



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**CÉLULAS MADRE ADULTAS Y SU APLICACIÓN EN  
REGENERACIÓN TISULAR.**

**T E S I N A**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**CIRUJANA DENTISTA**

**P R E S E N T A:**

**NORMA PATRICIA SOLAIS HERNÁNDEZ**

**TUTORA: C.D. LUZ DEL CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA**

**ASESOR: MTRO. CESAR AUGUSTO ESQUIVEL CHIRINO**

**MÉXICO, D. F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

### **A MI FAMILIA**

*Por creer en mí, por su apoyo incondicional, por las preocupaciones,  
desvelos y malos ratos que le hice pasar.  
Gracias parte de esto es también triunfo suyo.*

### **A MIS AMIGOS Y PROFESORES**

*Gracias por su enseñanza, sus ideas, apoyo y cariño.*

*A las personas que me incentivaron a continuar en éste proyecto de vida  
y que no vivieron para verlo terminado.*

*A los muchos otros que no nombro aquí, pero que no he olvidado y que  
han estado conmigo en los momentos más difíciles anhelando que  
siempre me preparara para enfrentar la vida.*

*A Dios y a ustedes gracias.*



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES HISTÓRICOS</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO I. GENERALIDADES, ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES DE LAS CÉLULAS MADRE.</b>	<b>4</b>
1. Definición de células madre.	5
2. Clasificación de células madre	5
2.1 Clasificación según su potencial de diferenciación.	6
2.1.1. Célula madre totipotente.	6
2.1.2. Célula madre pluripotente.	7
2.1.3. Célula madre multipotente.	8
2.1.4. Célula madre unipotente.	8
2.2. Clasificación según el sitio de obtención.	9
2.2.1. Células madre embrionarias.	9
2.2.2. Células madre adultas	10
2.2.2.1. Células madre hematopoyéticas.	11
2.2.2.2. Células madre mesenquimales.	16
3. Propiedades de las células madre.	17
3.1. Auto renovación.	17
3.1.1. Moléculas asociadas a la autorenovación.	18
3.1.1.1. Genes Wnt.	19
3.1.1.2. Genes Hedgehog.	21
3.1.1.3. Genes Notch.	23
3.1.2. Cascada de señalización Jak-STAT.	25
3.2. Potencial de diferenciación.	31
3.2.1. Moléculas asociadas a la diferenciación.	31
3.2.1.1. Molécula SCI- Tal-1.	31
3.2.1.2. HOX B4.	31

3.3. Reconstitución funcional in vivo.	32
4. Nichos de las células madre adultas.	32
5. Señales externas e internas de las células madre adultas.	33
5.1. Controles intrínsecos.	34
5.2. Controles extrínsecos.	34
6. Marcadores de células madre adultas.	34
6.1. CD34	35
6.2. Técnicas para la señalización de marcadores específicos.	36
6.2.1. Técnica FACS.	36
6.2.2. Técnica PCR.	37
6.2.3. Técnica de fluorescencia no dependiente de marcadores de superficie.	37
<b>CAPÍTULO II. GENERALIDADES DE INGENIERÍA CELULAR</b>	<b>38</b>
1. Ingeniería celular.	39
2. Estrategias básicas.	39
3. Componentes	39
3.1. Biomateriales y sustratos	40
3.1.1. Biogénicos.	42
3.1.2. Sintéticos.	43
3.2. Muestra de células para cultivo in Vitro o in vivo.	45
3.3. Agentes farmacológicos.	46
3.3.1. Citoquinas.	46
3.4. Vasculogénesis	48
<b>CAPÍTULO III. APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EN REGENERACIÓN TISULAR</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO IV. APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EN ODONTOLOGÍA.</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>

## INTRODUCCIÓN

La Medicina y la Odontología clínica están entrando en una nueva era en la cual la ingeniería celular aplica los principios básicos de las ciencias de la vida para la obtención de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular, dando así una nueva alternativa terapéutica.

Se han identificado células de enorme biodisponibilidad obtenidas de estructuras del ser humano adulto que poseen el potencial para formar células de varias líneas celulares.

La ingeniería celular ha utilizado a las células madre en procesos de reparación tisular, ya sea con la formación de nuevos tejidos o bien como agentes de cicatrización.

Con ésta tecnología es posible crear estructuras tridimensionales capaces de presentar características similares a las del tejido en donde han sido o serán implantadas.

La terapia celular pretende crear tejidos con la identidad histológica del propio paciente para eliminar problemas de escasez de donantes histocompatibles, así como la necesidad de administrar drogas inmunosupresoras para evitar el rechazo de un injerto.

Hasta el momento la mayoría de las aplicaciones clínicas de la ingeniería celular ha sido en animales experimentales con buenos resultados, pero las autoridades

médicas señalan que las células madre adultas, con el uso de la tecnología pueden ser un día una prometedora alternativa en el tratamiento de múltiples enfermedades.

## ANTECEDENTES HISTORICOS

El término de ingeniería tisular fue adjudicado en la primavera de 1987 durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias, en donde se estableció como disciplina en la que se unió la biología celular, la bioquímica y la ingeniería. (5)

Su aplicación se remonta a la antigua Grecia, en donde en la mitología una hidra de múltiples cabezas casi derrota a Heracles pues le crecían dos nuevas cabezas por cada una que el héroe le cortara; Prometeo tenía la habilidad de regenerar el hígado, pues un águila hambrienta se lo devoraba cada noche y en la mañana aparecía regenerado.

Aristóteles, observaba como se regeneraban las colas de lagartos y serpientes, así como los ojos de las golondrinas. En el siglo XVII científicos como Trembley, Charles Bonnet, Meter Simon Pallas descubrieron habilidades de regeneración de una variedad de organismos como las hidras, los gusanos de tierra, los caracoles, las ranas premetamórficas, lagartijas y salamandras.

En 1712 Rene Antoine Ferchault de Reaumur publico un trabajo en regeneración de extremidades y patas de un cangrejo.

En el transcurso del siglo XIX y parte del siglo XX la investigación de regeneración tisular se enfoca primordialmente en la regeneración y sus fundamentos celulares. Se llegó a la conclusión de que las células progenitoras son activadas como respuesta a daño tisular. A principios del siglo XX se observo el potencial de diferenciación de células creadas a partir de un óvulo fecundado.

En 1952 inicio el uso de la prótesis vascular por el doctor Voorhees, quien introdujo el uso de el vinyon N material que le permitió reparar 17 aneurismas de aorta.



En el año de 1975 el equipo del doctor Rheinwald a partir de los trabajos ya establecidos de diferenciación celular, creó una línea epitelial o queratinocitos a partir de un teratoma de ratón, estableciendo las condiciones necesarias y fundamentales para cultivar, de forma indefinida éste tipo de células. La primera aplicación clínica de los queratinocitos aislados fue en el año 1980 por el doctor Banks-Schelegel, demostrando la viabilidad del epitelio obtenido in vitro en animales de experimentación.

En 1977 Green reportó experimentos en los que cultivó condrocitos sobre una matriz ósea estéril y, luego de ser implantados en ratones se observó formación de tejido cartilaginoso; éste tejido después de 48 horas mostró proliferación de condrocitos y a las 8 semanas el defecto estaba completamente reparado.

En 1978, la utilización de células endoteliales sobre injertos de Dacron y Teflón, demostró en animales una disminución de la adhesividad plaquetaria y aumento de la resistencia a la colonización bacteriana.

En 1998 fue aislada la primera célula madre humana y a finales del mismo año James Thomson publicó un trabajo en donde se habla de la generación de varias líneas celulares estables a partir de células madre embrionarias.

En el año 2001 se realizaron estudios de diferenciación y proliferación celular y en el año 2003 se realizaron cambios en la ley creada por el centro nacional de trasplantes y medicina regenerativa, para controlar la investigación de las células madre obtenidas de embriones.

## **CAPÍTULO I.**

### **GENERALIDADES, ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES DE LAS CÉLULAS MADRE.**

## **1. Definición de células madre.**

Llamamos célula madre o célula troncal, a un tipo especial de célula indiferenciada que tiene la capacidad de generar uno o más tipos celulares diferenciados, sin perder sus propiedades. Una célula madre es capaz de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por tanto, producir uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad. <sup>(4,8,14,17)</sup>

La mayoría de tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular. Algunas células madre son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular, otras se cree que son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como las células madre de la piel o las células madre germinales y también hay otras que habitualmente no se dividen, pero en condiciones particulares pueden proliferar y regenerar un tejido pues artificialmente tienen la capacidad de reproducirse y generar otros tejidos.<sup>(14)</sup>

## **2. Clasificación de células madre**

Para la formación de un nuevo individuo todo comienza en la línea germinal; que es una línea celular de la que surgen los gametos, los gametos son las células masculinas y femeninas que se unen durante la fecundación para iniciar el desarrollo embrionario.<sup>(1)</sup>

La línea celular se origina en el ectodermo primitivo y se hace evidente en la cuarta semana del desarrollo embrionario en forma de células germinales primordiales que se diferencian en la pared del saco vitelino. Luego emigran

activamente hacia la pared posterior del embrión hasta poblar las gónadas en desarrollo y diferenciarse en las células precursoras de los gametos. <sup>(1)</sup>

Cuando comienza la unión de un gameto masculino con otro femenino para dar lugar a una única célula, llamada cigoto, y ésta a su vez continua dividiéndose, se dice que es posible saber el potencial de diferenciación de las células hijas obtenidas de cada división.<sup>(1,8)</sup>

## **2.1 Clasificación según su potencial de diferenciación.**

### **2.1.1. Célula madre totipotente.**

Del latín totus; que significa completo, hace referencia al potencial que tienen estas células de generar un embrión completo. Tras el proceso de fecundación, un óvulo es fertilizado por un espermatozoide y el producto de esto recibe el nombre de cigoto, éste es capaz de dar origen a los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, la línea germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como los extraembrionarios (como la placenta).

Durante las primeras divisiones el cigoto va formando una esfera compacta llamada mórula, en la que todas las células son totipotentes, hasta este momento es posible generar un individuo con todos sus tejidos. Ésta célula genera al mismo tiempo el ectodermo, mesodermo y endodermo; así como la línea germinal, que es una línea celular que se origina en el ectodermo primitivo, en éste se forman las células germinales primordiales que se diferencian en la pared del saco vitelino para posteriormente emigrar activamente hacia la pared posterior del embrión hasta poblar las gónadas en desarrollo y diferenciarse en las células precursoras de los gametos denominados espermatogonias que derivan en espermatozoides para el hombre y oogonias que derivan en óvulo para la mujer <sup>(1,4,9,14,17)</sup>

### 2.1.2. Célula madre pluripotente.

Del latín plures que significa muchos o varios; es decir, que puede dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales. A partir del cuarto día del desarrollo embrionario, la célula original se divide en varias células y se forma el blastocito. El blastocito está formado por dos tipos de células y una gran cavidad interior. Su capa externa forma la placenta y las envolturas embrionarias y recibe el nombre de trofoblasto, su capa interna está compuesta por una masa celular que dará origen a los tejidos del cuerpo humano y se denomina embrioblasto. Una célula pluripotente no puede formar un organismo completo, pero puede formar cualquier célula proveniente de los tres linajes embrionarios por su gran potencial de diferenciación y su pluripotencia le permite cultivarse tanto in vivo, que es incorporar células madre directo en la zona a regenerar, como in vitro, en los cultivos de laboratorio.<sup>(1,9,14,17)</sup>

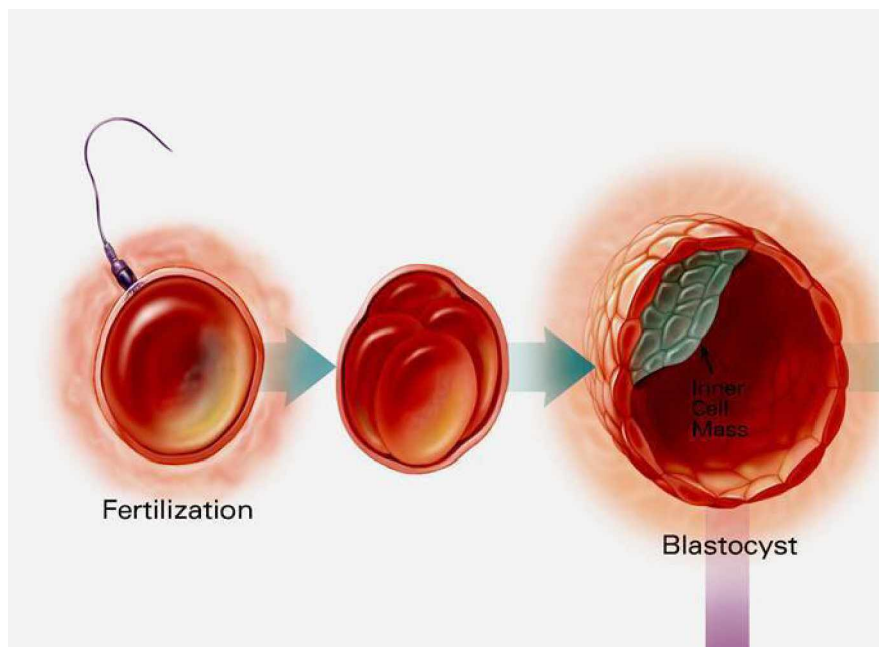


Fig. 1 Blastocito <sup>16</sup>

### **2.1.3. Célula madre multipotente.**

Es aquella que solo pueden generar células de su propia capa o linaje embrionario de origen (por ejemplo: una célula madre mesenquimal de médula ósea, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de esa capa como miocitos, adipocitos u osteocitos, entre otras). Se consideran órgano-específicas y se localizan en tejidos embrionarios y fetales además en tejidos completamente formados de los organismos adultos.<sup>(14,17)</sup>

### **2.1.4. Célula madre unipotente.**

Del latín unus, que significa uno. Es una célula que puede formar otras células hijas que se diferencian a lo largo de una única línea celular.<sup>(9,17)</sup>

