a la desestabilización de la membrana mitocondrial^{109, 110}.

El glutamato, principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central, es citotóxico para las neuronas cuando se libera en altas concentraciones (por ejemplo, en un derrame cerebral o en un daño neuronal), induciendo la muerte celular por excitotoxicidad^{297, 298} tanto *in vivo*²⁹⁹ como *in vitro*³⁰⁰.

Por otro lado, BSO, es un inhibidor de la biosíntesis de glutatión, se usa como coadyuvante en los tratamientos de quimioterapia aprovechando sus propiedades oxidantes^{300,301}. Esta droga también produjo muerte celular debido al estrés oxidativo en el cultivo de células de cáncer de mama MCF-7: 2A³⁰² y células intestinales *in vivo*¹⁸⁴. Además, el BSO solo, fue utilizado recientemente por Domahezevic *et al*³⁰³ para estudiar el daño por depleción a células osteogénicas de la línea celular osteoblástica SaOS-2, encontrando un daño por estrés oxidativo, relacionado a la depleción de glutatión, coincidiendo con los resultados presentados en este trabajo de tesis. Chang *et al.* usaron BSO en combinación con nicotina para mostrar un daño celular sinérgico en células fibroblásticas de ligamento periodontal¹⁰⁸, sin embargo, utilizaron más concentración de BSO (500µM) que en nuestro estudio, (300 µM). Es notable, que en el presente estudio, el BSO resultó no tóxico en un amplio rango de dosis (100 µM-1300µM) para las GMSCs.

En este estudio se demostró por primera vez que, el uso de la combinación de BSO y GLUT es efectivo en cultivos primarios de GMSCs. Cuando se utilizó la combinación de BSO y GLUT en un cultivo de GMSCs, se observó que los efectos nocivos de la combinación de estos fármacos fueron aún más dañinos que en las células neuronales. Se demuestra que las GMSCs son más sensibles al tratamiento incluso a bajas concentraciones (Figura 29 A y B). De hecho, se encontró que la viabilidad celular disminuyó mientras que la producción del anión superóxido aumentó con el tratamiento de GLUT y BSO, lo que indica un efecto oxidante de estos fármacos (Figura 31). El daño celular fue desencadenado por la muerte celular por apoptosis, que se evidenció por un aumento en el índice apoptótico (Figura 34). Cuando a estas células se les administró melatonina, simultáneamente con GLUT y BSO, la indolamina pudo contrarrestar el daño causado por el tratamiento oxidante. Los resultados actuales demuestran que la melatonina protege las GMSCs al disminuir el anión superóxido y la apoptosis, evitando así la pérdida de viabilidad en las GMSCs expuestos a un modelo *in vitro* de estrés oxidativo compuesto por BSO + GLUT.

Yu *et al.*³⁰⁴ encontraron que el receptor de GLUT, NMDA está presente en fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Este hecho podría explicar la mayor sensibilidad de las GMSCs al GLUT. Se necesitan más estudios para dilucidar este hallazgo.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria desencadenada por la biopelícula oral, donde el EO desempeña un papel fundamental para el inicio y la persistencia de la

inflamación crónica tal como fue señalado en el nuevo modelo de enfermedades periodontales ⁷. La periodontitis no solo es una inflamación localizada, sino que a menudo está asociada a otras afecciones, como diabetes mellitus, síndrome metabólico y el consumo de tabaco ^{39, 291, 305}. Se sugirió que el estrés oxidativo puede ser un factor común entre ellos ³⁹. Además, cuando se realiza la terapia periodontal no quirúrgica, los parámetros del estado oxidativo sistémico mejoran de manera similar a los controles sanos ^{293, 305}. Debido a esto, es razonable centrarse en la investigación de agentes antiinflamatorios y preventivos como estrategias terapéuticas complementarias. A esto se le deben sumar los tratamientos periodontales estándar, como el desbridamiento de la superficie de la raíz, tal como fuera señalado por Preshaw *et. al.* ³⁰⁵, como fue señalado previamente respecto a que las terapias periodontales deberían suscribir a ser cada vez más personalizadas ²⁴³.

Las propiedades de la melatonina se han estudiado en otras ocasiones en células del ambiente bucal sometidas a distintas injurias. Ejemplo de esto es el trabajo de Proksch *et al.* ³⁰⁷, quienes estudiaron la toxicidad del digluconato de clorhexidina en una línea celular de osteoblastos MC3T3. Estos autores arribaron a diferentes conclusiones, en primer lugar, que el digluconato de clorhexidina a dosis mucho más bajas (0,01; 0,001 y 0,0001%) que las utilizadas clínicamente para la irrigación de bolsas periodontales (2%) ³⁰⁸ es tóxico para estas células. Al respecto se ha de destacar que, en el presente trabajo, en un principio se utilizó digluconato de clorhexidina para asepticar las bocas de las ratas previa a la escisión de la encía (datos no incluidos), lo cual resultó en la imposibilidad de obtener células viables para cultivo. Por otro lado, la melatonina inhibió la muerte celular, y la apoptosis en esta línea celular. Los autores concluyeron que la melatonina es una 'prometedora herramienta' para las terapias periodontales. En el modelo de daño celular propuesto en esta tesis, la melatonina fue suministrada a una concentración mucho más alta que la utilizada por Proksch *et al.*, esto es 500 μ M y 50 μ M, respectivamente. Esta gran diferencia de dosaje, puede deberse a que las células de líneas celulares son mucho más resistentes al daño celular que las células de un cultivo primario. Las GMSCs, además, al estar indiferenciadas, son más sensibles al daño celular, por lo cual indicaría que las dosis de melatonina a utilizar deben ser más altas. No obstante, se demostró que melatonina no es tóxica desde los 0,032 μ M hasta los 1000 μ M (Figura 32).

El uso de cultivos primarios de células imita mejor a las células que le dieron origen y los resultados pueden traspolarse de manera más confiable ³⁰⁹. Es por ello que en el presente trabajo, se utilizaron cultivos primarios y se caracterizó el daño en

intensidad y duración, mostrando un máximo daño a las 48 h. a diferencia de Proksch *et al.*, que arbitrariamente midieron el daño celular a las 24 h. Y a las 72 h.

Debido a su baja toxicidad, propiedades protectoras, de diferenciación y de bajo costo, en comparación con el *gold standard* en la periodoncia regenerativa -tales como proteínas derivadas del esmalte^{18, 221, 250} -, la melatonina podría ser un fármaco de elección para este objetivo. En un estudio, Balaji *et al.*³¹² encontraron que los niveles de melatonina eran más altos en el tejido gingival de las personas con periodontitis. Esto podría explicar la posible función protectora de la indolamina en el tejido gingival, ya que la encía es el primer desafío inmunológico que deben enfrentar los patógenos periodontales, por su función de barrera física y química, tanto por el epitelio como por las quimiocinas producidas por el mismo³¹³. Se logró arribar a la conclusión de que la melatonina tiene un efecto antiapoptótico en las GMSCs. Se podría complementar este trabajo, con la medición de mediadores de inflamación para comprobar el efecto de 'buffer inmunológico' de la melatonina y de las GMSCs.

Esto podría sustentarse en el hecho de que se ha demostrado la existencia de GMSCs extraídas de tejidos gingivales inflamados, que exhiben un perfil fenotípico, y potencial de diferenciación, tanto *in vivo* como *in vitro*, incluso más que las GMSCs aisladas de tejido gingival sano³¹⁴. Dicho hallazgo es de mucha relevancia, ya que las GMSCs son aisladas de un tejido en constante contacto con el desafío bacteriano, lo cual señala atributos positivos debido a la persistencia de dichas células en este ambiente, a la vez que mantienen sus propiedades mesenquimales. La obtención de GMSCs para esta tesis estuvo sujeta, en un primer momento, al desafío bacteriano presente en el ambiente bucal de las ratas, como ya fue mencionado. Esto representa un dato no menor, debido a la dificultad de obtener células en un cultivo primario estéril y la habilidad de estas células para, en los primeros días de cultivo, ser capaces de sobrevivir tanto al reto bacteriano como así al antiséptico utilizado en las encías. A partir de esto se podría delimitar a las GMSCs como una prometedora fuente de células a utilizarse en terapias periodontales regenerativas, donde podrían ser expuestas a un ambiente inflamado.

Esta investigación ayudó a dilucidar los mecanismos por los cuales las GMSCs se dañan durante una lesión celular relacionada con el agotamiento de glutatión, que causa estrés oxidativo. Se podría confirmar que la melatonina actúa como una molécula protectora de las GMSCs por su rol como antioxidante y antiapoptótico.

Efecto osteodiferenciador de la melatonina

El estudio de las actividades osteogénicas de la melatonina abre un nuevo panorama para estudiarlas, en un contexto de reproductibilidad, para dar sustento a futuras intervenciones clínicas de periodoncia regenerativa.

En diversos estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos, orientados a la osteoporosis^{252, 254, 255}, se destacan los efectos de la melatonina cuando es suministrada en mujeres perimenopáusicas, que presentan osteopenia, postulándola así como un fármaco preventivo para la osteoporosis, mediante la restauración de la proporción OPG:RANKL. También es destacable que la melatonina actúa vía receptores MT2.

Tinto *et al*, suministró melatonina 1 mg/día vía oral en pacientes con periodontitis en estadio III, comparada con la terapia periodontal convencional, hallando diferencias significativas en la reducción de la bolsa periodontal inmediata³¹⁵. Las limitaciones de ese estudio radican en el poco tamaño muestral y la falta de medición de marcadores de osteoformaciones, tales como la proporción RANKL/OPG. Bazyar *et al*²⁹³ suministraron 6 mg/día vía oral de melatonina como adjunta a la terapia básica en pacientes diabéticos, y encontraron significativas reducciones de interleuquinas proinflamatorias, como TNF α , IL-6 y PCR. Cabe destacar que este estudio midió a las ocho semanas, a diferencia del seguimiento de seis meses del estudio de Tinto *et al*. De modo similar Chitsazi *et al*³¹⁶ estudió la terapia básica periodontal en combinación con melatonina y vitamina C, hallando, tal como los anteriores estudios, mejorías clínicas.