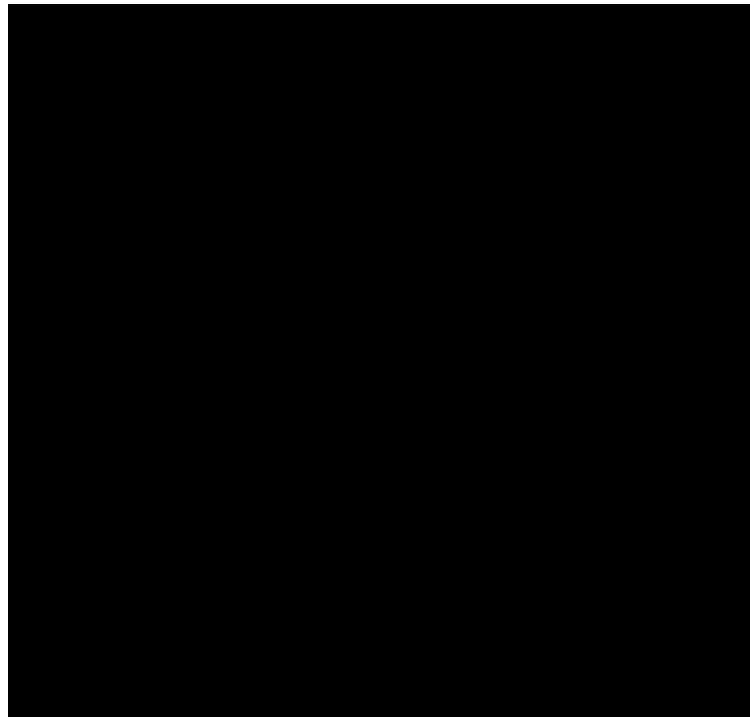


Fig. 2 División celular<sup>14</sup>

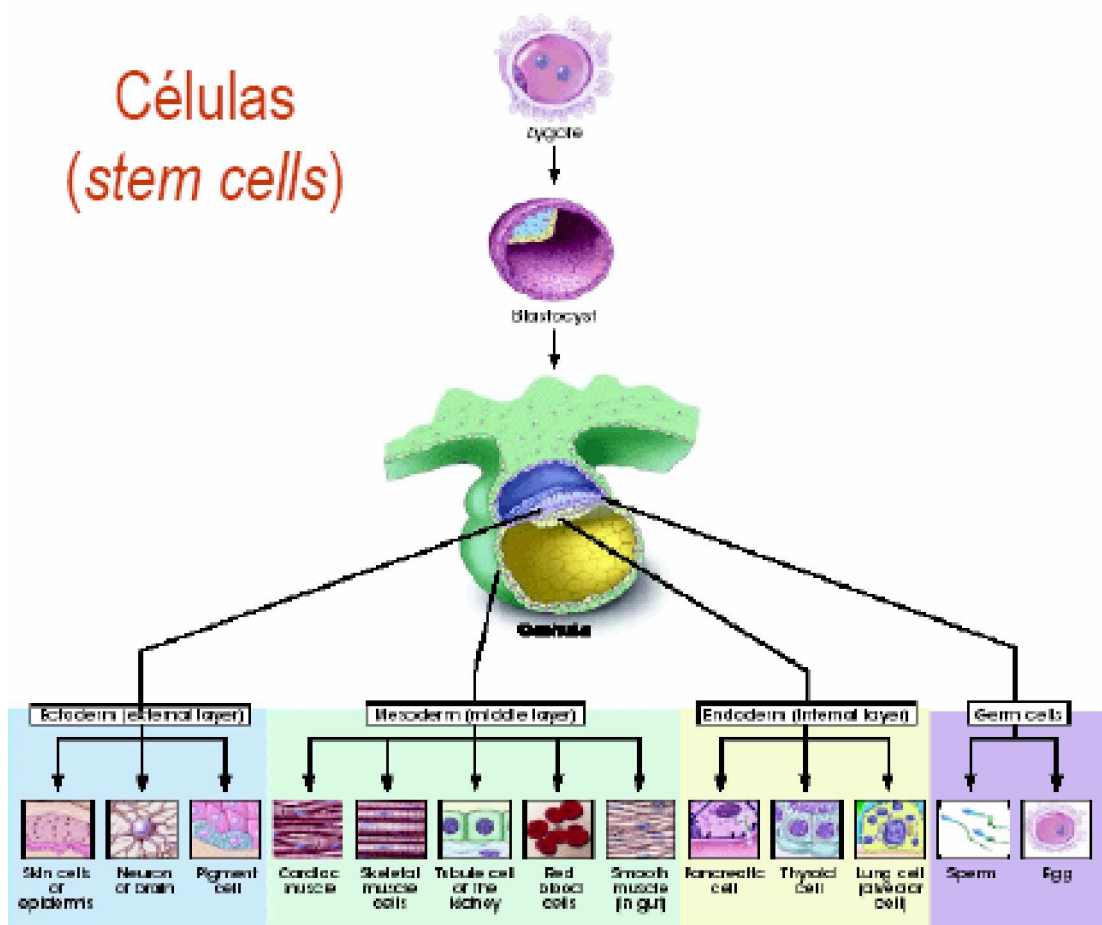


Fig. 3 División celular. Potencial de diferenciación de una célula pluripotente <sup>7</sup>

## 2.2. Clasificación según el sitio de obtención.

En los animales superiores, las células madre están divididas en dos grupos, las células madre embrionarias y las células madre adultas.

### 2.2.1. Células madre embrionarias.

Originadas de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocito estructura a partir del cual se originarán las tres capas que darán origen a

todos los tejidos del cuerpo humano. Son células pluripotentes y pueden generar todas las células del feto y a la parte embrionaria de la placenta. Tienen múltiples aplicaciones en la obtención de nuevos medicamentos y en terapia celular para regeneración tisular. <sup>(4,9,14,17)</sup>

Sirven de fuente para las obtener células germinales (espermatozoide y óvulo), son aisladas directamente de la cresta germinal, donde se está produciendo la diferenciación de la línea germinal, para después ser utilizadas en cultivos para lograr fertilidad. <sup>(4)</sup>

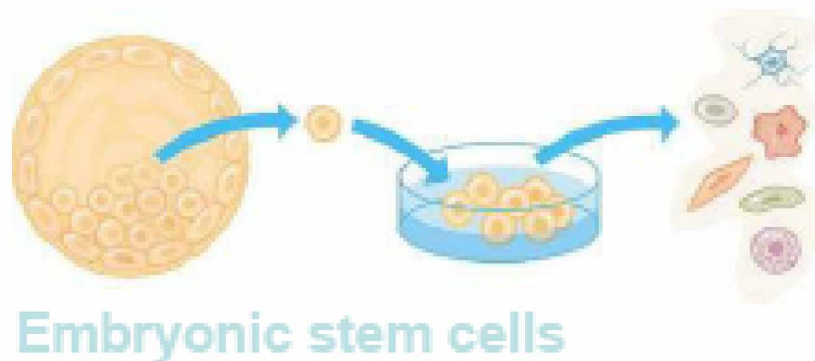


Fig. 4 Potencial de diferenciación de células madre embrionales<sup>7</sup>

### 2.2.2. Célula madre adulta.

En un individuo adulto se conocen hasta ahora alrededor de 20 tipos distintos de células madre, son células indiferenciadas que pueden estar presentes en tejidos diferenciados con propiedades de auto renovación en tejidos en continuo desgaste (como piel y sangre), o dañados (como el hígado). Las células madre adultas tienen un gran potencial de diferenciación y quizá más facilidades que las células embrionarias puesto que su obtención es del



mismo individuo adulto con la misma carga genética y sin someterse a los problemas éticos de manipular y destruir embriones<sup>(9,14,17)</sup>

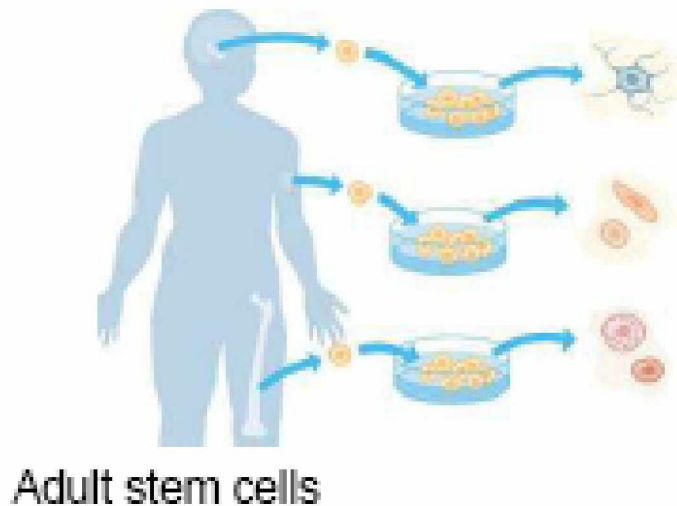


Fig. 5 Sitios de obtención de las células madre adultas <sup>7</sup>

Los principales sitios de obtención son la médula ósea, sangre periférica, grasa corporal, cerebro; entre otras. Dentro de éstas células adultas encontramos las células madre hematopoyéticas y las células madre de origen mesenquimatoso.

#### **2.2.2.1. Células madre hematopoyéticas.**

El sistema hematopoyético tiene como función retirar de la circulación las células viejas o las defectuosas, eliminarlas y reemplazarlas por nuevas. Éste sistema está constituido por un conjunto de células de la médula ósea, de la sangre periférica y del sistema linfóide que dan origen a todos los tipos de células sanguíneas a partir de una célula madre hematopoyética (CMH).

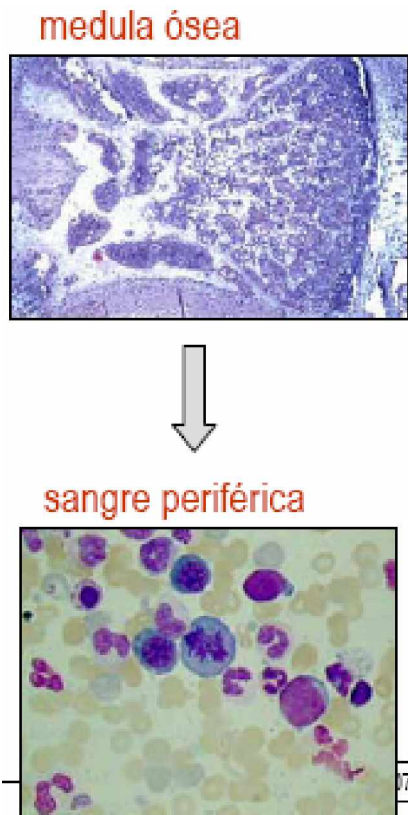


Fig. 6 Sitios de obtención de células madre hematopoyéticas <sup>7</sup>

Son células que además pueden diferenciarse a células con características de músculo esquelético, músculo cardíaco, endotelio, neuroectodermo, epitelio y células endodérmicas, como: hepatocitos, epitelio gastrointestinal, y epitelio pulmonar; pero en porcentaje más bajo. <sup>(9)</sup>

Las células madre hematopoyéticas poseen tres características básicas.

Primero, son multipotentes, tienen el potencial de generar los linajes sanguíneos:

- 1) Línea roja; que produce los eritrocitos.
- 2) Línea blanca; que produce células de diferentes tipos como el de tipo linfoide: linfocitos B y T.

- 3) Línea mieloide; que da origen a basófilos o mastocitos, eosinófilos, neutrófilos o granulocitos y monocitos o macrófagos.
- 4) Línea trombocítica; que da origen a megacariocitos o plaquetas.

## Hematopoyéticas (HSCs)

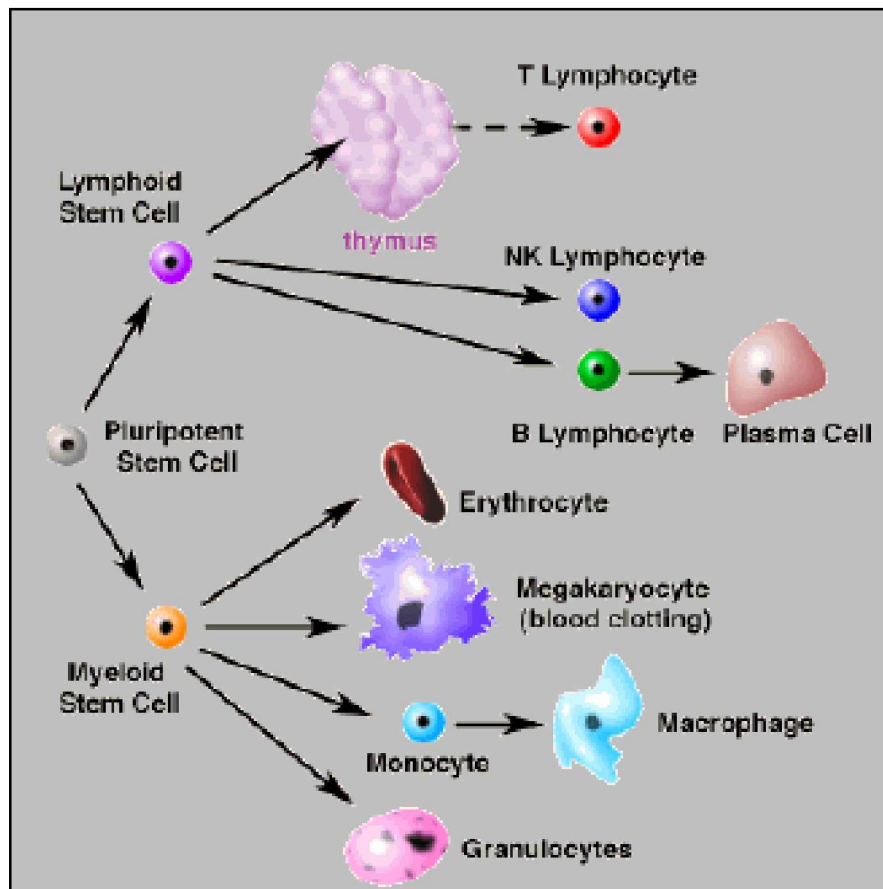


Fig. 7 Potencial de diferenciación de una célula madre hematopoyética <sup>7</sup>

Segundo, las células madre hematopoyéticas tienen un alto potencial proliferativo, es decir que son capaces de dividirse y producir un gran número de células maduras durante la vida del individuo.

Tercero, tienen alta capacidad de generación de nuevas células madre idénticas, manteniendo una división de tipo simétrico, capacidad conocida como auto-renovación.

Para distinguir el potencial de auto-renovación de las células madre hematopoyéticas se clasifican en:

1) Células madre hematopoyéticas a largo plazo (CMH-LP), son capaces de producir todos los tipos de células maduras de la sangre durante la vida de un individuo y de generar progenitores que al ser transplantados pueden reconstituir el sistema hematopoyético, éstas constituyen menos del 0.1% de las CMHs contenidas en la médula ósea.

2) Células madre hematopoyéticas a corto plazo (CMH-CP), son las encargadas de generar células progenitoras comprometidas con linaje bien sea linfóide o mieloide.

Las CMH-LP tienen un compromiso progresivo en la generación de CMH-CP, y de éstas a su vez en la generación de progenitores multipotentes (PMP), pasando por varios estadios de diferenciación que implican cambios funcionales irreversibles y que caracterizan el proceso de maduración celular, a medida que las CMHs maduran progresivamente van perdiendo su potencial de auto-renovación pero se vuelven mitóticamente más activas.

### **Nicho o depósito de las células madre hematopoyéticas.**

La médula ósea es un tejido graso y suave que yace al interior del hueso trabecular, y son en conjunto la trabécula y el estroma de la médula ósea los elementos que físicamente soportan y fisiológicamente mantienen el tejido hematopoyético. Durante los dos primeros años de la vida, la médula ósea activa es conocida como médula roja y se localiza en todos los huesos y

gradualmente es reemplazada por tejido medular inactivo conocida como médula amarilla o grasa.

La médula ósea roja supone del 4 al 6 % del peso corporal, es un tejido blando densamente celular, formado por los precursores de las células sanguíneas, macrófagos, células adiposas, células reticulares y fibras reticulares. Cuando las células de la sangre alcanzan su desarrollo en la médula ósea, pasan a la circulación general a través de las paredes de los senos vasculares.

La médula ósea contiene células de la estroma cuyo origen puede ser mesenquimal, como es el caso de las células endoteliales, los fibroblastos, los adipocitos y los osteoblastos o puede ser hematopoyético no-mesenquimal como los macrófagos y las células dendríticas.

Todas éstas células del estroma producen y depositan elementos en la matriz extracelular (MEC), además son capaces de producir y concentrar citoquinas locales hematopoyéticas que pueden inducir o inhibir la proliferación y diferenciación de células progenitoras, formando así el nicho de la célula madre progenitora. Se cree que la diferenciación hacia un linaje específico puede depender de interacciones especializadas entre células del estroma y células progenitoras.

Los procesos de auto-renovación y diferenciación de las CMHs son controlados por un conjunto de mecanismos reguladores extrínsecos e intrínsecos en los nichos hematopoyéticos, que se pueden establecer a través de interacciones entre las células.

El nicho hematopoyético está dividido en tres partes:

- 1) Una zona osteoblástica localizada cerca de los osteoblastos y está conformado por osteoblastos cuya función principal es ser formadores de hueso induciendo la diferenciación de las CMHs en osteocitos, en éste nicho se ha identificado diversas moléculas de adhesión celular que favorecen la interacción de los osteoblastos con las CMHs, entre

las que se encuentra la N- catenina que se expresa tanto en osteoblastos como en las CMHs quiescentes, y la B-1 integrina que se une a la fibronectina y promueve la adhesión a las células estromales de la médula ósea.

- 2) Una zona medular de CMHs quiescentes y proliferantes, zona en donde las células progenitoras producen factores que inhiben la proliferación de las células madre adyacentes, pero cuando el número de estas células progenitoras disminuye dentro del nicho las CMHs quiescentes son liberadas de su inhibición y comienzan a dividirse.
- 3) Una zona vascular, lugar en donde una vez que las CMHs quiescentes reciben estímulos y señales que inducen su proliferación, maduración y diferenciación son liberadas a la circulación. En este nicho además de suplir el oxígeno a las CMHs en división, produce factores angiogénicos indispensables para el mantenimiento celular, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).<sup>(9,20)</sup>

#### **2.2.2.2. Células madre mesenquimales.**

La médula ósea contiene células madre hematopoyéticas y también células madre mesenquimales, que pueden cultivarse in vitro pues son bastante móviles en su crecimiento por lo cual varias células individuales podrían contribuir a formar la colonia aislada en un anillo determinado e incluso diferenciarse en células de tipo mesodérmico como: osteoblastos, condroblastos, adipocitos, fibroblastos y mioblastos esqueléticos; neuroectodermo y endodermo. Son células que pueden diferenciarse también in vivo en el mismo tipo de células de las que derivan. Las células madre mesenquimales (MSCs) humanas, se han aislado principalmente del estroma de la médula ósea, tejido adiposo, sangre, gelatina de Wharthon de cordón umbilical humano, dermis y piel. Las células madre mesenquimales presentan un gran potencial de generar

cartílago, hueso, músculo, tendón, ligamento y tejido adiposo entre otros; además poseen características electro fisiológicas de neuronas. <sup>(9)</sup>

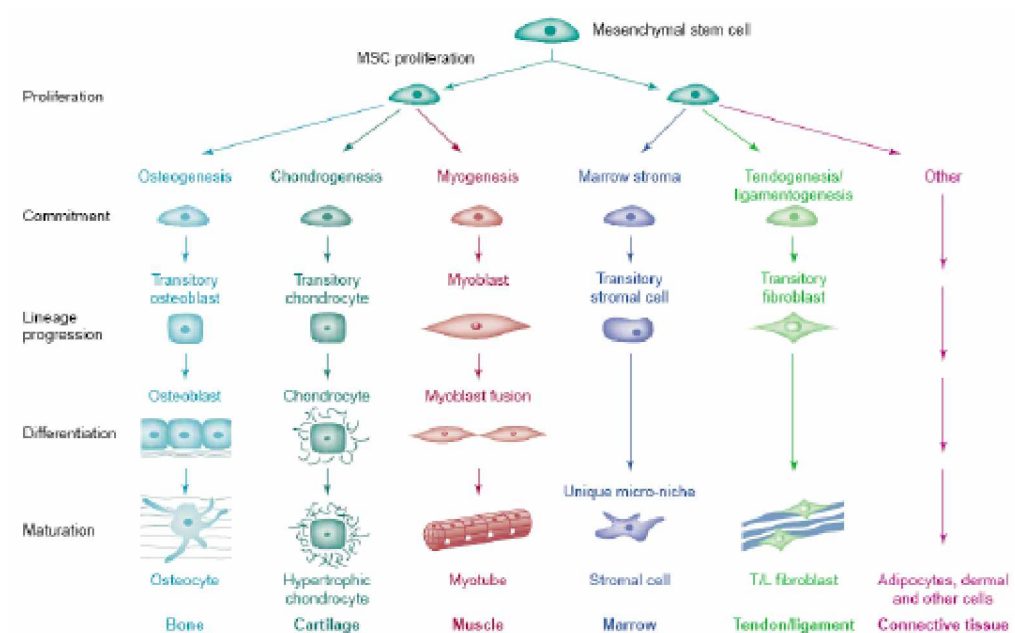


Fig. 8 Potencial de diferenciación de una célula madre mesenquimal <sup>7</sup>

### 3. Propiedades de las células madre.

Los principales parámetros o propiedades que permiten clasificar las células madre, están sujetos a una amplia variación y dependen en cierto grado de la presencia de células in situ o de circunstancias experimentales, es decir in vitro .

#### 3.1. Auto renovación.

Definida como la capacidad de generar al menos una célula hija con características similares a la célula de origen. <sup>(9)</sup>

### **3.1.1 Moléculas asociadas a la auto renovación.**

Las vías de señalización corresponden a sistemas de comunicación constituidos por una serie de proteínas que actúan en respuesta a estímulos extracelulares o intracelulares y cuya activación o inhibición puede ser de manera sucesiva (cascada). El estímulo puede ser de naturaleza química o física; cuando es química recibe el nombre de ligando que decodifica el mensaje para ser captado por receptores moleculares con tres regiones: una extracelular, transmembranal y otra intracelular. Las líneas de comunicación son establecidas por interacciones paracrinas, en las cuales las proteínas sintetizadas por una célula se difunden por cortas distancias para interactuar con otras células, o por interacciones yuxtacrinas, que no involucran proteínas difusibles. Las proteínas difusibles encargadas de la señalización paracrina se denominan factores paracrinicos o factores de crecimiento y diferenciación (GDF). En general estos factores paracrinicos se agrupan en cuatro familias cuya función es regular el desarrollo de los órganos en el reino animal desde la *Drosophila* hasta el ser humano. Los cuatro grupos de GDF incluyen a las familias del factor de crecimiento fibroblástico, Wnt, Hedgehog y factor de crecimiento transformador beta.

Los factores paracrinicos actúan por medio de vías de transducción de la señal compuesto por una molécula de señalización (ligando) y un receptor. El receptor atraviesa la membrana celular y tiene un dominio extracelular ( región de unión al ligando), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático.

Cuando el ligando se une al receptor, induce un cambio en el receptor y éste a su vez activa el dominio citoplasmático y como resultado de ésta activación se da una actividad enzimática al receptor, y más a menudo se otorga una actividad cinasa que puede fosforilar y activar a las proteínas para fosforilar otras proteínas y formar una cascada de señalización que



activa un factor de transcripción que como resultado final activa o inhibe la expresión génica; y ésta vía es conocida como señalización paracrina y un ejemplo de ésta son las vías Wnt y Hedgehog.

La señalización yuxtacrina también es mediada por una vía de transducción de señal pero no involucra a factores difusibles, en su lugar utiliza proteínas de superficie celular que interactúa con un receptor sobre una células adyacente en un proceso análogo a la señalización paracrina, ejemplo de esto es la vía de Notch.

### **3.1.1.1. Genes Wingless (Wnt).**

Hay al menos 15 proteínas Wnt diferentes que están involucradas en las vías de desarrollo. Contienen aminoácidos como la cisteína que contiene palmitato que les confiere propiedades hidrofóbicas y generalmente están glicosiladas en su extremo amino-terminal. Las proteínas Wnt intervienen en la regulación del establecimiento del patrón de la extremidad, el desarrollo del mesencéfalo y en algunos aspectos de la diferenciación de los somitas y urogenital, entre otras acciones. <sup>(1)</sup>

Las proteínas Wnt forman la vía Wnt que ha sido de gran importancia en el estudio del desarrollo animal, y hasta hace algunos años se ha utilizado en el campo de la inmunología, debido a que varios estudios indican que la proliferación y diferenciación de la mayoría de las células progenitoras está regulada in vitro por moléculas de señalización que tienen un papel durante el desarrollo embrionario. Se han propuesto tres vías de señalización intracelular para las proteínas Wnt, pero para el sistema hematopoyético la más importante es la vía canónica de la B-catenina y el factor de transcripción terciario TCF/LEF, en donde el punto final es la translocación nuclear de la B- catenina y su unión física y activación de los factores de transcripción.

Las proteínas Wnt son secretadas al medio extracelular y actúan como ligandos uniéndose a receptores de la membrana celular para determinar el destino celular y otros parámetros de diferenciación.

Sus receptores son miembros de proteínas frizzled. Éstas están relacionadas con las proteínas FRPs; que son proteínas estructuralmente relacionadas con el dominio rico en cisteína de las Fizzleds y actúan como antagonistas de Wnt pues al unirse a ellas bloquean su acción. La vía Wnt juega un papel importante en la regulación de la auto renovación de las células madre hematopoyéticas y en la activación o inactivación de programas genéticos de determinación celular. Mutaciones de los genes Wnt o su expresión inapropiada conducen a cambios de linaje celular por una expresión génica alterada. <sup>(1,20)</sup>

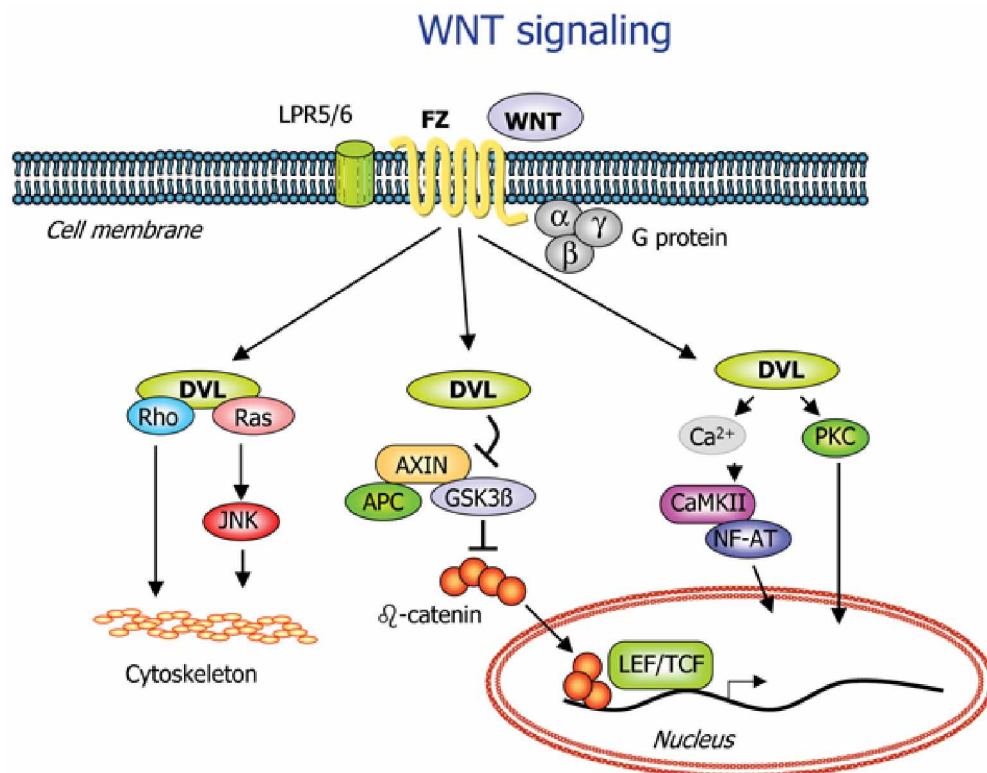


Fig. 9 Vía de señalización Wnt <sup>36</sup>

### 3.1.1.2. Genes Hedgehog.

Hay tres genes hedgehog, desert, indian y sonic hedgehog. Sonic hedgehog pueden dirigir la diferenciación celular hacia diversos tejidos por medio de umbrales de concentración específicos así participan en gran número de acontecimientos del desarrollo, como el establecimiento del patrón de la extremidad, inducción y establecimiento del patrón del tubo neural, la diferenciación de los somitas, la regionalización del intestino y otros. Los tres genes forman la vía Hedgehog, ésta vía de señalización se relaciona con la activación de la proliferación celular y con la inducción de patrones morfogénicos para la estimulación de la auto renovación. La vía de señalización Hedgehog está compuesta por proteínas codificadas por los genes hedgehog que contienen colesterol; éstas proteínas son secretadas y pueden mediar la señalización de dos maneras diferentes: a través del contacto célula-célula entre células adyacentes y de manera alterna produciendo un ligando soluble capaz de difundirse a través del microambiente para interactuar con células distantes. La señal o ligando es captada por receptores de proteínas supresoras de tumor Patched.