En un estudio de pacientes diabéticos por Cutando *et. al.*²⁴⁹ se llegó al resultado de que la aplicación tópica de melatonina muestra mejoras en el índice gingival y en la profundidad de la bolsa. De esta manera se reducen las concentraciones salivales de RANKL y se aumentan las concentraciones salivales de osteoprotegerina. Estos hallazgos indican que la melatonina aplicada tópicamente puede reducir la pérdida de hueso alveolar, y ayudar a retrasar la progresión de la enfermedad periodontal.

Hasta el momento, dentro de lo estudiado para abordar el presente trabajo de tesis, es la primera vez que se estudian los efectos osteodiferenciadores de la melatonina en esta subpoblación de MSCs. La melatonina no solo fue protectora de las GMSCs, sino que también, promovió un mayor nivel de osteodiferenciación comparado con los controles con medio osteogénico solo.

Estudios básicos, como el presente, brindan sustento a la posible aplicación de melatonina en el tratamiento de la terapia básica periodontal. Más aun, se postula a la

melatonina en base a los resultados obtenidos, no solo como un agente preventivo de aparición y desarrollo de la periodontitis, sino como a un adjunto en terapias regenerativas periodontales, en conjunto con el posible uso de GMSCs. No obstante, se deben tener presente las limitaciones un estudio *in vitro*, el cual representa una porción reducida del del sistema.

Influencia del daño celular a las GMSCs en diferentes momentos del protocolo de diferenciación osteogénica

La bibliografía sugiere que hay una correlación positiva entre la ingesta de antioxidantes y anabolismo óseo^{18, 254, 317, 318-320}. Es por este motivo que no se esperaba que ante el daño celular relacionado con el estrés oxidativo, mediante la depleción de GHS, con el modelo propuesto en este estudio, se incrementara la diferenciación de osteoblastos, evidenciada claramente mediante el aumento de alizarina roja en los grupos tratados con medio OS+. El diseño experimental buscó mimetizar lo ocurrido en las MSCs del ambiente periodontal en diferentes estadios de diferenciación de acuerdo a lo planteado en el último objetivo de esta tesis. Se conjeturaba que ante medios inductores, las mismas diferenciaran al linaje osteogénico. Por el contrario, si se le añadía el modelo de daño celular depletor de glutatión, era esperable que las células diferencien en menor medida a linaje osteogénico. Los medios se removían luego de 48 horas coincidiendo con el recambio de medios del protocolo estándar y se colocaba medio fresco. Dichos resultados no concuerdan con lo hallado por Wang *et al.*¹¹⁶ quien encontró que en su modelo de daño celular ocasionado por ácido butírico, las células veían afectadas su capacidad de diferenciación y mineralización, evidenciado por la disminución de la FAL y genes osteogénicos.

Dado que la periodontitis es una enfermedad crónica, es una limitación de este estudio no haber expuesto a estas células durante los 18 días de duración del protocolo al modelo de daño celular de BSO y glutamato con y sin melatonina. En un futuro debería investigarse con el modelo de daño durante todo el protocolo de diferenciación. No obstante, las células tratadas con los medios OS-, mostraron una ostensible caída en la viabilidad, que por más que se recambiaron los medios a las 48 horas, mostraron al final una drástica caída en la viabilidad. A su vez, la melatonina fue efectiva para suprimir dicho efecto llevando a los valores de los controles. Esto indicaría la susceptibilidad mayor en las GMSCs que en las ya comprometidas a linaje osteogénico.

Tal como se comprobó en la última etapa de este trabajo, el glutamato actuaría como diferenciador osteogénico en estadios iniciales de la diferenciación celular³²⁰. Ante cambios mecánicos de la microarquitectura ósea, el glutamato actúa como un neurotransmisor de los mismos³²¹. Sumado a esto, se han identificado receptores de glutamato en células de ligamento periodontal³⁰⁴. Asimismo, estudios previos han indicado que el glutamato activa vías Wnt y AP-1³²¹. Más aún, en otro estudio, identificaron que el ERK1 / 2 y proteína quinasa C, se activaron en 30 minutos secuencialmente, demostrando que la vía señalizadora de la señal MAPK también está involucrada en la señalización del glutamato, y que esto conduce a diferenciación osteogénica y cementogénica³²³⁻³²⁶. Es de destacar, que si bien no estaba dentro de los objetivos de esta tesis, este hallazgo es interesante y se confirma con lo hallado en la bibliografía.

Romagnoli *et al.*²⁷⁶ utilizó un modelo depletor de GHS basado únicamente en BSO en la línea celular osteoblástica SaOS-2, descubriendo de esta manera que el BSO inhibe la diferenciación osteoblástica. Interesantemente en este estudio, solo colocaron BSO durante los primeros dos días de diferenciación osteogénica, logrando así su disminución. En este trabajo de tesis, las GMSCs fueron sensibles a la combinación de BSO y GLUT.

Agidigbi *et al.*³²⁷ hallaron que el aumento de GSH aumenta la diferenciación y actividad de los osteoclastos. No se analizó, en el presente trabajo, la actividad de osteoclastos, lo cual representa una limitación. No obstante, el hecho de que las GMSCs sean sensibles solo en su estadio indiferenciado, y que puestos en marcha los mecanismos para realizar un compromiso hacia el linaje osteogénico, indicaría la relevancia del estadio de diferenciación. En otras palabras, cuanto más inmadura sea la célula, mayor va a ser el daño relacionado al EO.

A partir de lo ya mencionado, la melatonina es más efectiva como preventiva, en cuanto a la diferenciación osteogénica. Coincidiendo, de esta manera, con el estudio de Renn *et al.*³²⁸. Según nuestros resultados, la melatonina es muy efectiva como preventiva del daño celular. Esto se debe a que fue capaz de revertir el daño ocasionado en células inmaduras (GMSCs tratadas con OS-). Una vez que estas comienzan a comprometerse hacia el linaje osteogénico, como consecuencia del tratamiento con medio OS+, la melatonina no ejerce efecto protector. Esto puede ser debido a que las células una vez diferenciadas, son menos sensibles al daño celular, relacionado al estrés oxidativo. Estos resultados son compatibles con los de Renn *et al.*³²⁸ quienes arribaron a la conclusión de

que la melatonina es más efectiva cuando es suplementada previamente a la periodontitis, postulándola como un agente preventivo de dicha enfermedad. En el trabajo presente, se constató que la melatonina protege células indiferenciadas en un ambiente de estrés oxidativo relacionado con la depleción de glutatión.

En cuanto al daño celular, ocasionado por este modelo constituido por BSO y glutamato en los ensayos de capacidad clonogénica, la melatonina no fue capaz de revertir el daño en la formación de UFCs. Esto puede deberse a la escasa cantidad de células sembradas (150 por pocillo). Esto habla de la relevancia de la cantidad de células madre que deben de haber en el nicho a ser reparado periodontalmente, el cual cuenta con un ambiente inflamado y con ROS^{6, 39}. Estos experimentos determinan que la cantidad de GMSCs iniciales es crítica para lograr una regeneración eficiente. En el ensayo de la herida, se observó que la melatonina fue capaz de revertir el daño ocasionado por el BSO y el glutamato, nuevamente, la melatonina prueba ser un potente adjuvante para promover una correcta regeneración periodontal. Esta afirmación puede ser hecha ya que protege a las células, para que puedan migrar al lugar donde se las necesite, tal es en el caso de un defecto óseo como consecuencia de la periodontitis.

Se destaca que, si bien nos encontramos en un período de expansión terapéutica ante la incorporación de células madre a la clínica, existen muchos tratamientos con escasa base científica prendando con promesas sobre pacientes que no encuentran respuesta en la medicina tradicional. Habiendo múltiples alertas de precaución de organismos internacionales, como la FDA, EE.UU³²⁹ sobre dicha vulnerabilidad en el sistema médico. Por ello, se debe enfatizar que estudios básicos, como el presente, resultan de interés tanto para la sociedad, como para la comunidad médica. Estos estudios sustentan las prácticas terapéuticas.

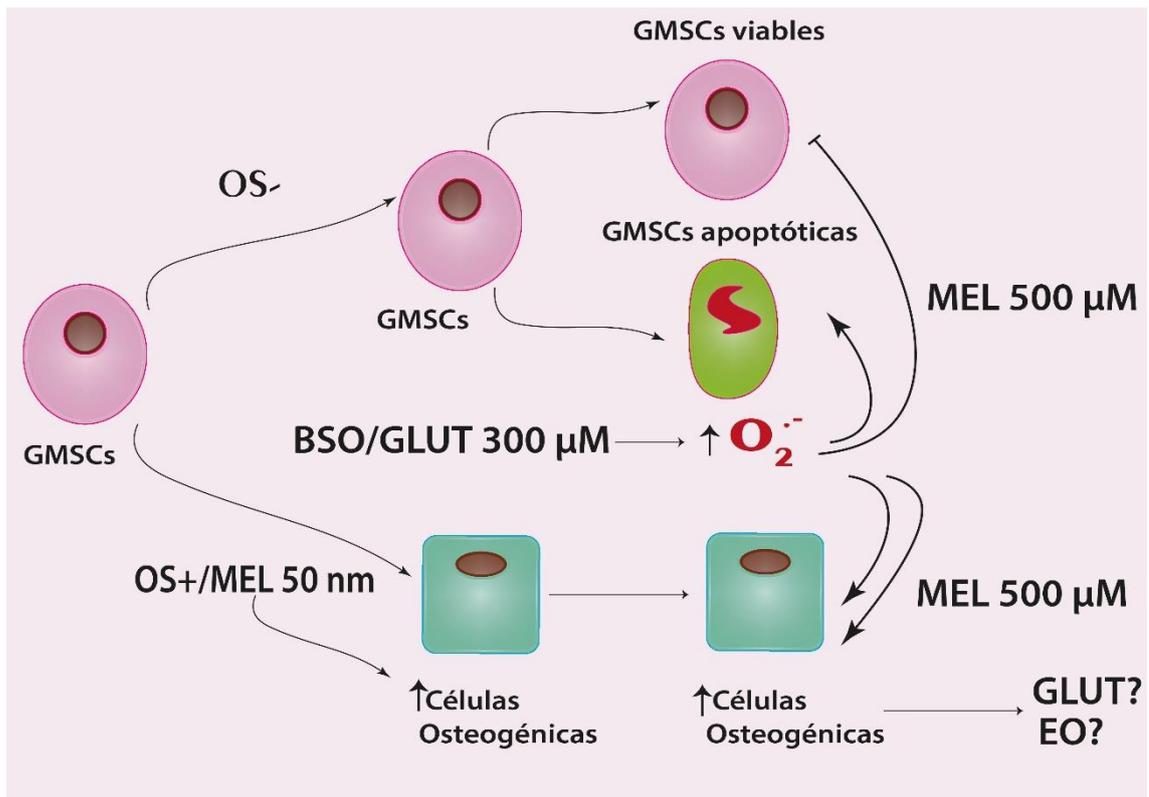


Figura 49. Mecanismo propuesto mediante el que actúa la melatonina sobre las GMSCs estudiadas en este trabajo. Las GMSCs mostraron un aumento de diferenciación osteogénica al añadirse melatonina al medio osteogénico. A su vez, las GMSCs son sometidas al estrés oxidativo relacionado con el modelo constituido por BSO y GLUT. Cuando las mismas fueron cultivadas en un medio no osteogénico, el estrés oxidativo afectó su viabilidad por apoptosis. Sin embargo, la melatonina a dosis de 500 μM restituyó la viabilidad. Cuando las células fueron sometidas al medio osteogénico estas lograron diferenciarse, independientemente de la adición del modelo de estrés oxidativo. Esto puede deberse al glutamato, o bien, a un mecanismo adaptativo de las células, ante la injuria perpetrada por el modelo de BSO y GLUT. Ilustración científica: Verónica M. Solá.