El receptor funcional para la señal Hedgehog está conformado por dos proteínas transmembranales independientes, la proteína supresora de tumor Patched y el proto-oncogen Smoothed. Patched inhibe la activación de Smoothed en ausencia de su ligando Hedgehog, es decir, en células que no han sido estimuladas por Hedgehog. Smoothed es un componente de la vía de señalización Hedgehog que se activa cuando las proteínas Hh se unen al receptor Patched, ocasiona un cambio en la estructura del complejo liberando a Smoothed de la influencia represora Patched para dar inicio a la activación de la vía transmitiendo el mensaje al interior de la célula, para luego ser recibido en el citoplasma por las proteínas quinasas

que forman un complejo citoplásmico de alto peso molecular que está anclado a estructuras del citoesqueleto celular llamadas microtúbulos en donde el factor de transcripción Ci155 es fosforilado por la proteína quinasa para después activar la expresión de los genes blanco Hedgehog tales como Decapentaplegic, Wingless y el propio Hedgehog, produciendo finalmente una respuesta.

Sonic Hedgehog, Patched y Smoothed se expresan en células humanas primitivas CD34 +, CD38-, células mieloides maduras (CD33+), linfocitos B (CD19+) y T (CD3+), células de la estroma de médula ósea y células endoteliales de la vena umbilical: (1,20)

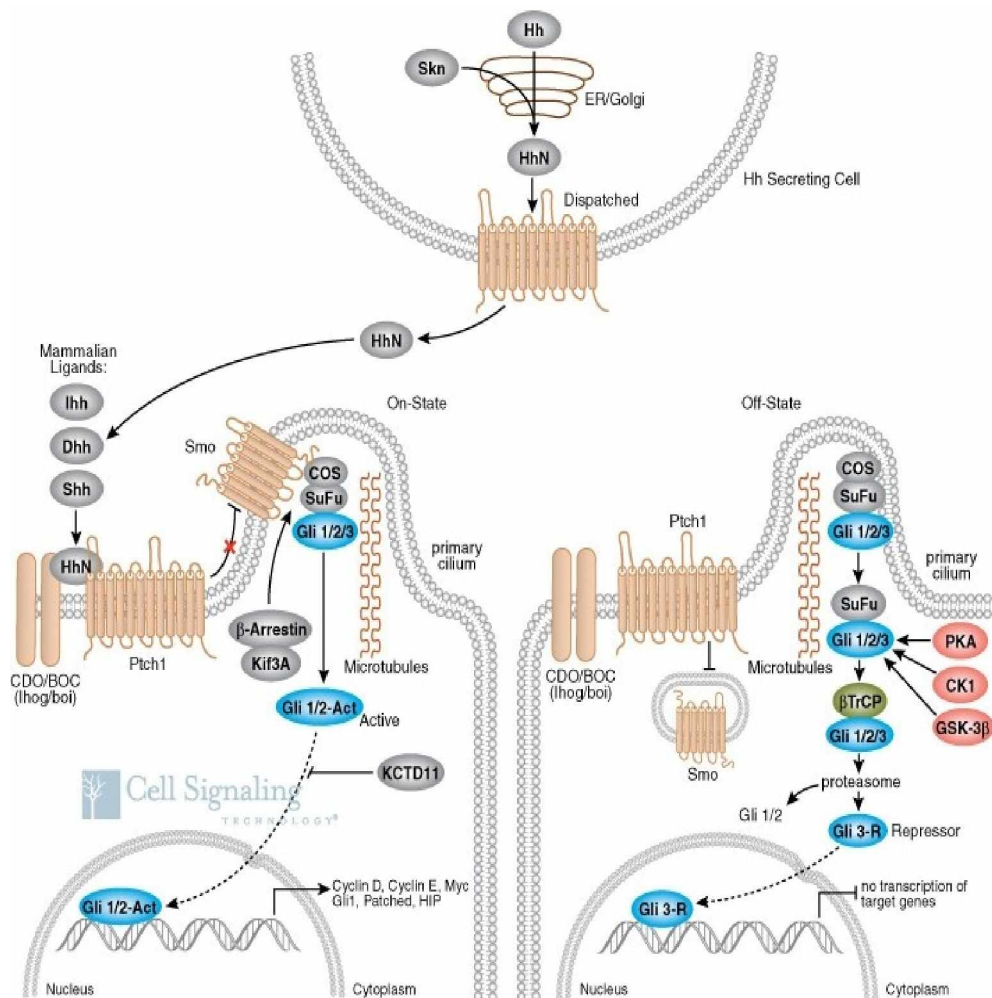


Fig. 10 Vía de señalización Hedgehog <sup>38</sup>

### **3.1.1.3. Genes Notch.**

Las proteínas Notch son grandes polipéptidos transmembranales con diferentes regiones o dominios estructurales, éstas proteínas forman la vía de señalización Notch, y está constituida principalmente por cuatro genes: Notch 1, Notch 2, Notch 3 y Notch 4, que se expresan ampliamente durante la embriogénesis y en el adulto, la expresión persiste en los tejidos regenerativos de ovarios y testículos. Ésta vía se ha asociado con los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular en casi todos los estadios de desarrollo, en general la activación de Notch conduce a la supresión transcripcional de los genes específicos de linaje celular. Sus tres efectos principales son:

- a) El mantenimiento de las células madre o precursoras en un estadio diferenciado.
- b) Decidir el destino celular.
- c) Influencia en la diferenciación y la progresión del ciclo celular.

El dominio extracelular de Notch contiene un número variable de repeticiones que además de atravesar la membrana celular son importantes para que el ligando se una al receptor y active la vía, una vez formado el complejo ligando-receptor, se produce un cambio estructural que favorece la activación y liberación del dominio intracelular del receptor Notch liberado en el citoplasma y activa la molécula efectora CSL, ésta interactúa físicamente con Notch y media la transducción de señal del citoplasma al núcleo, donde el complejo se une a secuencias de ADN específicas cuya función es regular la expresión de genes blanco como Hairy para un efecto final de represión de la transcripción de los genes lo cual funciona como regulador negativo en la expresión de linaje celular. El dominio intracelular contiene una región que favorece las

interacciones proteína-proteína, necesarias para continuar con la transmisión del mensaje. Las proteínas Notch no tienen actividad enzimática, transmite las señales a través de interacciones moleculares directas. Notch 1,2 y 3 en mamíferos, contienen señales de localización nuclear y secuencias OPA que constituyen un dominio rico en glutamina, con función de transactivador de la transcripción; tiene también el dominio RAM, el cual se une a los efectores o potencializadores de la actividad de la vía. <sup>(20)</sup>

La vía de señalización Notch es un importante regulador de la auto renovación de las células madre hematopoyéticas por inhibición de la diferenciación; tiene un papel primordial en la diferenciación de la epidermis pues estimula la expresión de los marcadores para la proliferación de queratinocitos. Notch 1 tiene patrones de expresión en estirpes celulares no diferenciadas y proliferativas del desarrollo de órganos como cerebro, ojos y el tubo neural, se expresa también en tejidos en el epitelio estratificado de la epidermis y en capas suprabasales intermedias de las mucosas de la cavidad oral, esófago, y vagina; Notch 2 tiene un papel específico en la morfogénesis dental, Notch 3 está implicado en la neurogénesis, adipogénesis y Notch 4 participa en el desarrollo vascular, renal y hepático. <sup>(21)</sup>

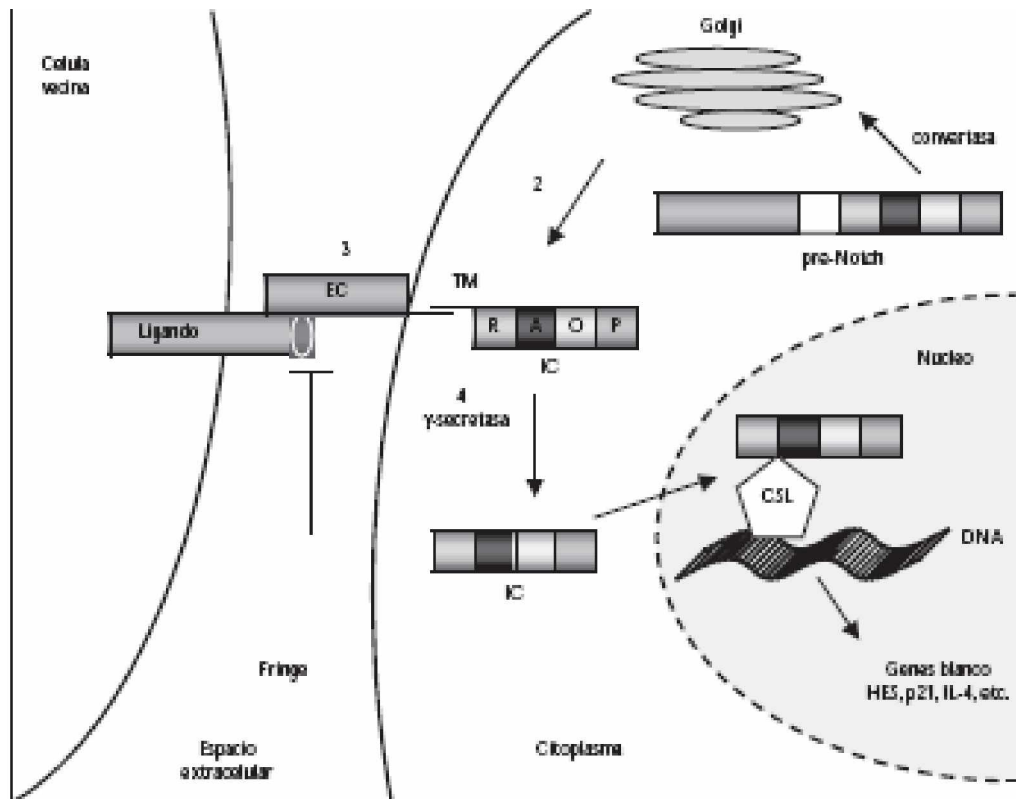


Fig. 11 Vía de señalización Notch <sup>21</sup>

### 3.1.2. Cascada de señalización JAK-STAT.

JAK significa Janus Tirosina quinasa; las Janus quinasa son una familia de proteínas con actividad tirosina-quinasa, que reciben éste nombre en honor a Jano el dios romano de las transiciones. En mamíferos, la familia de las JAKS está constituida por 4 miembros denominados JAK1, JAK2, JAK3, y Tyk2.

Los receptores de citoquinas son proteínas transmembrana, de cadena sencilla, y durante el proceso de unión del ligando dan lugar a la formación de complejos funcionales (homodímeros, heterodímeros u heterooligómeros).

Éstos receptores se dividen en:

- a) Tipo I conocidos como familia de receptores hematopoyéticos, presentan residuos de cisteína y tienen dos regiones box 1 y 2 esenciales para el anclaje de las Janus quinasas.
- b) Tipo II se caracterizan por presentar dos dominios de fibronectina en su región extracelular, dos regiones box 1 y 2; pero carecen de residuos de cisteína.

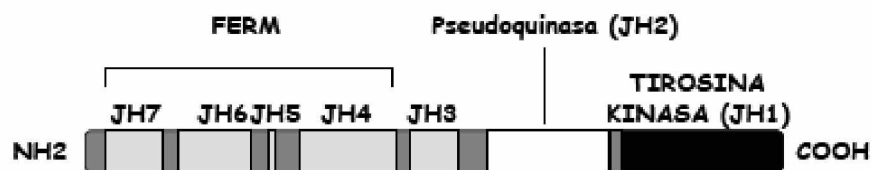


Fig 12 Estructura de las Jak <sup>22</sup>

El mecanismo de señalización de la vía JAK/STAT, depende de la activación de dos familias de proteínas intracelulares; las Janus quinasas JAK y las STAT (signal transducers and activators of transcription).

Las STAT son una familia de factores de transcripción constituida por siete miembros denominados STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAS-4, STAT-5a, STAT-5b y STAT-6, todas éstas presentan siete dominios.

- 1) Dominio N-terminal. Encargado de regular la traslocación nuclear y favorece la interacción de las STATs con otras proteínas y con el DNA.
- 2) Dominio CCD (coiled- coil domain). Interviene en la interacción de las STATs con otras proteínas y la unión al receptor de citoquinas.
- 3) Dominio DBD ( DNA binding domain). Encargado de reconocer las secuencias específicas de DNA a las que se unen las STATs.
- 4) Dominio SH2. Dominio que posee la capacidad de reconocer residuos de fosfotirosina. Éste es el más conservado pues resulta fundamental



para el reclutamiento de las STATs por los receptores de citoquinas y para su unión con las JAKs.

- 5) Dominio de unión (linker). Su función es conectar el DBD con el dominio SH2.
- 6) Dominio TAD (transactivación). Encargado de regular la transcripción.

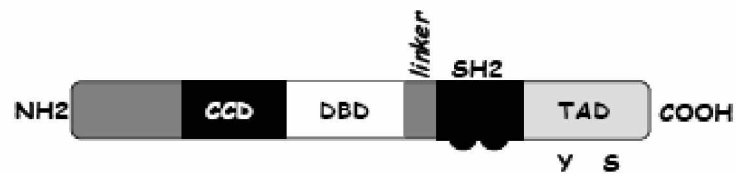


Fig 13 Estructura de las STAT s <sup>22</sup>

La activación de ésta vía es iniciada por la unión de un ligando a su receptor. Las JAKs están constitutivamente asociadas a las regiones box 1 y box 2 del dominio intracelular del receptor, de forma que el cambio conformacional que se produce en el receptor tras la unión del ligando hace que las JAKs se aproximen, lo permite su transactivación (es decir su fosforilación recíproca en residuos de tirosina). Una vez activadas las JAKs van a fosforilar al receptor y a las STATs.

Una vez fosforiladas por JAK, las STATs dimerizan a través de su dominio SH2 y se trasloca para la posterior entrada de las STATs al núcleo donde se unen a elementos de respuesta específicos, regulando la transcripción de genes y así participar en la auto renovación. <sup>(22)</sup>

# JAK/STAT signal transduction

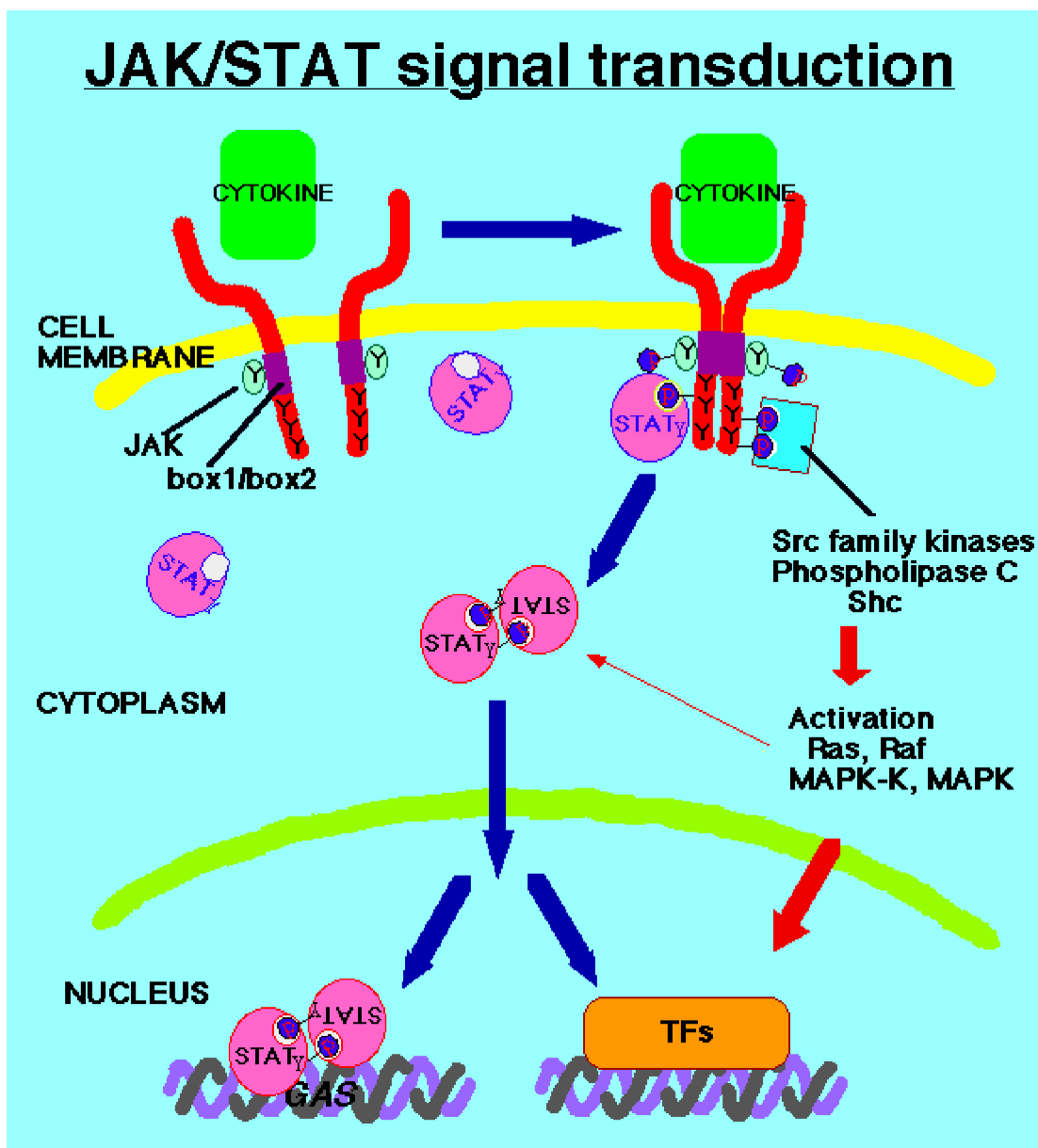
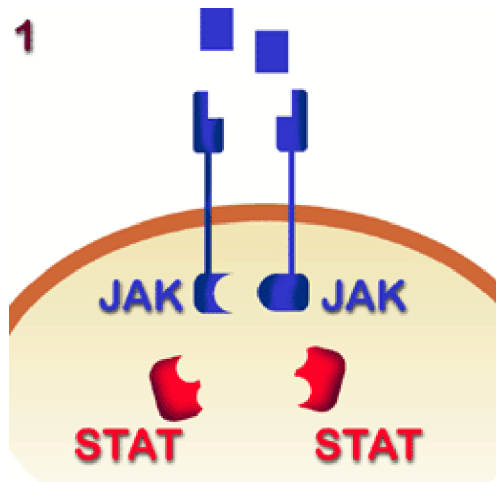
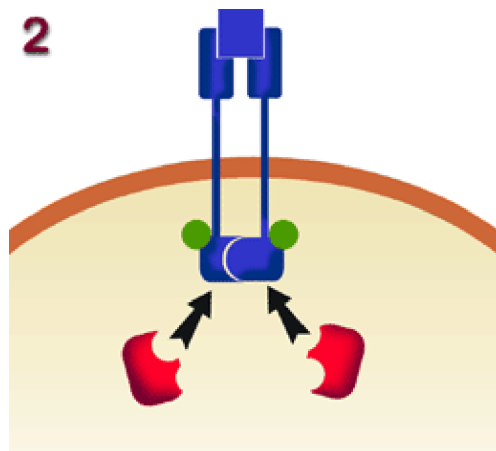


Fig. 14 Cascada de señalización Jak/STAT <sup>35</sup>

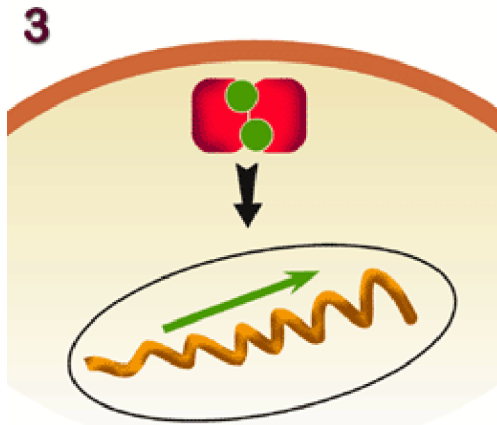
## RECEPTORES DE LAS CITOQUINAS. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN



1. Unión de la citocina al receptor.



2.- Dimerización del receptor y activación de las quinasas JAK, produciéndose la fosforilación del receptor.



3.- Fosforilación y dimerización de los SATS, activación de la transcripción de los genes-diana.

Fig. 15 Mecanismo de acción de la vía Jak/STAT <sup>35</sup>

### **3.2. Potencial de diferenciación.**

Se le conoce como la capacidad de una célula para diferenciarse en múltiples linajes; es el potencial para modificar el fenotipo de la célula de origen en distintos tipos celulares al tejido de origen y al menos en un tipo celular diferente al tejido de origen.<sup>(9)</sup>

#### **3.2.1. Moléculas asociadas a la diferenciación.**

Durante el proceso de diferenciación de las células madre se activan factores de transcripción que van a realizar interacciones con otros factores derivados de las células del nicho, así como hay factores que son capaces de controlar la auto renovación también pueden controlar la diferenciación celular; es el caso de las vías Wnt, Notch y Hedgehog. Pero también existen otras moléculas que participan en el proceso de diferenciación de las células madre.

##### **3.2.1. Molécula SCI-Tal-1.**

Factores encargados en la formación de todos los linajes celulares de la hematopoyesis.<sup>(20)</sup>

##### **3.2.1.2. HOXB4.**

Miembros de la familia de genes homeobox hox, fueron los primeros implicados en la regulación de la especificación de linaje y el desarrollo de las células madre en varios tejidos incluyendo el sistema hematopoyético.

El factor de transcripción HOXB4 es el que más se ha estudiado, sus niveles de expresión se encuentran elevados en células de médula ósea que contienen gran cantidad de células iniciadoras de cultivo a largo plazo. Participa en la diferenciación de los linajes eritroide y granulocítico. Un

descenso de los niveles de HOXB4 inhibe la formación de colonias de crecimiento para éstos linajes. <sup>(20)</sup>

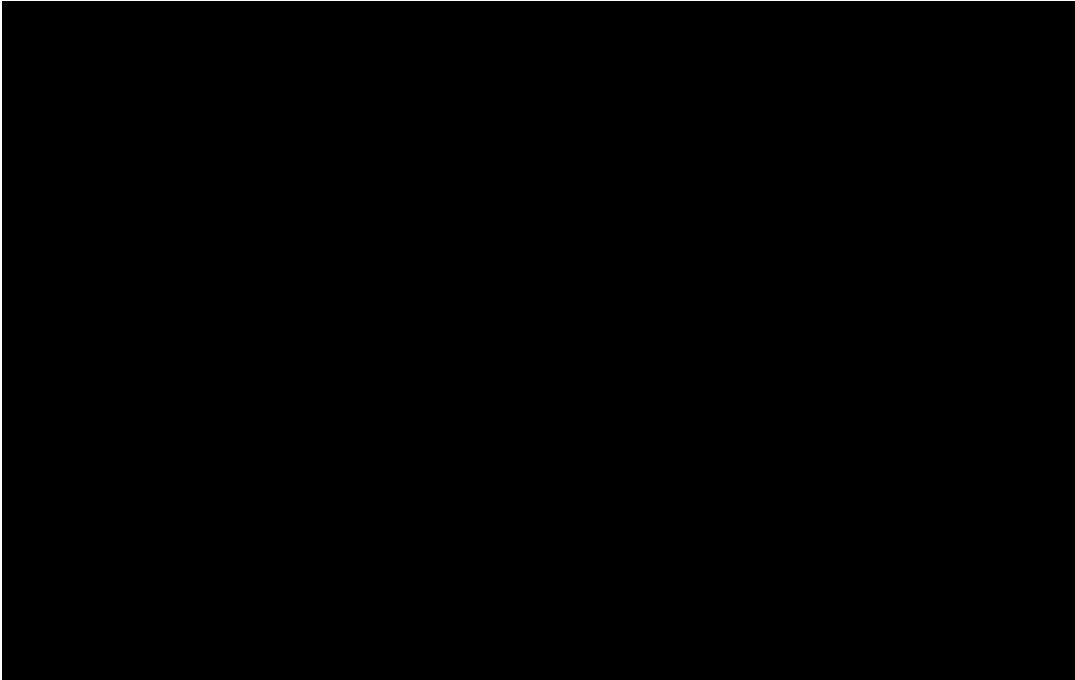


Fig. 16 Factores que intervienen en la auto renovación y diferenciación de las células madre <sup>38</sup>

### **3.3.Reconstitución funcional in vivo.**

Significa la diferenciación funcional in vivo en células del tejido de origen embrionario y al menos en un tipo celular de un tejido diferente al tejido de origen inicial.

### **4. Nichos de las células madre adultas.**

Existen pequeñas zonas donde reside el control de la actividad de las células madre en los diferentes órganos del cuerpo, se ha sustentado que las células

madre son controladas por un medio ambiente único y específico denominado “nicho”. El nicho es un mecanismo mediante el cual se regula la división y la diferenciación celular. Cuando un linaje prevalece las células madre se dividen y una de las células hijas mantiene la conexión con el nicho, mientras que la otra llega sola y comienza a diferenciarse; cuando prevalece el mecanismo de una población la división puede ser simétrica o asimétrica según lo determinen los factores locales y la matriz extracelular del nicho. Las células madre aparecen cuando el nicho adquiere la capacidad de preservar y controlar las células indiferenciadas. El nicho posee propiedades reguladoras y vías de señalización importantes para definir el destino celular.

Estos nichos se pueden encontrar en diferentes tejidos específicos en donde las células madre son reconocidas por marcadores dependiendo del linaje. Cada una de éstas células, es localizada por vías de señalización intramolecular por medio de dos mecanismos:

- 1) Un linaje específico, en donde hay divisiones de células madre específicas, y orienta su división para asegurar que su célula hija hereda sus características y se fije al microambiente.
- 2) Al continuar la división celular una nueva célula hija adquiere información sobre su herencia y se relocaliza, para poder diferenciarse. <sup>(9)</sup>

## **5. Señales externas e internas de las células madre adultas.**

Son múltiples mecanismos de retroalimentación y de interacciones recíprocas entre células, dentro del nicho que ocupan en el organismo, son mensajes del exterior que ponen en marcha una serie de factores de transcripción para activar los genes, cuyos productos ejercen una serie de efectos de activación e inhibición de las divisiones para los procedimientos de auto renovación y diferenciación celular. <sup>(4)</sup>

### **5.1. Controles intrínsecos.**

Son los relojes internos que de alguna manera les indican a las células el número de veces que deben dividirse antes de diferenciarse totalmente; para esto se ayudan de proteínas promotoras e inhibidoras del ciclo celular que van acortando la longitud del telómero conforme la célula se especializa.