Conclusiones

Se concluye, en una primera instancia, que el tejido gingival es apto para el aislamiento y la expansión, y para el establecimiento de cultivos abundantes de GMSCs de rata. Se ha demostrado que dichos cultivos presentan células de morfología fibroblastoide y adherencia al plástico y, con alta capacidad de autorenovación. A su vez, se observó la capacidad de migración y de adhesión celular en los ensayos de la herida. Más aún, las células aisladas mostraron transcritos positivos para marcadores mesenquimales, CD73, y CD105 y negativos para marcadores hematopoyéticos, CD34 y CD 45. En estos cultivos de GMSCs, la combinación de drogas DL-butionina sulfoximina junto con glutamato, producen un daño celular relacionado al estrés oxidativo, que fue evidenciado por la disminución de la viabilidad en concordancia con el aumento de anión superóxido y apoptosis. La melatonina fue capaz de evitar dicho daño, evidenciado por la restauración del índice apoptótico de los niveles basales. Se pudo demostrar la relación entre la viabilidad celular y los niveles de anión superóxido. Más aun, la melatonina no resulta tóxica dentro de amplio rango de dosis (0,032 μ M-1000 μ M).

Las GMSCs mostraron diferenciación osteogénica en dieciocho días de cultivo con medios de inducción, resultando, la melatonina, en un contundente factor de diferenciación. Esto fue observado tanto mediante tinción con alzarina roja, como mediante el aumento de la actividad de fosfatasa alcalina. Funcionalmente, las células diferenciadas cesaron su migración y su capacidad clonogénica. Este grado de diferenciación tuvo incidencia en el comportamiento de las células ante el daño generado por el DL-butionina sulfoximina y glutamato.

Las GMSCs tratadas con medios basales, durante todo el protocolo de diferenciación, fueron dañadas y su viabilidad disminuyó en los tres estadios estudiados. La melatonina, por su parte, fue capaz de revertir este efecto y de restaurar a los valores controlables. No obstante, en el caso de las UFCs, el daño celular ocasionado no pudo ser atenuado por la misma. Las células tratadas con medio osteogénico, interesantemente, demostraron un incremento en la diferenciación, reflejado en un aumento cuantitativo de la alizarina roja, debido a la acción del glutamato en los estadios iniciales. En los estadios medios y finales, la diferenciación fue causada por la combinación de DL-butionina sulfoximina y glutamato.

Se concluye, por último, que la melatonina no solo protege a las GMSCs del daño celular, sino que también, promueve su diferenciación osteogénica. Los resultados aquí

Conclusiones

presentados sustentan su posible uso, no solo como coadyuvante en la terapia periodontal no quirúrgica, sino también en las terapias regenerativas periodontales. Las GMSCs, por su facilidad de obtención y expansión, son candidatas para dichos procedimientos junto con la melatonina. No obstante, tanto sus propiedades inmunogénicas y, sobre todo, tumorigénicas deben ser cuidadosamente estudiadas antes de proceder a estudios clínicos.

Perspectivas futuras

Este trabajo contribuye, en modo significativo, a la comprensión de la capacidad de las GMSCs en su capacidad clonogénica, proliferativa, y en la preservación de sus propiedades a través de sucesivos pasajes. A pesar del trabajo anteriormente presentado, se resta por conocer, a futuro, sus relevantes propiedades inmunomoduladoras.

- En dicha tesis, se caracterizaron varios marcadores de MSCs mediante los transcriptos de ARNm. Sin embargo, la ISCT requiere la caracterización proteica, mediante una técnica de citometría de flujo, de un panel ampliado de marcadores de superficie. Por lo cual, sería necesario, en un futuro, adherirse a dicho protocolo de caracterización.
- En base a hallazgos en las capacidades protectoras y osteodiferenciadoras de las GMSCs, se prevé la caracterización de sus receptores de melatonina y la activación de las cascadas de señalización activadas.
- Basándose en el interesante aporte, en cuanto a los estadios de diferenciación y el grado de madurez de las GMSCs al inducirse daño por estrés oxidativo, se prevé la medición de ROS en forma directa y la expresión de glutatión por parte de las células.
- En cuanto a la información aportada, sobre los osteoblastos diferenciados de GMSCs, se prevé estudiar el rol de los osteoclastos, su interacción con los osteoblastos y el rol de la melatonina en dichos grupos celulares.
- Teniendo en cuenta los resultados sobre el rol de la melatonina y su capacidad osteodiferenciadora, se propone a futuro compararla con las proteínas derivadas del esmalte, como terapéuticos regenerativos.
- Sobre los conceptos abordados en esta tesis, se propone a futuro implementar un modelo *in vivo* de regeneración periodontal constituido por GMSCs alogénicas, y por la melatonina, como potenciadora de esta diferenciación y moduladora de la inflamación.

Bibliografía

1. Silva LM, Brenchley L, Moutsopoulos NM. Primary immunodeficiencies reveal the essential role of tissue neutrophils in periodontitis. *Immunol Rev.* 2019;287(1):226-35.
2. Kocher T, König J, Borgnakke WS, Pink C, Meisel P. Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. *Periodontol 2000.* 2018; 78:59-97.
3. Opacic J, Maldonado A, Ramseier CA, Laugisch O. Influence of periodontitis on pregnancy and childbirth. *Swiss Dent J.* 22 de 2019; 129:581–589.
4. Mohr S, Amylidi-Mohr SK, Stadelmann P, Sculean A, Persson R, Eick S, et al. Systemic Inflammation in Pregnant Women With Periodontitis and Preterm Prelabor Rupture of Membranes: A Prospective Case-Control Study. *Front Immunol.* 2019; 10:2624.
5. Caracho RA, Foratori-Junior GA, Fusco NDS, Jesuino BG, Missio ALT, Sales-Peres SH de C. Systemic conditions and oral health-related quality of life of pregnant women of normal weight and who are overweight. *Int Dent J.* 27 de febrero de 2020;
6. Chapple ILC, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.* 2007; 43:160-232.
7. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2015; 69:7-17.
8. Bax BE, Alam AS, Banerji B, Bax CM, Bevis PJ, Stevens CR, et al. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 31 de marzo de 1992; 183:1153-8.
9. Hall TJ, Schaeublin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ. The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 6 de febrero de 1995;207(1):280-7.
10. Stein RM, Kang HJ, McCorvy JD, Glatfelter GC, Jones AJ, Che T, et al. Virtual discovery of melatonin receptor ligands to modulate circadian rhythms. *Nature.* 2020;579: 609-14.
11. Stepicheva NA, Weiss J, Shang P, Yazdankhah M, Ghosh S, Bhutto IA, et al. Melatonin as the Possible Link Between Age-Related Retinal Regeneration and the Disrupted Circadian Rhythm in Elderly. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1185:45-9.
12. Reiter RJ, Mayo JC, Tan D-X, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res.* 2016; 61:253-78.
13. Zare Javid A, Hosseini SA, Gholinezhad H, Moradi L, Haghghi-Zadeh MH, Bazayr H. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Melatonin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus with Periodontal Disease Under Non-Surgical Periodontal Therapy: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2020;13:753-61.
14. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(11):1177-85.
15. Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, et al. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J Pharm Pharmacol.* octubre de 2001;53:1393-401.
16. Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R, Sewerynek E, Melchiorri D, Barlow-Walden LR. Melatonin, a mediator of electron transfer and repair reactions, acts synergistically with the chain-breaking

- antioxidants ascorbate, trolox and glutathione. *Neuroendocrinol Lett.* 1 de enero de 1995;17(2):87-92.
17. Acuña Castroviejo D, López LC, Escames G, López A, García JA, Reiter RJ. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(2):221-40.
 18. Maria S, Witt-Enderby PA. Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures. *J Pineal Res.* 2014;56:115-25.
 19. Abdel Moneim AE, Guerra-Librero A, Florido J, Shen Y-Q, Fernández-Gil B, Acuña-Castroviejo D, et al. Oral Mucositis: Melatonin Gel an Effective New Treatment. *Int J Mol Sci.* 7 de mayo de 2017;18(5).
 20. Camacho-Alonso F, Urrutia-Rodríguez I, Oñate-Cabrerizo D, Oñate-Sánchez RE, Rodríguez-Lozano FJ. Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human osteoblasts. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg.* agosto de 2017;45(8):1251-7.
 21. Carpentieri AR, Peralta Lopez ME, Aguilar J, Solá VM. Melatonin and periodontal tissues: Molecular and clinical perspectives. *Pharmacol Res.* noviembre de 2017;125(Pt B):224-31.
 22. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* julio de 1956;11(3):298-300.
 23. Coso S, Harrison I, Harrison CB, Vinh A, Sobey CG, Drummond GR, et al. NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16:1229-47.
 24. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* enero de 2007;87(1):245-313.
 25. Storz P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 15 de febrero de 2011;14(4):593-605.
 26. Zhao D, Yu Y, Shen Y, Liu Q, Zhao Z, Sharma R, et al. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Front Endocrinol.* 2019. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00249/full>
 27. Taverne YJ, Merkus D, Bogers AJ, Halliwell B, Duncker DJ, Lyons TW. Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life: A molecular timescale from Earth's earliest history to the rise of complex life. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2018;40(3).
 28. Luo G, Ono S, Beukes NJ, Wang DT, Xie S, Summons RE. Rapid oxygenation of Earth's atmosphere 2.33 billion years ago. *Sci Adv.* 2016;2: e1600134.
 29. Kump LR, Barley ME. Increased subaerial volcanism and the rise of atmospheric oxygen 2.5 billion years ago. *Nature.* 2007;448(7157):1033-6.
 30. Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic Hypothesis of Oxidative Phosphorylation. *Nature.* enero de 1967;213(5072):137-9.
 31. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* diciembre de 1992;5(6):834-42.
 32. TARR M, SAMSON F. *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage* . Birkhäuser Basel; 1993. Disponible en: <https://www.springer.com/gp/book/9781461598428>
 33. Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G. The Fenton reagents. *Free Radic Biol Med.* octubre de 1993;15(4):435-45.