### **5.2. Controles extrínsecos.**

Un complejo juego de señales de corto y largo alcance entre células madre, sus hijas y las células vecinas. En muchos casos la señal externa que llega al receptor de membrana se reemite al interior mediante una cascada de reacciones bioquímicas con abundantes fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas, para finalmente originarse una orden para activar o desactivar grupos de genes que participan en los procesos de auto renovación y diferenciación celular. Éstos controles externos funcionan por medio de factores secretados como las citoquinas que dirigen la maduración, proliferación y diferenciación a los linajes mieloides y linfoides; también se sirven de las interacciones célula-célula a través de proteínas integrales de membrana y de las interacciones célula-matriz extracelular del tejido, por medio de receptores de membrana. <sup>(4)</sup>

## **6. Marcadores de células madre adultas.**

Una célula madre se puede encontrar hasta en 100,000 células adultas circulando en sangre, además de que éstas morfológicamente son indiferenciadas; sin embargo, gracias a los marcadores moleculares se ha facilitado el trabajo de investigación para la detección de las células. Los



tipos de marcadores que se utilizan, son específicos de la célula y se encuentran en su superficie celular.

Estos marcadores, in vivo codifican para proteínas especializadas que actúan como receptores y tienen la capacidad de señalización o adhesión. Hay muchos tipos de marcadores pues difieren en estructura y afinidad, normalmente las células usan a los receptores, como vía de señalización con otras células y responder a señales extrínsecas y éstos receptores actúan como marcadores. Para identificar los marcadores de las células madre se usan nombres cortos basados en moléculas que están unidas a los receptores de superficie de la célula, y para identificar un tipo de célula madre se utiliza la combinación de varios marcadores celulares que pueden ser positivos o negativos. <sup>(9)</sup>

### **6.1. CD34**

Conocido como Side Population, éste es expresado en la pregastrulación del embrión, y es un receptor de células madre. (9)

Es una proteína monomérica de peso molecular entre 110 y 120 Kilodalton con una región amino terminal extracelular que contiene un dominio proximal de 66 aminoácidos conformado por seis residuos de cisteína y al parecer con una forma globular, de los 145 aminoácidos que componen el dominio N-terminal, el 35 % son residuos de serina o treonina. Éste marcador se expresa en células madre hematopoyéticas y en células endoteliales de vasos pequeños y en fibroblastos embrionarios. El antígeno CD34 es codificado por un gen ubicada en el cromosoma 1q32, región que contiene a su vez varios genes codificadores para moléculas de adhesión celular.

Se ha considerado que juega un papel importante en la adhesión intercelular y en la adhesión de célula-matriz extracelular, induciendo la polimerización de actina, el CD34 está implicado en la regulación y mantenimiento de la

actividad hematopoyética gracias a la inhibición de la proliferación de células progenitoras.

La expresión del antígeno CD34 se expresa sólo entre el 1 y 4 % de las células nucleadas presentes en la médula ósea humana de individuos sanos. Células CD 34+ purificadas son capaces de reconstituir la hematopoyesis multilínea y además presentan un potencial de implantación lo que asegura el éxito en injertos autólogos. Se ha detectado células CD34 con potencial linfopoyético en fuentes hematopoyéticas adultas. <sup>(9,20)</sup>

## **6.2. Técnicas para la señalización de marcadores específicos.**

Son técnicas que se basan en detectar el marcador específico.

### **6.2.1. Técnica FACS.**

Técnica que detecta el marcador por medio de un componente fluorescente que es activado en presencia de un haz de luz ultra violeta. FACS significa (fluorescent activate cells sorting), ésta utiliza un instrumento que permite la suspensión de miles de células marcadas en donde se hacen pasar por un agujero pequeño célula por célula; luego éstas son atravesadas por una luz láser que excita las moléculas fluorescentes, unidas a los marcadores específicos, produciendo una señal eléctrica que es procesada por un software generando una gráfica en donde identifica la población de células detectadas dependiendo de su carga eléctrica.

### **6.2.2. Técnica PCR.**

Técnica que realiza la identificación de genes y factores de transcripción, por medio de una reacción en cadena de la polimerasa que detecta la presencia de genes activos y juegan un papel en la especialización de la célula.

### **6.2.3. Técnica de fluorescencia no dependiente de marcadores de superficie.**

Ésta técnica permite ver el camino de la célula madre a una célula diferenciada o especializada; ésta técnica consiste en insertar un gen llamado "reportero" (GFP) o proteína fluorescente verde. Éste gen sólo es activado cuando las células son indiferenciadas y comienzan a especializarse, al ser activado éste gen emite un color verde.<sup>(9)</sup>

## **CAPÍTULO II**

### **GENERALIDADES DE INGENIERÍA CELULAR**

## **1. Ingeniería celular.**

Es el conjunto de principios y métodos de ingeniería y de las ciencias de la vida, cuyo objetivo es el entendimiento fundamental de la relación entre estructura y función de los tejidos normal y patológico de los mamíferos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restablecer, mantener y mejorar la función del tejido. <sup>(7)</sup>

Se conoce como ingeniería tisular al área científica interdisciplinaria cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular, creación de sustitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo; es la intención de ésta ciencia reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido. <sup>(5,13)</sup>

## **2. Estrategias básicas.**

Tienen como objetivo :

- 1) Aislamiento de células y sustitutos celulares. Reemplaza, previene complicaciones y permite la manipulación celular in vivo.
- 2) Utilizar sustancias inductoras de la formación del tejido. Utiliza hormonas o factores de crecimiento y sistemas de liberación controlada.
- 3) Utilizar sustratos y matrices complejas, de sustrato natural el principal ejemplo sería el uso de la fibrina, usa células cultivadas y finalmente un control de reacción inmune mediante fármacos inmunosupresores.

## **3. Componentes**

Esta disciplina se integra de varios componentes:

- 1) Biomateriales y sustratos
- 2) Muestra de células para cultivo in vitro o in vivo.
- 3) Agentes farmacológicos.
- 4) Vasculogénesis.

### **3.1. Biomateriales y sustratos**

Muchas células no se incorporan al tejido receptor por sí mismas y para lograr que permanezcan en su sitio se usan transportadores celulares que permitan a las células subsistir hasta su incorporación con el huésped. Para su desarrollo es necesario que se forme una matriz extracelular para lo cual se necesitan biomateriales y sustratos que sean capaces de mantener a las células en contacto directo con el segmento del tejido receptor. <sup>(5,7)</sup>

La matriz extracelular es un sistema dinámico integrado por diversas moléculas y contribuye a la migración, proliferación y diferenciación celular. La matriz está compuesta por colágeno, glucoproteínas, ácido hialurónico, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina, fibrina, factores de crecimiento, como; citoquinas y enzimas. La interacción de todas estas moléculas brinda soporte celular para el desarrollo de las células madre implantadas en un tejido.<sup>(5)</sup>

Los materiales que la ingeniería tisular utiliza como transportadores celulares deben de tener cierto grado de biocompatibilidad, es decir; que tenga la habilidad de originar una respuesta biológica apropiada para una aplicación específica y para esto depende de interacciones personalizadas entre el material y el medio biológico con el que estará en contacto. <sup>(7)</sup>

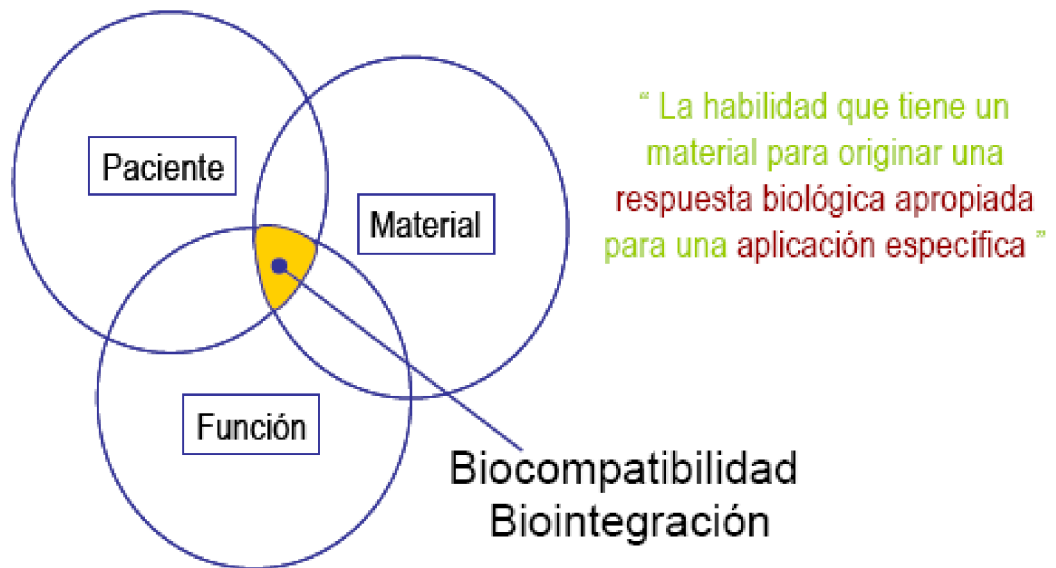


Fig. 17<sup>(7)</sup>

Los biomateriales deben tener características básicas:

- 1.- Alta porosidad, una superficie de contacto celular amplia, estructura constante y forma tridimensional.
- 2.-No tóxicos, no carcinogénicos.
- 3.-Son materiales que deben de contar con la posibilidad de esterilización para su manipulación y deben de contar con una estabilidad mecánica intrínseca.
- 4.- Conductibles para permitir la migración de las células.
- 5.- Inductibles para permitir la proliferación de las células.
- 6.- Permeables para permitir el intercambio de nutrientes y metabolitos.
- 7.- Adherentes para permitir la adhesión de células y moléculas.

Los biomateriales pueden ser biogénicos y sintéticos.

### 3.1.1. Biogénicos.

Tipo de material cuyo origen puede ser vegetal, animal o humano. Sus principales aplicaciones es en suturas quirúrgicas, agentes hemostáticos y son usados para sustitución de vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, tendones, ligamento, regeneración de cartílago. Un ejemplo de éstos, son el colágeno, glucosaminoglucanos y fibrina., etc.<sup>(7)</sup>

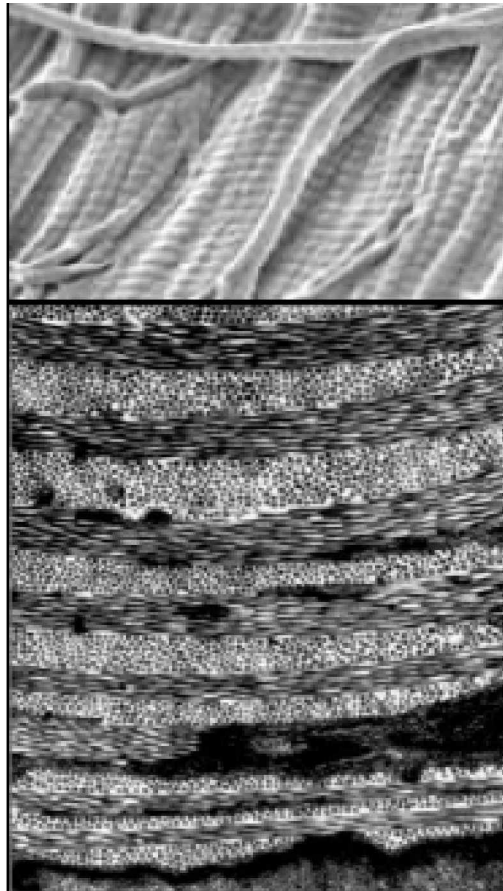


Fig. 18 Fibras de colágeno <sup>7</sup>



### 3.1.2. Sintéticos.

Son polímeros, co-polímeros, geles y metales; su función principal es dirigir el crecimiento celular, ya sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas en él. El polímero debe proveer una adecuada adhesión celular, favorecer la proliferación, diferenciación y algunos casos la migración celular. La mayoría de los biomateriales sintéticos con biodegradables, propiedad que proporciona sustento celular hasta que las células son capaces de secretar su propia matriz extracelular. Los biomateriales sintéticos más comunes son ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), polietilenglicol (PGE), poliamidas, polifosfatenos, hidrogeles alginatos, dextranos, titanio y silicona. De éstos los más biocompatibles son el PGA y PLA por tener características de degradación por simple hidrólisis.

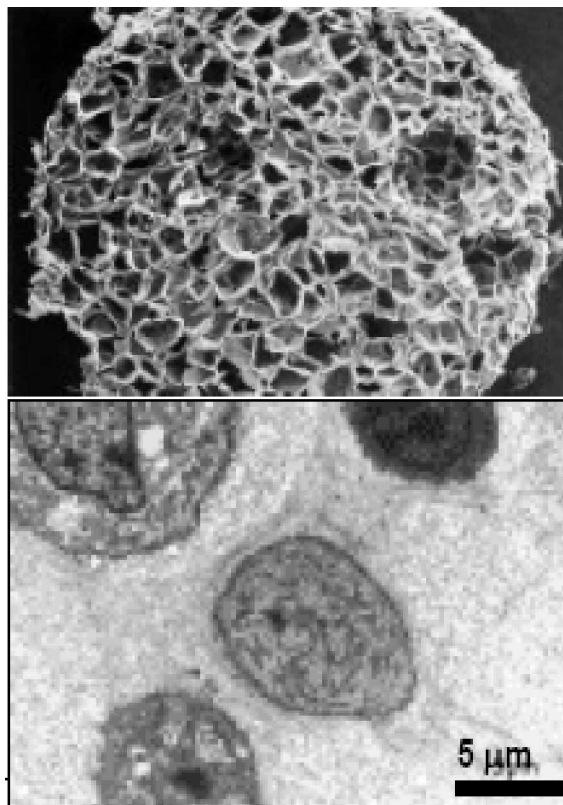


Fig. 19 Cultivo de condroblastos en matrices de ácido poliláctico.<sup>7</sup>

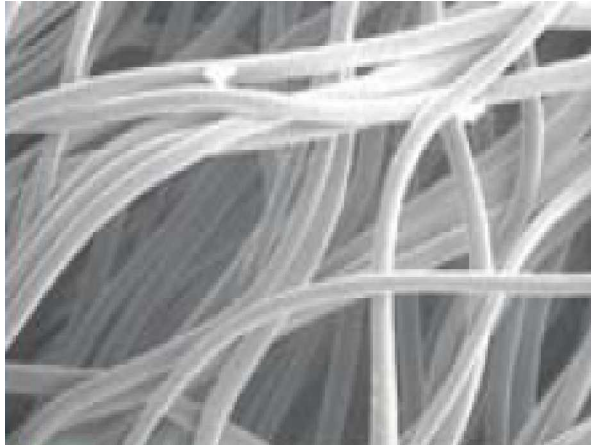
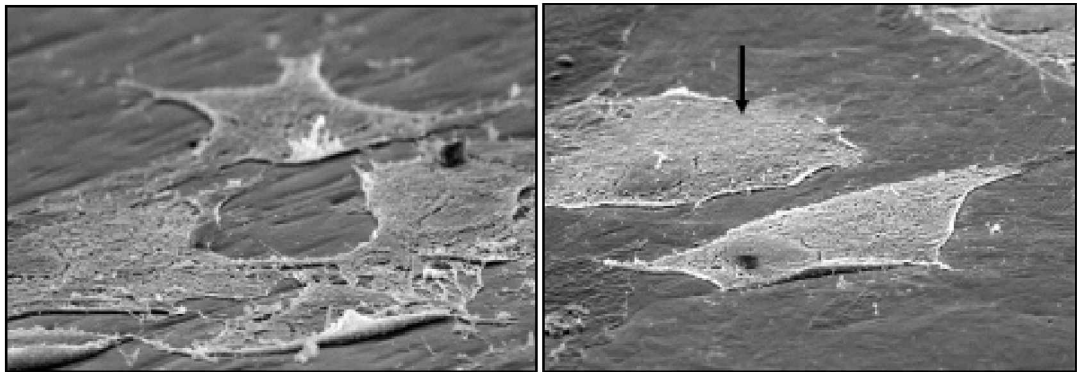


Fig. 20 Matrices de ácido poliláctico <sup>7</sup>

#### Adhesión celular sobre materiales



titanio

titanio / niquel

Fig. 21 <sup>7</sup>

## Biomateriales sintéticos: Implantología



Fig. 22<sup>7</sup>

### 3.2. Muestra de células para cultivo in Vitro o in vivo.

Son el componente vital de la ingeniería tisular. Las células madre empleadas con frecuencia pueden ser células embrionarias o bien adultas, principalmente del tipo hematopoyético y mesenquimal. Las células madre adultas se obtienen por medio de biopsia autóloga órgano-específica, principalmente de médula ósea, cerebro, cartílago, hueso, hígado, piel, pulpa dental, etc.