Bibliografía

34. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet Lond Engl.* 10 de septiembre de 1994;344(8924):721-4.
35. Kehrer JP (1993) Free radicals as mediators of tissue injury. *Crit Rev Toxicol* 23:21–48 - Buscar con Google [Internet]. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: [https://www.google.com/search?q=Kehrer+JP+\(1993\)+Free+radicals+as+mediators+of+tissue+injury.+Crit+Rev+Toxicol+23%3A21%E2%80%9348&oq=Kehrer+JP+\(1993\)+Free+radicals+as+mediators+of+tissue+injury.+Crit+Rev+Toxicol+23%3A21%E2%80%9348&aqs=chrome..69i57.892j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=Kehrer+JP+(1993)+Free+radicals+as+mediators+of+tissue+injury.+Crit+Rev+Toxicol+23%3A21%E2%80%9348&oq=Kehrer+JP+(1993)+Free+radicals+as+mediators+of+tissue+injury.+Crit+Rev+Toxicol+23%3A21%E2%80%9348&aqs=chrome..69i57.892j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8)
36. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2017;74(21):3863-81.
37. Liu L-N. Distribution and dynamics of electron transport complexes in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 1 de marzo de 2016;1857(3):256-65.
38. Moreno SN, Docampo R. Reduction of the metallochromic indicators murexide and tetramethylmurexide to their free radical metabolites by cytoplasmic enzymes and reducing agents. *Chem Biol Interact.* enero de 1986;57(1):17-25.
39. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol* 2000. febrero de 2014;64:139-53.
40. Halliwell B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity? *Oral Dis.* mayo de 2000;6(3):136-7.
41. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* mayo de 2004;142:231-55.
42. Koch R. Die Ätiologie der Tuberkulose. 30 de marzo de 2010. Disponible en: <https://edoc.rki.de/handle/176904/5163>
43. Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* octubre de 2009; 15:468-77.
44. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* mayo de 2008;61):577-87.
45. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* noviembre de 2008;3 Suppl 3:131-139.
46. Maria S, Samsonraj RM, Munmun F, Glas J, Silvestros M, Kotlarczyk MP, et al. Biological effects of melatonin on osteoblast/osteoclast cocultures, bone, and quality of life: Implications of a role for MT2 melatonin receptors, MEK1/2, and MEK5 in melatonin-mediated osteoblastogenesis. *J Pineal Res.* abril de 2018;64(3).
47. *Histología y embriología bucodental*; M. Gomez de Ferraris. 3ra Edición. 2009. Editorial Panamericana.
48. Gasser JA, Kneissel M. Bone Physiology and Biology. En: Smith SY, Varela A, Samadfam R, editores. *Bone Toxicology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 27-94. (Molecular and Integrative Toxicology). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56192-9_2
49. Walsh JS. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surg Oxf.* 1 de enero de 2015;33(1):1-6.

Bibliografía

50. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong D-W, Bae YS, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*. 2005;106(3):852-9.
51. Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, Fuller K, Chambers TJ. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology*. 146:728-35.
52. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. 1 de octubre de 2008;19:444-51.
53. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(4):219-27.
54. Destroy to Rebuild: The Connection Between Bone Tissue Remodeling and Matrix Metalloproteinases <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7013034/>
55. Matsuo K, Otaki N. Bone cell interactions through Eph/ephrin. *Cell Adhes Migr*. 1 de marzo de 2012;6:148-56.
56. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*. agosto de 2006;4:111-21.
57. Irie N, Takada Y, Watanabe Y, Matsuzaki Y, Naruse C, Asano M, et al. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. *J Biol Chem*. 22 de mayo de 2009;284:14637-44.
58. Takami M, Kim N, Rho J, Choi Y. Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de agosto de 2002;169(3):1516-23.
59. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: Interactions of the Bone and Immune System. *Endocr Rev*. junio de 2008;29(4):403-40.
60. Han X, Kawai T, Eastcott JW, Taubman MA. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de enero de 2006;176(1):625-31.
61. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. noviembre de 2005;76(11 Suppl):2033-41.
62. Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. diciembre de 2016;8(6):225-35.
63. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 15 de mayo de 2003;423(6937):337-42.
64. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45(S20):S1-8.
65. Hartenbach FARR, Velasquez É, Nogueira FCS, Domont GB, Ferreira E, Colombo APV. Proteomic analysis of whole saliva in chronic periodontitis. *J Proteomics*. 20 de febrero de 2020;213:103602.
66. Duarte PM, de Lorenzo Abreu L, Vilela A, Feres M, Giro G, Miranda TS. Protein and mRNA detection of classic cytokines in corresponding samples of serum, gingival tissue and gingival crevicular fluid from subjects with periodontitis. *J Periodontol Res*. abril de 2019;54(2):174-9.
67. Teughels W, Feres M, Oud V, Martín C, Matesanz P, Herrera D. Adjunctive effect of systemic antimicrobials in periodontitis therapy. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 29 de enero de 2020;

Bibliografía

68. Bostanci N, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):68-84.
69. Wang Y, Wang Q, Arora PD, Rajshankar D, McCulloch CA. Cell adhesion proteins: roles in periodontal physiology and discovery by proteomics. *Periodontol 2000*. octubre de 2013;63(1):48-58.
70. Ryder MI, Couch ET, Chaffee BW. Personalized periodontal treatment for the tobacco- and alcohol-using patient. *Periodontol 2000*. 2018;78(1):30-46.
71. Ramachandra SS, Gupta VV, Mehta DS, Gundavarapu KC, Luigi N. Differential Diagnosis between Chronic versus Aggressive Periodontitis and Staging of Aggressive Periodontitis: A Cross-sectional Study. *Contemp Clin Dent*. 2017;8(4):594-603.
72. Clasificación Internacional del Funcionamiento de la Discapacidad y de la Salud (CIF) - DEIS [Internet]. [citado 4 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.deis.cl/clasificacion-internacional-del-funcionamiento-de-la-discapacidad-y-de-la-salud-cif/>
73. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 – 2012. *J Periodontol*. mayo de 2015;86(5):611-22.
74. White DA, Tsakos G, Pitts NB, Fuller E, Douglas GVA, Murray JJ, et al. Adult Dental Health Survey 2009: common oral health conditions and their impact on the population. *Br Dent J*. 2012;213(11):567-72.
75. Oppermann RV, Haas AN, Rösing CK, Susin C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *Periodontol 2000*. febrero de 2015;67(1):13-33.
76. Romanelli H, Gonzalez y Rivas M, Chiappe V, Gómez M, Macchi R. Periodontal treatment needs in Argentine adult subjects. *Acta Odontol Latinoam*. 2007;20(1):39-47.
77. Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. Global Economic Impact of Dental Diseases. *J Dent Res*. octubre de 2015;94(10):1355-61.
78. Cheng Z, Meade J, Mankia K, Emery P, Devine DA. Periodontal disease and periodontal bacteria as triggers for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017;31:19-30.
79. Kurgan S, Kantarci A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):51-67.
80. Bosshardt DD. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):43-50.
81. Flavell SJ, Hou TZ, Lax S, Filer AD, Salmon M, Buckley CD. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *Br J Pharmacol*. marzo de 2008;153 Suppl 1:S241-246.
82. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. marzo de 1976;34(3):235-49.
83. Eickholz P, Koch R, Kocher T, Hoffmann T, Kim T-S, Meyle J, et al. Clinical benefits of systemic amoxicillin/metronidazole may depend on periodontitis severity and patients' age: An exploratory sub-analysis of the ABPARO trial. *J Clin Periodontol*. abril de 2019;46(4):491-501.
84. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000*. junio de 2013;62(1):203-17.
85. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):317-29.

Bibliografía

86. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol.* marzo de 2014;85(3):465-77.
87. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol.* diciembre de 2014;29(6):248-57.
88. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, et al. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de noviembre de 2007;179(10):7021-9.
89. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 17 de noviembre de 2011;10(5):497-506.
89. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *BDJ.* 2013;214:467-71.
91. El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M, Darweesh M, Alshahat M, Kantarci A, et al. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 Fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol.* noviembre de 2010;81(11):1635-43.
92. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:711-60.
93. Santangelo F. Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach. *Curr Med Chem.* 2003;10(23):2599-610.
94. Cross CE, van der Vliet A, O'Neill CA, Louie S, Halliwell B. Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect.* diciembre de 1994;102 Suppl 10:185-91.
95. Svardal AM, Mansoor MA, Ueland PM. Determination of reduced, oxidized, and protein-bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1 de febrero de 1990;184(2):338-46.
96. Chapple ILC, Brock G, Eftimiadi C, Matthews JB. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *Mol Pathol.* diciembre de 2002;55(6):367-73.
97. Cope G, Thorpe G, Holder R, Luesley D, Jordan J. Serum and tissue antioxidant capacity in cervical intraepithelial neoplasia investigated using an enhanced chemiluminescent reaction. *Ann Clin Biochem.* enero de 1999;36 :86-93.
98. Chapple ILC. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *Clin Mol Pathol.* octubre de 1996;49(5):M247-55.
99. Carlsson J, Larsen JT, Edlund MB. Peptostreptococcus micros has a uniquely high capacity to form hydrogen sulfide from glutathione. *Oral Microbiol Immunol.* febrero de 1993;8(1):42-5.
100. Chu L, Xu X, Dong Z, Cappelli D, Ebersole JL. Role for recombinant gamma-glutamyltransferase from *Treponema denticola* in glutathione metabolism. *Infect Immun.* enero de 2003;71(1):335-42.
101. Mäkinen PL, Mäkinen KK. gamma-Glutamyltransferase from the outer cell envelope of *Treponema denticola* ATCC 35405. *Infect Immun.* febrero de 1997;65(2):685-91.
102. Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* agosto de 1990;5(4):195-201.
103. Chu L, Dong Z, Xu X, Cochran DL, Ebersole JL. Role of glutathione metabolism of *Treponema denticola* in bacterial growth and virulence expression. *Infect Immun.* marzo de 2002;70(3):1113-20.