La muestra de células es obtenida para cultivarla y lograr su proliferación celular, para después ser agregada a una matriz extracelular y poder ser implantada en un tejido para su desarrollo.

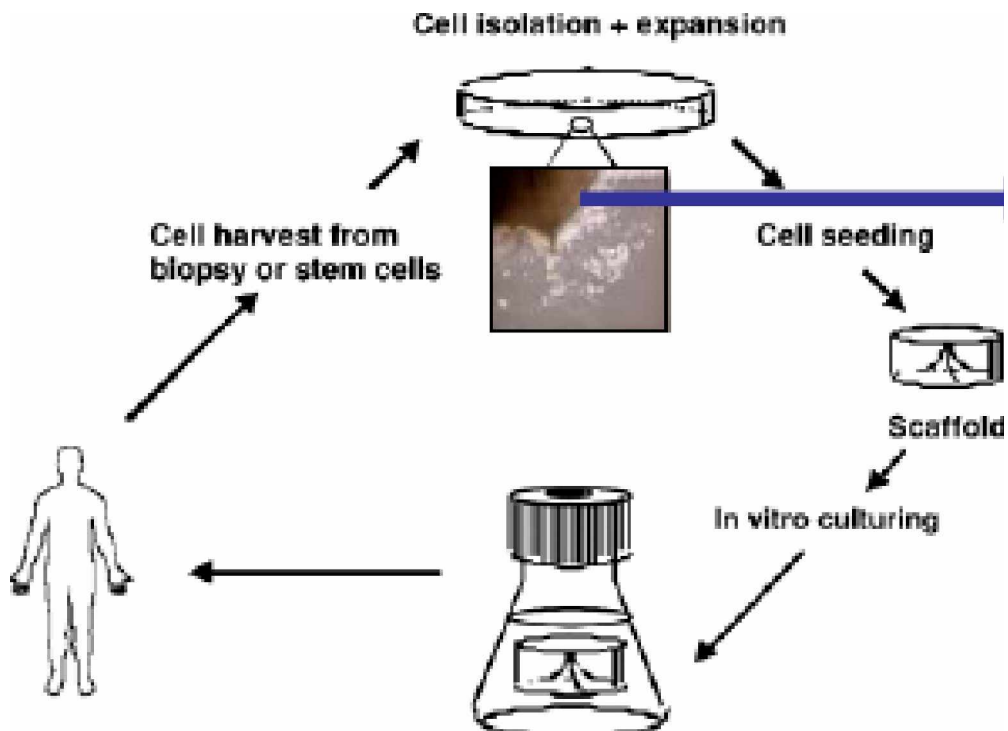


Fig. 23 Cultivo in vitro de células madre adultas <sup>7</sup>

### 3.3. Agentes farmacológicos.

Son complementos en el medio de cultivo que favorecen la proliferación, diferenciación y migración celular. Los principales son las citoquinas y los factores de crecimiento, que intervienen en las señales paracrin.

#### 3.3.1. Citoquinas.

Las citoquinas o citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones complejas entre células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Las citoquinas son producidas por múltiples tipos celulares, principalmente del sistema inmune. Si derivan de leucocitos se denominan interleuquinas, aquellas que son secretadas por monocitos/macrófagos se llaman monoquinas.

Sus principales funciones son:

- § Diferenciación y maduración de células del sistema inmunitario.
- § Comunicación entre células del sistema inmunitario.
- § Activación de los mecanismos de inmunidad natural:
- § Intervención en la respuesta celular específica.
- § Intervención en la reacción de inflamación, tanto aguda como crónica.
- § Control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea.
- § Inducción de la curación de las heridas.

Las citoquinas se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular de señales que alteran el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica.

Hay diversos tipos de receptores de membrana para citoquinas, entre ellos está la familia de las inmunoglobulinas, familia de receptores de hematopoyetinas, familia de receptores de interferones, receptores de factor de necrosis tumoral rico en cisteínas y familia de receptores de quimioquinas.

La mayor parte de los receptores de citoquinas del sistema inmune pertenecen a la familia de receptores de hematopoyetinas. Todos sus miembros tienen en común poseer una proteína anclada a membrana, con un dominio extracelular en el que hay cuatro cisteínas y dominios de fibronectina. Tras su porción transmembrana se encuentra una larga cola citoplásmica con ciertas tirosinas susceptibles de fosforilación.

La unión de la citoquina con el receptor de la célula diana y la activación de la transcripción de los genes cuyos productos son responsables de los efectos de dichas citoquinas se produce por mecanismos de transmisión de

señal, el más importante es la vía de señalización JAK/STAT, anteriormente descrita. ( )

Los agentes farmacológicos con los que se complementa un cultivo también funcionan como sistemas de liberación controlada para brindar el estímulo celular para la formación de un tejido.

### 3.4. Vasculogénesis

El mayor obstáculo en las técnicas de ingeniería tisular, es el rechazo de un implante de células debido a la falta de nutrientes e irrigación de la zona en donde se pretende exista diferenciación celular y crecimiento de un tejido de reparación.

En ingeniería tisular se elabora un sistema microvascular con redes capilares pre-fabricadas que brinden vascularización en el tejido vecino hacia el material recién implantado.

#### La producción de un sistema microvascular

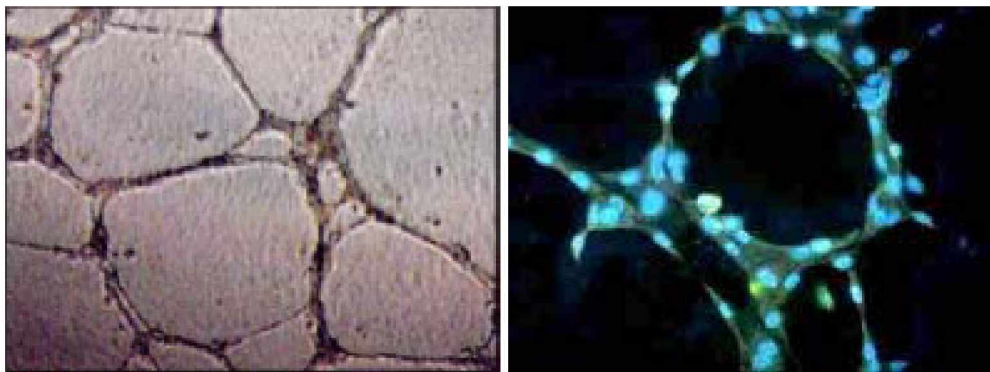


Fig. 24 Red capilar sintética <sup>7</sup>

Se utilizan matrices tridimensionales compuestas de colágeno en donde se agregan células endoteliales para estimular la angiogénesis.

**colágeno I (3D)**  
**+**  
**células**  
**endoteliales**  
**o**  
**progenitoras**  
**mesenquimales**  
**(CD31+)**

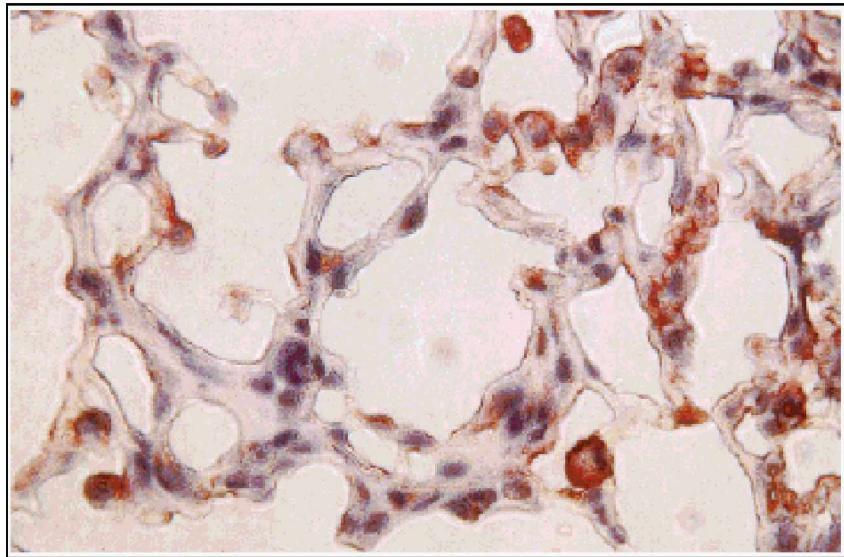


Fig. 25 Red capilar sintética, hecha a base de células madre mesenquimales y fibras de colágeno.<sup>7</sup>

**CAPÍTULO III.**  
**CÉLULAS MADRE ADULTAS Y SU APLICACIÓN EN**  
**REGENERACIÓN TISULAR**



En la actualidad son muchas las aplicaciones médicas que tienen las células madre adultas, el principal reto de su uso es la formación de estructuras tridimensionales para el transporte celular que sean biocompatibles y resistentes a biodegradación y que una vez con las células ya cultivadas sean capaces de imitar la estructura y función de un tejido u órgano. <sup>(13)</sup>

### **Prótesis vascular**

Se han desarrollado técnicas para la inducción de la angiogénesis con el objeto de prevenir la necrosis por falta de irrigación sanguínea en los injertos de tejido y órganos, esta modalidad es eficaz para proveer de nutrientes al sitio receptor de un implante.

La trombosis de cualquier injerto puede ocurrir en tres etapas. La primera etapa o temprana es la que ocurre dentro de los 30 días y generalmente es de causa técnica, es decir; mala realización de la anastomosis. Una segunda etapa, que comprende desde los 30 días a los 18 meses, es la debida cicatrización interna del injerto. La tercera etapa es luego de 18 meses y está relacionada con la progresión del proceso arterioesclerótico.

La prótesis vascular está indicada en enfermedades como arterioesclerosis avanzada, aneurismas, fístulas arteriovenosas, traumatismos entre otras; se utilizan materiales biocompatibles como el Dacron ( polietilen-tereftalato) y ePTFE (politetrafluoretileno), pues está comprobado que producen una reacción con las proteínas del suero y los glóbulos rojos, así como un aumento del tromboxano y en consecuencia disminución de plaquetas; otros estudios demuestran que éstos biomateriales brindan mayor adhesión del injerto, y si éste es tratado previamente con albúmina y colágeno se disminuye su porosidad lo que impide la colonización bacteriana para aminorar un posible rechazo.

Estudios han demostrado que para inducir la angiogénesis in vitro o in vivo se usen factores de crecimiento, como; el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El Vicryl en copolímero de ácido poliglicólico (PGA), es utilizado para crear prótesis biodegradables de nuevos vasos, pero los resultados fueron negativos al presentar dilataciones aneurismáticas, es por eso que posteriormente se utilizaron polímeros como la polidioxanona, material con tiempo de degradación menor, para aumentar su eficacia pues con su rápida reabsorción, promueve una infiltración celular y al mismo tiempo ayuda a la integración del injerto. <sup>(5,13)</sup>

## **Piel.**

A comienzos de los años 80, células autólogas fueron utilizadas para el reemplazo de piel; los queratinocitos fueron tomados por una pequeña biopsia quirúrgica de una zona no lesionada y fueron cultivados y expandidos in vitro para después ser transplantados sobre las lesiones de los pacientes. Simultáneamente otros investigadores utilizaron polímeros como vehículo para implantar estas células.

En 1981 se creó una dermis artificial a partir de una matriz extracelular con componentes básicos como colágeno y glucosaminoglicanos cubiertos por una membrana de silastic; el silastic es un componente que previene la pérdida de líquidos y protege el crecimiento celular .

Existe otro sistema para la generación de piel, consiste en un doble cultivo conformado por células de la dermis y de la epidermis sembradas en una matriz de colágeno, aparentemente las células obtenidas los fibroblastos y queratinocitos no provocan respuesta inmune del huésped, es decir; que los fibroblastos de la dermis tienen un potencial alto de proliferación y no presentan antígenos de superficie por lo que la posibilidad de rechazo del injerto es mínima.

Otra técnica útil para la formación de piel, es el uso de células obtenidas del prepucio humano removidas quirúrgicamente para ser sembradas con fibroblastos en una matriz de poliglactina componente natural de la matriz extracelular, para el desarrollo de un cultivo el cual ha sido utilizado en estudios clínicos humanos.