Bibliografía

104. Zappacosta B, Persichilli S, De Sole P, Mordente A, Giardina B. Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers. *Arch Oral Biol.* junio de 1999;44(6):485-8.
105. Zappacosta B, Persichilli S, Mordente A, Minucci A, Lazzaro D, Meucci E, et al. Inhibition of salivary enzymes by cigarette smoke and the protective role of glutathione. *Hum Exp Toxicol.* enero de 2002;21(1):7-11.
106. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol.* 1999;277:1067-1088.
107. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* octubre de 1996;154(4 Pt 1):1055-60.
108. Chang Y-C, Hsieh Y-S, Lii C-K, Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y. Induction of c-fos expression by nicotine in human periodontal ligament fibroblasts is related to cellular thiol levels. *J Periodontal Res.* febrero de 2003;38(1):44-50.
109. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy - D'Arcy - 2019 - Cell Biology <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbin.11137>
110. Kim JH, Lee SY, Oh SY, Han SI, Park HG, Yoo M-A, et al. Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncol Rep.*;12(6):1233-8.
111. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(6):871-7.
112. Deretic V, Kimura T, Timmins G, Moseley P, Chauhan S, Mandell M. Immunologic manifestations of autophagy. *J Clin Invest.* enero de 2015;125(1):75-84.
113. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death - Susan Elmore, 2007. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1080/01926230701320337>
114. Caspase activation is involved in chronic periodontitis - Bantel - 2005 - FEBS Letters - Wiley Online Library. Disponible en: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2005.09.020>
115. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, Yamamoto M, Otsuka K, Abe K, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res.* enero de 2008; 87:51-5.
116. Wang YL, He H, Liu ZJ, Cao ZG, Wang XY, Yang K, et al. Effects of TNF- α on Cementoblast Differentiation, Mineralization, and Apoptosis: *J Dent Res* <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034515590349>
117. Lundmark A, Davanian H, Båge T, Johannsen G, Koro C, Lundeberg J, et al. Transcriptome analysis reveals mucin 4 to be highly associated with periodontitis and identifies pleckstrin as a link to systemic diseases. *Sci Rep.* 2015; 5:18475.
118. Liu Y-Z, Maney P, Puri J, Zhou Y, Baddoo M, Strong M, et al. RNA-sequencing study of peripheral blood monocytes in chronic periodontitis. *Gene.* 1 de mayo de 2016;581(2):152-60.
119. Sallum EA, Ribeiro FV, Ruiz KS, Sallum AW. Experimental and clinical studies on regenerative periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2019; 79:22-55.
120. Nagy P, Molnar B, Nemes B, Schupbach P, Windisch P. Histologic Evaluation of Human Intra-bony Periodontal Defects Treated with Deproteinized Bovine Bone Mineral in Combination with Orthodontic Tooth Movement: A Case Series. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 11 de noviembre de 2019;
121. Miron RJ, Sculean A, Cochran DL, Froum S, Zucchelli G, Nemcovsky C, et al. Twenty years of enamel matrix derivative: the past, the present and the future. *J Clin Periodontol.* 2016;43(8):668-83.

Bibliografía

122. Miguita L, Deboni MCZ, Sharpe P, Mantesso A. Characterization of progenitor/stem cell population from human dental socket and their multidifferentiation potential. *Cell Tissue Bank*. 2019;
123. Giri TK, Alexander A, Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Ajazuddin N. Current Status of Stem Cell Therapies in Tissue Repair and Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019; 14:117-26.
124. Baker CL, Pera MF. Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 04 de 2018;22: 25-34.
125. Allsopp TE, Ebneith A, Cabrera-Socorro A. Deploying human pluripotent stem cells to treat central nervous system disorders: facts, challenges and realising the potential. *Stem Cell Res*.2019; 41:101581.
126. Mariniello K, Ruiz-Babot G, McGaugh EC, Nicholson JG, Gualtieri A, Gaston-Massuet C, et al. Stem Cells, Self-Renewal, and Lineage Commitment in the Endocrine System. *Front Endocrinol*. 2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6856655/>
127. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. septiembre de 1991;9(5):641-50.
128. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976; 47:327-59.
129. Fernandes KJL, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol*. 2004; 6:1082-93.
130. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells Dayt Ohio*. julio de 2005;23(6):727-37.
131. Kim J-M, Lee S-T, Chu K, Jung K-H, Song E-C, Kim S-J, et al. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res*. 5 de diciembre de 2007; 1183:43-50.
132. Manley H, Sprinks J, Breedon P. Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Women's Attitudes, Willingness, and Barriers to Donation of Menstrual Blood. *J Womens Health* 2002. 2019; 28:1688-97.
133. Bi Y, Ehrchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*. 2007; 13:1219-27.
134. Chang C-J, Yen M-L, Chen Y-C, Chien C-C, Huang H-I, Bai C-H, et al. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells Dayt Ohio*. 24:2466-77.
135. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003;102:1548-9.
136. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*. 1 de noviembre de 2007; 110:3438-46.
137. Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007; 25:3143-54.
138. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. - PubMed - NCBI. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17062733>
139. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:13625-30.

Bibliografía

140. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.
141. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:5807-12.
142. Fawzy El-Sayed KM, Dörfer CE. Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells International.* 2016.
143. Angelopoulos I, Brizuela C, Khoury M. Gingival Mesenchymal Stem Cells Outperform Haploidentical Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells in Proliferation Rate, Migration Ability, and Angiogenic Potential. *Cell Transplant.*2018;27:967-78.
144. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8:315-7.
145. Irwin CR, Picardo M, Ellis I, Sloan P, Grey A, McGurk M, et al. Inter- and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-like phenotypic characteristics by gingival fibroblasts: potential significance for wound healing. *J Cell Sci.* 1994; 107:1333-46.
146. Stephens P, Davies KJ, Occeleston N, Pleass RD, Kon C, Daniels J, et al. Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *Br J Dermatol.* 2001; 144:229-37.
147. Arany PR. Enhancing Skin Grafts with Primed Gingival Mesenchymal Stromal Cells. *J Invest Dermatol.* 2020; 140:519-20.
148. Sanz AR, Carrión FS, Chaparro AP. Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering. *Periodontol 2000.* 2015; 67:251-67.
149. Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* 2005; 125:629-37.
150. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *J Immunol.* 2009; 183:7787-98.
151. Su W-R, Zhang Q-Z, Shi S-H, Nguyen AL, Le AD. Human gingiva-derived mesenchymal stromal cells attenuate contact hypersensitivity via prostaglandin E2-dependent mechanisms. *Stem Cells Dayt Ohio.* noviembre de 2011;29(11):1849-60.
152. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors | *Nature Immunology* <https://www.nature.com/articles/ni.1863>
153. Getts DR, Chastain EML, Terry RL, Miller SD. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2013; 255:197-209.
154. Fawzy-El-Sayed K, Mekhemar M, Adam-Klages S, Kabelitz D, Dörfer C. TIR expression profile of human gingival margin-derived stem progenitor cells. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal.* 2016; 21:30-38.
155. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 19 de octubre de 2011; 12:1035-44.
156. Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1851:414-21.

Bibliografía

157. Rodríguez M, Domingo E, Municipio C, Alvarez Y, Hugo E, Fernández N, et al. Polarization of the Innate Immune Response by Prostaglandin E2: A Puzzle of Receptors and Signals. *Mol Pharmacol.* 2014; 85:187-97.
158. Lee WJ, Tateya S, Cheng AM, Rizzo-DeLeon N, Wang NF, Handa P, et al. M2 Macrophage Polarization Mediates Anti-inflammatory Effects of Endothelial Nitric Oxide Signaling. *Diabetes.* 2015; 64:2836-46.
159. t QZ, Nguyen AL, Yu WH, Le AD. Human Oral Mucosa and Gingiva: A Unique Reservoir for Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res.* 2012; 91:1011-8.
160. Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA. The master switch: The role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26:705-39.
161. Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, et al. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol.* 2005; 6:524-31.
162. Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierro FS, et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J Periodontol.* junio de 2010; 81:917-25.
163. Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol.* 2011;226(3):832-42.
164. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393:377-83.
165. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 3 2008; 133:775-87.
166. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de mayo de 2004;172(9):5213-21.
167. Zheng SG, Wang JH, Koss MN, Quismorio F, Gray JD, Horwitz DA. CD4+ and CD8+ regulatory T cells generated ex vivo with IL-2 and TGF-beta suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de febrero de 2004;172(3):1531-9.
168. Lan Q, Fan H, Quesniaux V, Ryffel B, Liu Z, Guo Zheng S. Induced Foxp3+ regulatory T cells: a potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases? *J Mol Cell Biol.* 1 de febrero de 2012;4(1):22-8.
169. Jiang CM, Liu J, Zhao JY, Xiao L, An S, Gou YC, et al. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* enero de 2015;94(1):69-77.
170. Fawzy El-Sayed KM, Paris S, Becker ST, Neuschl M, De Buhr W, Sälzer S, et al. Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study. *J Clin Periodontol.* 2012; 39:861-70.
171. K. M. Fawzy El-Sayed, S. Paris, S. T. Becker et al., "Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 39, no. 9, pp. 861–870, 2012.
172. Yu X, Ge S, Chen S, Xu Q, Zhang J, Guo H, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stromal cells contribute to periodontal regeneration in beagle dogs. *Cells Tissues Organs.* 2013; 198:428-37.

Bibliografía

173. Fawzy El-Sayed KM, Mekhemar MK, Beck-Broichsitter BE, Bähr T, Hegab M, Receveur J, et al. Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells in conjunction with IL-1ra-hydrogel synthetic extracellular matrix. *J Clin Periodontol.* mayo de 2015;42:448-57.
174. Systemically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells contributing to bone tissue regeneration. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25197363>
175. Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res.* 1995; 18:28-31.
176. Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int.* marzo de 1995;35(3):627-34.
177. Arnao MB, Hernández-Ruiz J. Functions of melatonin in plants: a review. *J Pineal Res.* 2015;59(2):133-50.
178. Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB, Reiter RJ. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell Mol Biol Res.* 1995;41(5):391-5.
179. Poeggeler B, Hardeland R. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J Pineal Res.* 1994; 17:1-10.
180. Arnoult F, Vivien-Roels B, Pévet P, Vernet G. Melatonin in the nemertine worm *Lineus lacteus*: identification and daily variations. *Biol Signals.* 1994; 3:296-301.
181. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res.* 2003;34(4):233-41.
182. Byeon Y, Lee K, Park Y-I, Park S, Back K. Molecular cloning and functional analysis of serotonin N-acetyltransferase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Pineal Res.* 2013;55(4):371-6.
183. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Jou M-J, Acuna-Castroviejo D. Melatonin Mitigates Mitochondrial Meltdown: Interactions with SIRT3. *Int J Mol Sci.* 18 de agosto de 2018;19(8).
184. Areco V, Rodriguez V, Marchionatti A, Carpentieri A, Tolosa de Talamoni N. Melatonin not only restores but also prevents the inhibition of the intestinal Ca (2+) absorption caused by glutathione depleting drugs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* julio de 2016; 197:16-22.
185. Konopelski P, Ufnal M. Indoles - Gut Bacteria Metabolites of Tryptophan with Pharmacotherapeutic Potential. *Curr Drug Metab.* 2018; 19:883-90.
186. Wu H-M, Xie Q-M, Zhao C-C, Xu J, Fan X-Y, Fei G-H. Melatonin biosynthesis restored by CpG oligodeoxynucleotides attenuates allergic airway inflammation via regulating NLRP3 inflammasome. *Life Sci.* 2019; 239:117067.
187. Estaras M, Ameur FZ, Roncero V, Fernandez-Bermejo M, Blanco G, Lopez D, et al. The melatonin receptor antagonist luzindole induces Ca²⁺ mobilization, reactive oxygen species generation and impairs trypsin secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* noviembre de 2019; 1863:129407.
188. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of Melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958; 80:2587-2587.
189. Klein DC. Arylalkylamine N-Acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem.* 16 de febrero de 2007; 282:4233-7.

Bibliografía

190. Cardinali DP, Golombek DA. The Rhythmic GABAergic System. *Neurochem Res.* 1998;23: 607-14.
191. Liu T, Borjigin J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res.* 2005; 39:91-6.
192. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005; 9:11-24.
193. Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278: 1339-45.
194. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep.* 2009; 61:383-410.
195. Bernasconi S, A P. Síndrome metabólico y melatonina: estudio de dos modelos experimentales en ratas. 2012. <https://repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/156>
196. Melatonina en los trastornos de sueño <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-pdf-S0213485318302007>
197. Gonzalez-Arto M, Hamilton TR dos S, Gallego M, Gaspar-Torrubia E, Aguilar D, Serrano-Blesa E, et al. Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology.* enero de 2016; 4:163-71.
198. Zagajewski J, Drozdowicz D, Brzozowska I, Hubalewska-Mazgaj M, Stelmaszynska T, Laidler PM, et al. Conversion L-tryptophan to melatonin in the gastrointestinal tract: the new high performance liquid chromatography method enabling simultaneous determination of six metabolites of L-tryptophan by native fluorescence and UV-VIS detection. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* 2012; 63:613-21.
199. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71:2997-3025.
200. Shimosuma M, Tokuyama R, Tatehara S, Umeki H, Ide S, Mishima K, et al. Expression and cellular localizaion of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. *Histochem Cell Biol.* abril de 2011; 135:389-96.
201. Madapusi BT, Rao SR. Preliminary Evaluation of Human Gingiva as an Extrapineal Site of Melatonin Biosynthesis in States of Periodontal Health and Disease. *J Clin Diagn Res* Disponible en: http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2018&volume=12&issue=1&page=ZF01&issn=0973-709x&id=11078
202. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016; 56:361-83.
203. Liu L, Labani N, Cecon E, Jockers R. Melatonin Target Proteins: Too Many or Not Enough? *Front Endocrinol.* 2019; 10:791.
204. Fischer TW, Kleszczyński K, Hardkop LH, Kruse N, Zillikens D. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J Pineal Res.* 2013; 54:303-12.
205. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* enero de 2004; 36:1-9.

Bibliografía

206. Winiarska K, Drozak J, Wegrzynowicz M, Fraczyk T, Bryla J. Diabetes-induced changes in glucose synthesis, intracellular glutathione status and hydroxyl free radical generation in rabbit kidney-cortex tubules. *Mol Cell Biochem.* junio de 2004;261(1-2):91-8.
207. Schaefer M, Hardeland R. The melatonin metabolite N-acetyl-5-methoxykynuramine is a potent singlet oxygen scavenger. *J Pineal Res.* enero de 2009;46(1):49-52.
208. Hardeland R, Tan D-X, Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res.* septiembre de 2009;47(2):109-26.
209. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* mayo de 1995; 26:497-502.
210. Benot S, Goberna R, Reiter RJ, Garcia-Mauriño S, Osuna C, Guerrero JM. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res.* agosto de 1999; 27:59-64.
211. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci.* 22 de abril de 2013; 14:8638-83.
212. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine.* julio de 2005; 27:189-200.
213. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell.* 24 de febrero de 2006;124:815-22.
214. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J, Kaneko K, Watanabe K, et al. Pivotal Roles of T-Helper 17-Related Cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in Inflammatory Diseases. *Clin Dev Immunol* 2013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3728507/>
215. Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Santana C, Attia AM, Reiter RJ. Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J Interferon Res.* agosto de 1990; 10:403-11.
216. Herman AP, Bochenek J, Skipor J, Król K, Krawczyńska A, Antushevich H, et al. Interleukin-1 β Modulates Melatonin Secretion in Ovine Pineal Gland: Ex Vivo Study. *BioMed Res Int* 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538322/>
217. Zylińska K, Komorowski J, Robak T, Mucha S, Stepień H. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *J Neuroimmunol.* febrero de 1995; 56:187-90.
218. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MMS, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res.* 2007;43(4):365-71.
219. Tan D-X, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* enero de 2003;34(1):75-8.
220. Finocchiaro LME, Glikin GC. Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J Pineal Res.* 1998;24(1):22-34.
221. Finocchiaro LM, Nahmod VE, Launay JM. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J.* 15 de diciembre de 1991;280: 727-31.
222. Córdoba-Moreno MO, de Souza E da S, Quiles CL, dos Santos-Silva D, Kinker GS, Muxel SM, et al. Rhythmic expression of the melatonergic biosynthetic pathway and its differential modulation in vitro by LPS and IL10 in bone marrow and spleen. *Sci Rep.* 16 de marzo de 2020;10(1):1-12.

Bibliografía

223. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab.* febrero de 2005;90(2):992-1000.
224. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Naranjo MC, De Felipe B, Vallejo A, Karasek M, et al. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. *J Cell Physiol.* enero de 2006; 206:273-9.
225. Lissoni P, Marelli O, Mauri R, Resentini M, Franco P, Esposti D, et al. Ultradian chronomodulation by melatonin of a Placebo effect upon human killer cell activity. *Chronobiologia.* diciembre de 1986;13:339-43.
226. Rai S, Haldar C. Pineal control of immune status and hematological changes in blood and bone marrow of male squirrels (*Funambulus pennanti*) during their reproductively active phase. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol CBP.* diciembre de 2003; 136:319-28.
227. Vaughan MK, Hubbard GB, Champney TH, Vaughan GM, Little JC, Reiter RJ. Splenic hypertrophy and extramedullary hematopoiesis induced in male Syrian hamsters by short photoperiod or melatonin injections and reversed by melatonin pellets or pinealectomy. *Am J Anat.* junio de 1987; 179:131-6.
228. Peña C, Rincon J, Pedreanez A, Viera N, Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res.* octubre de 2007; 43:263-9.
229. Arias J, Melean E, Valero N, Pons H, Chacín-Bonilla L, Larreal Y, et al. [Effect of melatonin on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in mice splenocytes]. *Invest Clin.* marzo de 2003; 44:41-50.
230. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso null, Ayala A, Chaudry IH. Melatonin administration attenuates depressed immune functions trauma-hemorrhage. *J Surg Res.* junio de 1996;63: 256-62.
231. Lin X-J, Mei G-P, Liu J, Li Y-L, Zuo D, Liu S-J, et al. Therapeutic effects of melatonin on heatstroke-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res.* mayo de 2011; 50:436-44.
232. Chen CF, Wang D, Reiter RJ, Yeh DY. Oral melatonin attenuates lung inflammation and airway hyperreactivity induced by inhalation of aerosolized pancreatic fluid in rats. *J Pineal Res.* 2011; 50:46-53.
233. Kim G-D, Lee SE, Kim T-H, Jin Y-H, Park YS, Park C-S. Melatonin suppresses acrolein-induced IL-8 production in human pulmonary fibroblasts. *J Pineal Res.* abril de 2012; 52:356-64.
234. Silva SO, Rodrigues MR, Ximenes VF, Bueno-da-Silva AEB, Amarante-Mendes GP, Campa A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *J Neuroimmunol.* 2004; 156:146-52.
235. Pieri C, Recchioni R, Moroni F, Marcheselli F, Marra M, Marinoni S, et al. Melatonin regulates the respiratory burst of human neutrophils and their depolarization. *J Pineal Res.* enero de 1998; 24:43-9.
236. Kim YO, Pyo MY, Kim JH. Influence of melatonin on immunotoxicity of lead. *Int J Immunopharmacol.* octubre de 2000;22: 821-32.
237. Akbulut KG, Gönül B, Akbulut H. The effects of melatonin on humoral immune responses of young and aged rats. *Immunol Invest.* febrero de 2001; 30:17-20.
238. Rai S, Haldar C, Singh R. Modulation of immunity in young-adult and aged squirrel, *Funambulus pennanti* by melatonin and p-chlorophenylalanine. *Immun Ageing A.* 23 de abril de 2009; 6:5.
239. Modulation of Cytokine Production by Dehydroepiandrosterone (DHEA) Plus Melatonin (MLT) Supplementation of Old Mice. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9572155/>

Bibliografía

240. Maestroni GJ. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res.* marzo de 1995;18: 84-9.
241. Dimitrov S, Lange T, Tieken S, Fehm HL, Born J. Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. *Brain Behav Immun.* julio de 2004; 18:341-8.
242. Kelestimur H, Sahin Z, Sandal S, Bulmus O, Yilmaz B. Melatonin-related alterations in Th1/Th2 polarisation in primary thymocyte cultures of pinealectomized rats. *Front Neuroendocrinol.* 2006;
243. Bartold PM. Lifestyle and periodontitis: The emergence of personalized periodontics. *Periodontol 2000.* 2018;78(1):7-11.
244. Suvan JE, Finer N, D'Aiuto F. Periodontal complications with obesity. *Periodontol 2000.* 2018;78(1):98-128.
245. Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozoglu U, Kalkan Y, Canakci CF, et al. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic Biol Med.* 2013; 55:21-6.
246. Arabaci T, Kermen E, Özkanlar S, Köse O, Kara A, Kızıldağ A, et al. Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. *J Periodontol.* julio de 2015; 86:874-81.
247. Kose O, Arabaci T, Kara A, Yemenoglu H, Kermen E, Kizildag A, et al. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis. *J Periodontol.* 2016;87: 82-90.
248. Köse O, Arabaci T, Kizildag A, Erdemci B, Özkal Eminoğlu D, Gedikli S, et al. Melatonin prevents radiation-induced oxidative stress and periodontal tissue breakdown in irradiated rats with experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* junio de 2017;52(3):438-46.
249. Cutando A, Montero J, Gómez-de Diego R, Ferrera M-J, Lopez-Valverde A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *J Clin Exp Dent.* 2015;7: 628-633.
250. Cutando A, López-Valverde A, de Diego RG, de Vicente J, Reiter R, Fernández MH, et al. Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. *Odontology.* 2014;102: 290-6.
251. Greenspan SL, Dresner-Pollak R, Parker RA, London D, Ferguson L. Diurnal variation of bone mineral turnover in elderly men and women. *Calcif Tissue Int.* 1997;60:419-23.
252. Witt-Enderby PA, Slater JP, Johnson NA, Bondi CD, Dodda BR, Kotlarczyk MP, et al. Effects on bone by the light/dark cycle and chronic treatment with melatonin and/or hormone replacement therapy in intact female mice. *J Pineal Res.* 2012; 53:374-84.
253. Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen C-T, Wei Y-H, Jockers R, et al. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. *J Pineal Res.* 2010;49: 222-38.
254. Maria S, Samsonraj, R.M., Munmun, F., Glas, J, Silvestros, M., Mary P. Kotlarczyk, M.P., Rylands, R., Dudakovic, A., van Wijnen, A.J., Enderby, L.T., Lassila, H., Dodda, B., Davis, V.L., Balk, J., Burow, M., Bunnell, B.A., and Witt-Enderby, P.A. Biological Effects of Melatonin on Osteoblast/Osteoclast Co-cultures, Bone and Quality of Life: implications of a role for MT2 melatonin receptors, MEK1/2 and MEK5 in melatonin-mediated osteoblastogenesis. *Journal of Pineal Research*, 2017.

Bibliografía

255. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res.* 2006; 40:332-42.
256. Bellavía SL, Sanz EG, Gallará RV, Carpentieri A, Vermouth NT. Effect of sympathetic denervation of the pineal gland on maternal co-ordination of the circadian rhythm of alpha-amylase in parotid gland from young rats. *Arch Oral Biol.* diciembre de 1993;38(12):1121-5.
257. Vermouth NT, Carriazo CS, Gallará RV, Carpentieri AR, Bellavía SL. Maternal coordination of the daily rhythm of malate dehydrogenase activity in testes from young rats: effect of maternal sympathetic denervation of the pineal gland and administration of melatonin. *Chronobiol Int.* febrero de 1995;12(1):8-18.
258. Bellavía SL, Carpentieri AR, Vaqué AM, Macchione AF, Vermouth NT. Pup circadian rhythm entrainment--effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol Behav.* 2006; 89: 342-9.
259. Carpentieri AR, Oliva C, Díez-Noguera A, Cambras T. Melatonin administration modifies circadian motor activity under constant light depending on the lighting conditions during suckling. *Chronobiol Int.* 2015;32: 994-1004.
260. Carpentieri AR, Pujolràs MA, Chiesa JJ, Noguera AD, Cambras T. Effect of melatonin and diazepam on the dissociated circadian rhythm in rats. *J Pineal Res.* 2006;40(4):318-25.
261. Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Contin MA, Sarmiento MIK, Brocco MA, Panzetta P, et al. Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *J Biol Chem.* 2004; 279:51172-81.
262. Maher P, Hanneken A. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* febrero de 2005;46(2):749-57.
263. Del Valle Bessone C, Fajreldines HD, de Barboza GED, Tolosa de Talamoni NG, Allemandi DA, Carpentieri AR, et al. Protective role of melatonin on retinal ganglion cell: In vitro and in vivo evidences. *Life Sci.* 2019; 218:233-40.
264. AVMA guidelines for the euthanasia of animals. American Veterinary Medical Association. <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>
265. Farías AA, Mojsiejczuk LN, Pisano MB, Flores FS, Aguilar JJ, Jean AN, et al. Environmental Surveillance of Enteroviruses in Central Argentina: First Detection and Evolutionary Analyses of E14. *Food Environ Virol.* 2018;10: 121-6.
266. Yusop N, Battersby P, Alraies A, Sloan AJ, Moseley R, Waddington RJ. Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Rat Bone Marrow and the Endosteal Niche: A Comparative Study. *Stem Cells Int.* 2018:6869128.
267. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. En: *Biotechnology Annual Review.* Elsevier; 2005 p. 127-52. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387265605110047>
268. Wei G-X, Xu X, Wu CD. In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. *Arch Oral Biol.* junio de 2011;56(6):565-72.
269. Alexander BD, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2017.
270. Elliott WM, Auersperg N. Comparison of the neutral red and methylene blue assays to study cell growth in culture. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm.* enero de 1993;68: 29-35.
271. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3: 1125-31.

Bibliografía

272. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010; 5:51-66.
273. Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowicz AM, García AJ. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci.* 1 de febrero de 2006;119(3):581-91.
274. Hamade E, Azzar G, Radisson J, Buchet R, Roux B. Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro. *Eur J Biochem.* 2003;270: 2082-90.
275. Xiao G, Cui Y, Ducy P, Karsenty G, Franceschi RT. Ascorbic Acid-Dependent Activation of the Osteocalcin Promoter in MC3T3-E1 Preosteoblasts: Requirement for Collagen Matrix Synthesis and the Presence of an Intact OSE2 Sequence. *Mol Endocrinol.* 1997;11: 1103-13.
276. Romagnoli C, Marcucci G, Favilli F, Zonefrati R, Mavilia C, Galli G, et al. Role of GSH/GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like SaOS-2 cells. *FEBS J.* febrero de 2013; 280:867-79.
277. Kotobuki N, Matsushima A, Kato Y, Kubo Y, Hirose M, Ohgushi H. Small interfering RNA of alkaline phosphatase inhibits matrix mineralization. *Cell Tissue Res.* mayo de 2008;332(2):279-88.
278. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res.* 1987;47: 4961-6.
279. Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, et al. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells Dev.* 2011; 20:2093-102.
280. Du L, Yang P, Ge S. Isolation and characterization of human gingiva-derived mesenchymal stem cells using limiting dilution method. *J Dent Sci.* 1 de septiembre de 2016;11(3):304-14.
281. Brizuela C, SaintJean N, Garchitorena N, Rodriguez I, Inostroza C. MatrigelBD, A Biocompatible Scaffold that Improves Gingival Mesenchymal Stem Cells Proliferation. *Int J Morphol.* 2016; 34:692-8.
282. Li J, Xu S-Q, Zhao Y-M, Yu S, Ge L-H, Xu B-H. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. *Mol Med Rep.* 2018; 18:4969-77.
283. Yang Y, Rossi FMV, Putnins EE. Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials.* 2010; 31: 8574-82.
284. Balci Yuce H, Karatas O, Aydemir Turkal H, Pirim Gorgun E, Ocakli S, Benli I, et al. The Effect of Melatonin on Bone Loss, Diabetic Control, and Apoptosis in Rats With Diabetes With Ligature-Induced Periodontitis. *J Periodontol.* 2016;87(4): 35-43.
285. Liu A-Q, Hu C-H, Jin F, Zhang L-S, Xuan K. Contributions of Bioactive Molecules in Stem Cell-Based Periodontal Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5979460/>
286. Lehr HA, Krombach F, Münzing S, Bodlaj R, Glaubitt SI, Seiffge D, et al. In vitro effects of oxidized low density lipoprotein on CD11b/CD18 and L-selectin presentation on neutrophils and monocytes with relevance for the in vivo situation. *Am J Pathol.* 1995;146 :218-27.
287. Scaccini C, Jialal I. LDL modification by activated polymorphonuclear leukocytes: a cellular model of mild oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1994;16(1):49-55.
288. van Tits LJ, Hak-Lemmers HL, Demacker PN, Stalenhoef AF, Willems PH. Oxidized low-density lipoprotein induces calcium influx in polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Biol Med.* 2000;29: 747-55.

Bibliografía

289. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun*. 1994; 62:2195-201.
290. Khwaja A, Carver JE, Linch DC. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood*. 1992;79(3):745-53.
291. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. mayo de 1997; 24:287-96.
292. Haddad JJ, Harb HL. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol Immunol*. 2005;42: 987-1014.
293. Bazayar H, Gholinezhad H, Moradi L, Salehi P, Abadi F, Ravanbakhsh M, et al. The effects of melatonin supplementation in adjunct with non-surgical periodontal therapy on periodontal status, serum melatonin and inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Inflammopharmacology*. 2018;
294. Luhinich N, Gerush I. Effects of 7 day melatonin introduction on the hydrogen sulfide production and glutathione system in the liver of alloxan induced diabetic rats. *Georgian Med News*. 2019; 135-9.
295. Carpentieri A, Marchionatti A, Areco V, Perez A, Centeno V, Tolosa de Talamoni N. Antioxidant and antiapoptotic properties of melatonin restore intestinal calcium absorption altered by menadione. *Mol Cell Biochem*. febrero de 2014;387(1-2):197-205.
296. Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. octubre de 2012;1823(10):1767-77.
297. Rothman SM. The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1985;5(6):1483-9.
298. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol*. 1986;19:105-11.
299. Hazzaa SM, Abdelaziz SAM, Abd Eldaim MA, Abdel-Daim MM, Elgarawany GE. Neuroprotective Potential of *Allium sativum* against Monosodium Glutamate-Induced Excitotoxicity: Impact on Short-Term Memory, Gliosis, and Oxidative Stress. *Nutrients*. 2020;12:1028.
300. Maya S, Prakash T, Madhu K. Assessment of neuroprotective effects of Gallic acid against glutamate-induced neurotoxicity in primary rat cortex neuronal culture. *Neurochem Int*. diciembre de 2018; 121:50-8.
301. Ongaro A, Pellati A, Mattei MD, Terlizzi FD, Rossi C, Campana L. Enhancement of melphalan activity by buthionine sulfoximine and electroporation in melanoma cells. *Anticancer Drugs*. 2015; 26:284-92.
302. Lewis-Wambi JS, Kim HR, Wambi C, Patel R, Pyle JR, Klein-Szanto AJ, et al. Buthionine sulfoximine sensitizes antihormone-resistant human breast cancer cells to estrogen-induced apoptosis. *Breast Cancer Res BCR*. 2008;10: 104.
303. Domazetovic V, Marcucci G, Falsetti I, Bilia AR, Vincenzini MT, Brandi ML, et al. Blueberry Juice Antioxidants Protect Osteogenic Activity against Oxidative Stress and Improve Long-Term Activation of the Mineralization Process in Human Osteoblast-Like SaOS-2 Cells: Involvement of SIRT1. *Antioxid Basel Switz*. 1 de febrero de 2020;9(2).

Bibliografía

304. Yu J-H, Lee S-P, Kim T-I, Jang J-H. Identification of N-methyl-D-aspartate receptor subunit in human periodontal ligament fibroblasts: potential role in regulating differentiation. *J Periodontol.* febrero de 2009;80(2):338-46.
305. Allen EM, Matthews JB, O' Halloran DJ, Griffiths HR, Chapple IL. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* octubre de 2011;38(10):894-901.
306. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):131-49.
307. Proksch S, Strobel SL, Vach K, Abouassi T, Tomakidi P, Ratka-Krüger P, et al. Melatonin as a candidate therapeutic drug for protecting bone cells from chlorhexidine-induced damage. *J Periodontol.* 2014;85: 379-389.
308. Soskolne WA, Chajek T, Flashner M, Landau I, Stabholtz A, Kolatch B, et al. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. *J Clin Periodontol.* 1998;25(12):1017-21.
309. Kaur G, Dufour JM. Cell lines. *Spermatogenesis.* 2012; 2:1-5.
310. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Liu XY, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan D-X. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *J Periodontal Res.* febrero de 2015;50(1):9-17.
311. Tavelli L, McGuire MK, Zucchelli G, Rasperini G, Feinberg SE, Wang H-L, et al. Biologics-based regenerative technologies for periodontal soft tissue engineering. *J Periodontol.* 2019;
312. Balaji TM, Vasanthi HR, Rao SR. Gingival, Plasma and Salivary Levels of Melatonin in Periodontally Healthy Individuals and Chronic Periodontitis Patients: A Pilot Study. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2015;9: 23-5.
313. Groeger SE, Meyle J. Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol 2000.* 2015; 69:46-67.
314. Ge S, Mrozik KM, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. *Regen Med.*2012; 7:819-32.
315. Tinto M, Sartori M, Pizzi I, Verga A, Longoni S. Melatonin as host modulating agent supporting nonsurgical periodontal therapy in patients affected by untreated severe periodontitis: A preliminary randomized, triple-blind, placebo-controlled study. *J Periodontal Res.* 2020; 55:61-7.
316. Chitsazi M, Faramarzie M, Sadighi M, Shirmohammadi A, Hashemzadeh A. Effects of adjective use of melatonin and vitamin C in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2017; 11:236-40.
317. Higgs J, Derbyshire E, Styles K. Nutrition and osteoporosis prevention for the orthopaedic surgeon. *EFORT Open Rev.* 2017; 2:300-8.
318. Hubert PA, Lee SG, Lee S-K, Chun OK. Dietary Polyphenols, Berries, and Age-Related Bone Loss: A Review Based on Human, Animal, and Cell Studies. *Antioxid Basel Switz.* 2014;3:144-58.
319. PhD CMW, PhD DLA, PhD WEW, PhD MJR. Flavonoid Intake and Bone Health. *J Nutr Gerontol Geriatr.* 2012; 31:239-53.
320. Chen J-R, Lazarenko OP, Wu X, Kang J, Blackburn ML, Shankar K, et al. Dietary-induced serum phenolic acids promote bone growth via p38 MAPK/ β -catenin canonical Wnt signaling. *J Bone Miner Res.* 2010; 25:2399-411.

Bibliografía

321. Blais A, Rochefort GY, Moreau M, Calvez J, Wu X, Matsumoto H, et al. Monosodium Glutamate Supplementation Improves Bone Status in Mice Under Moderate Protein Restriction. *JBMR Plus*. 2019;3: 10224.
322. Mason DJ. Glutamate signalling and its potential application to tissue engineering of bone. *Eur Cell Mater*. 7 de abril de 2004; 7:12-25; discussion 25-26.
323. Kanaya S, Komatsu H, Shimauchi H, Nemoto E. Metabotropic glutamate receptor 1 promotes cementoblast proliferation via MAP kinase signaling pathways. *Connect Tissue Res*. 2016;57(5):417-26.
324. Li J, Zhao L, Cui B, Deng L, Ning G, Liu J. Multiple signaling pathways involved in stimulation of osteoblast differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors activation in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32:895-903.
325. Olkku A, Mahonen A. Wnt and steroid pathways control glutamate signalling by regulating glutamine synthetase activity in osteoblastic cells. *Bone*. 2008; 43:483-93.
326. Xie W, Dolder S, Siegrist M, Wetterwald A, Hofstetter W. Glutamate Receptor Agonists and Glutamate Transporter Antagonists Regulate Differentiation of Osteoblast Lineage Cells. *Calcif Tissue Int*. 2016;99(2):142-54.
327. Samuel Agidigbi T, Kang IS, Kim C. Inhibition of MEK/ERK upregulates GSH production and increases RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells. *Free Radic Res*. 2020;1-251.
328. Renn T-Y, Huang Y-K, Feng S-W, Wang H-W, Lee W-F, Lin C-T, et al. Prophylactic supplement with melatonin successfully suppresses the pathogenesis of periodontitis through normalizing RANKL/OPG ratio and depressing the TLR4/MyD88 signaling pathway. *J Pineal Res*. 2018; 64(3).
329. Commissioner O of the. FDA Warns About Stem Cell Therapies. FDA 2019 <http://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/fda-warns-about-stem-cell-therapies>

Anexo I: Producción científica y docente originada de esta tesis

Publicaciones en revistas con referato

-Melatonin is an effective protector of gingival cells damaged by the cytotoxic effect of glutamate and DL-buthionine sulfoximine. **Solá VM**, Aguilar JJ, Vazquez Mosquera AP, Carpentieri AR. 2020;00:1–8. *Journal of Periodontal Research*. DOI:10.1111/jre.12806.

-Melatonin and Periodontal tissues: molecular and clinical perspectives. Carpentieri AR, Peralta Lopez ME, Aguilar JJ, **Solá VM**. *Pharmacological Research*. 2017; 125:224-231.Ed: Elsevier. Devon. UK. ISSN: 1043-6618.

-Melatonin promotes osteogenic differentiation in GMSCs. **Solá VM**, Aguilar JJ, Farías A, Carpentieri AR- En preparación.

Participación de reuniones científicas

-Presentación oral. Obtención y caracterización de células mesenquimales de encía de rata. **Solá VM**, Aguilar JJ, Farías A, Vazquez Mosquera AP, Carpentieri AR. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Noviembre 2019.

-Presentación oral. Melatonina disminuye el daño celular en diferenciación osteogénica *in vitro*. **Solá VM**, Aguilar JJ, Farías A, Carpentieri AR. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Noviembre 2019.

-Presentación oral. Melatonina: Efectos antioxidante y diferenciador en cultivos celulares de encía de rata. **Solá VM**, Aguilar JJ, Fontana S, Carpentieri AR. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Octubre de 2018. Este trabajo obtuvo el premio Colgate investigadores jóvenes.

-Presentación oral. Efecto proliferativo y antiapoptótico de melatonina en cultivos primarios de fibroblastos de encía de rata. **Solá VM**, Aguilar JJ, Carpentieri AR. Sociedad de Endocrinología Córdoba. Diciembre 2016.

-Presentación de póster. Efecto protector de melatonina en cultivos de fibroblastos de encía de rata. **Solá VM**, Aguilar JJ, Carpentieri AR. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Noviembre de 2016.

-Presentación de póster. Efecto de la melatonina sobre los cultivos de fibroblastos derivados de encía de ratas: estudio preliminar. **Solá VM**, Aguilar JJ, Grenon MS, Carpentieri AR. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Noviembre de 2015.

Actividad docente:

-Docente dictante del módulo de “Cultivo primario de tejidos del ambiente bucal” en el curso de cultivo celular del Instituto J.M. Vanella. FCM-UNC.

Aclaración:

La primera imagen de esta tesis fue tomada del grabado ‘La gran ola de Kanagawa’ de Katsukiya Okusai (1833). El haiku corresponde al poeta japonés Shigeyori.

Las ilustraciones fueron realizadas por la autora de esta tesis. Las mismas son solo ilustrativas, las proporciones no respetan la realidad. La reproducción de dichas imágenes debe hacerse bajo permiso de la autora.