Actualmente se están desarrollando diversas técnicas para la formación de piel en tratamientos de quemaduras severas o úlceras crónicas y cuyos resultados muestran un gran potencial como alternativa de tratamiento. <sup>(5,13)</sup>

### **Ingeniería del tejido cardíaco.**

Las alteraciones de las válvulas cardíacas son habitualmente tratadas con reemplazos vasculares o bioprótesis. A comienzos de los años 60 se formaron válvulas con pericardio autólogo y ante los resultados negativos se siguió investigando para crear una prótesis de células endoteliales y miofibroblastos autólogos sembrados en ácido poliglicólico; ésta prótesis se utilizó para el reemplazo de una válvula en una oveja, mostrando buenos resultados en un periodo de 8 semanas. Esta técnica aún está lejos de poder ser utilizada en humanos, pero es un punto de partida para el desarrollo de una nueva terapéutica. <sup>(5)</sup>

La ingeniería tisular ha permitido desarrollar injertos tridimensionales de tejido de miocardio por medio de una capa estratificada en la que se cultivan miocitos cardiacos para luego trasplantarla en el tejido cardíaco dañado.

La técnica consiste en sobreponer varias capas de láminas de 20 nm aproximadamente de poly N-isopropylacrylamida en las que se agregan muestras celulares de miocitos cardíacos; las capas de células se integran y se comunican morfológicamente, formando un único y continuo tejido celular denso que se asemeja al músculo cardíaco nativo.

Pocas semanas después de trasplantar el estratificado es posible observar macroscópicamente un latido sincrónico de los injertos, y después de un año

es posible observar redes vasculares bien organizadas. Aunque ésta técnica sólo se ha aplicado en ratas se tiene la esperanza de que en un futuro sea una importante alternativa en humanos. <sup>(7)</sup>

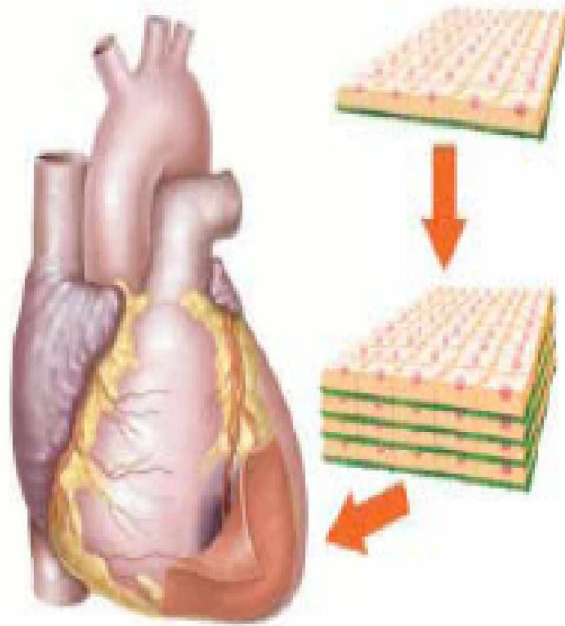


Fig. 26 Cultivo de células madre hematopoyéticas en estratos para injerto cardíaco.<sup>7</sup>

### **Intestino.**

Se han desarrollado numerosas técnicas quirúrgicas para aumentar la superficie de absorción intestinal de pacientes que padecen el síndrome del intestino corto, caracterizado por malabsorción y malnutrición, con signos clínicos variables como: diarrea, pérdida de peso deshidratación, anemia, entre otros. Para su tratamiento se usan sustancias que disminuyen la motilidad intestinal y actualmente se han creado válvulas ileocecales y transplante de tejido intestinal a partir de células madre. Se han llevado a cabo diversos experimentos en animales como; cerdos, ratas, conejos y

pollos, en los que utilizando ingeniería tisular se obtiene material intestinal por aislamiento de enterocitos cultivados en un polímero, que luego se implanta en el segmento de tejido intestinal dañado. <sup>(5)</sup>

## Hígado.

En modelos experimentales se utilizó el aislamiento de hepatocitos para su empleo en diversos sistemas de implantación como tratamiento de insuficiencia hepática.

Se aíslan los hepatocitos con una viabilidad celular de 6 a 8 semanas para luego ser microencapsulados en una matriz tridimensional de colágeno cubierta por una membrana semipermeable y posteriormente se implanta el cultivo en animales de experimentación, logrando disminuir los niveles de bilirrubina.

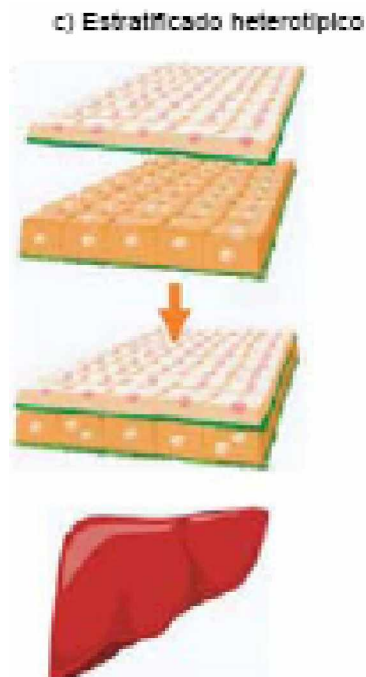


Fig. 27 Cultivo de hepatocitos en un estratificado heterotípico. <sup>7</sup>

Otros estudios han desarrollado técnicas de cultivo directo de hepatocitos sobre diversos polímeros que se implantan en la raíz del mesenterio en animales, en los que se ha logrado la producción de albúmina, disminución de la bilirrubina y se logró mejorar la depuración de urea.

Hasta hoy se han utilizado diversos sistemas tridimensionales de cultivo celular buscando incrementar la adhesión celular, tales como matriz de ácido poliláctico y esponjas conformadas por derivados de carbohidratos. Estudios recientes mostraron que los cultivos de hepatocitos en polímeros a base de alcohol tipo polivinilo tienen buena adhesión celular.

Se ha visto que los hepatocitos son capaces de repoblar el polímero utilizado, pero debemos encontrar el polímero tridimensional adecuado que permita el desarrollo de un tejido hepático funcional<sup>(5)</sup>

### **Cartílago.**

Actualmente se utilizan dos tecnologías en la formación de cartílago a través de ingeniería tisular: una es el trasplante de injertos osteocondrales y otra es el trasplante de condrocitos. El trasplante de injerto osteocondral en sus inicios mostró problemas de rechazo inmunológico, por ello posteriormente se utilizaron xenoinjertos con una breve inmersión en glutaraldehído antes de ser implantados, la intención es que éste tejido sirva y actúe como matriz para la regeneración tisular en el sitio del implante.

El trasplante de condrocitos, es otra técnica útil, en la que se lleva a cabo el aislamiento de condrocitos para ser trasplantados por dos métodos: uno es por inyección directa de las células y otra es implantación de una matriz con cultivo celular.

## Regeneración del cartílago articular:

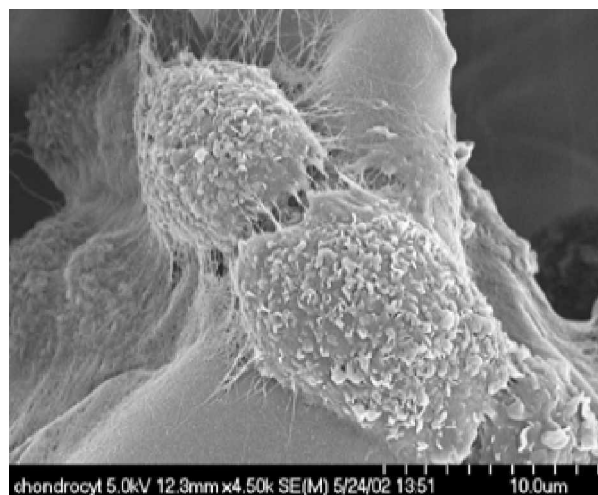
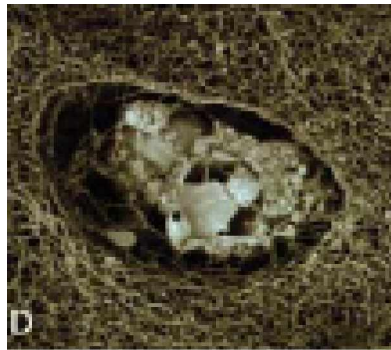
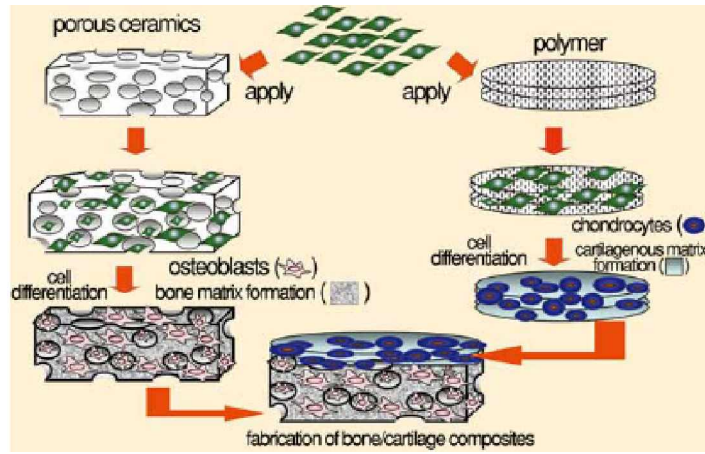


Fig. 28,29 y 30 Cultivo de condroblastos <sup>7</sup>

Para el transporte celular en éstas técnicas se utilizan polímeros sintéticos como, el ácido poliláctico, gel de agarosa y ácido glicólico, entre otros. Éstos polímeros permiten la diferenciación, respetando la morfología y manteniendo el fenotipo de las células implantadas. <sup>(5)</sup>

### **Órganos genitourinarios.**

En anormalidades congénitas, y enfermedades como cáncer, trauma, infecciones, en las que esté presente un daño irreversible eventualmente se requiere de una reconstrucción quirúrgica. La utilización de tejidos autólogos no urológicos para la reconstrucción urológica aparece como una buena alternativa, a pesar de los posibles efectos secundarios. Las prótesis más comúnmente utilizadas en urología son de silicona, y generalmente son empleadas para la corrección del reflujo vesicouretral. Sustancias como el teflón, que en cierto tiempo se usó para combatir el reflujo y la incontinencia, ha tenido que ser sustituido debido a severos trastornos de biocompatibilidad pues hay migración local del producto celular.

Una de las grandes limitaciones de la aplicación de la ingeniería tisular en el área genitourinaria se debió a la dificultad de lograr el crecimiento de grandes cantidades de tejido, por lo que en los últimos años se ha logrado obtener, expandir y desarrollar células uroteliales humanas a partir de una pequeña biopsia quirúrgica, en un medio de cultivo específico para la proliferación celular.

La sustancia utilizada con más frecuencia como transportador celular es el ácido poliglicólico.

En un estudio para crear aumento de vejiga mediante injertos gastrointestinales con ingeniería tisular, se utilizaron perros en los que se realizó y sustituyó la mucosa gastrointestinal por células madre uroteliales autólogas, se presenta una unión espontánea y luego son trasplantadas sin necesidad de sutura; de entre 3 semanas y 11 meses después los perros



son sacrificados para poder observar los injertos y se observa la formación de un tejido con histología, capacidad y función vesical normal. <sup>(7)</sup>

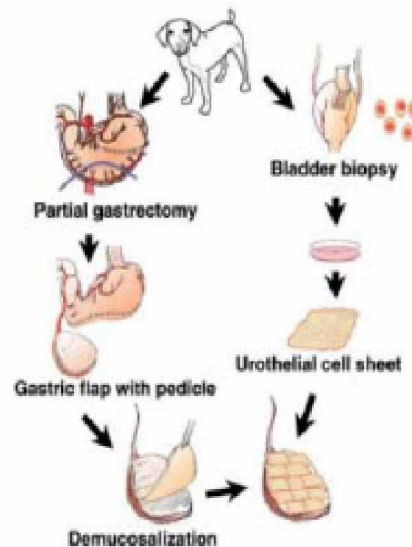


Fig. 31 Ruta de seguimiento para formar aumento de vejiga<sup>7</sup>

Las investigaciones han dado a conocer que también se puede reconstruir mediante ingeniería tisular otros tejidos como el cuerpo cavernoso y el clítoris.

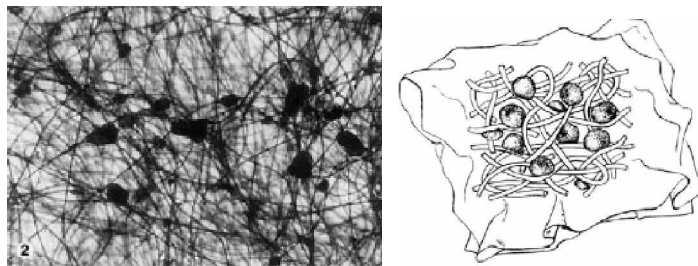
El transplante de órganos genitourinarios también se realiza mediante un doble cultivo celular utilizando células del músculo liso del cuerpo cavernoso y la inclusión de células endoteliales sembradas en un polímero; o bien mediante el uso de una matriz de colágeno del cuerpo cavernoso.

Se ha descubierto que el uso de polisulfatos también es viable, pues éstos polímeros son fibras multiperforadas sembradas con células renales y endoteliales, que favorecen el transporte activo de sal y agua para aumentar la productividad celular.

El uso de matrices de colágeno para la reconstrucción uretral se aplica en la actualidad en humanos, mostrando buenos resultados; lo que da un panorama alentador para seguir en la investigación de éstas técnicas para establecer una alternativa terapéutica real. <sup>(5, 13)</sup>

## Páncreas.

Estudios de Bernat Soria de la Universidad Miguel Hernández de Elche; han demostrado que es posible obtener células secretoras de insulina a partir de células madre de un ratón. Se han realizado trasplantes de islotes de Langerhans generados a partir de células madre adultas del páncreas<sup>(4)</sup>



**Islotes de Langerhans**  
encapsulados en membranas de  
**condrocitos** en una matriz de ácido  
poliglicólico (PGA)

Fig. 32<sup>7</sup>

## Epitelio de la córnea.

En trauma ocular como quemaduras y enfermedades graves que causan opacidad de la córnea y pérdida de agudeza visual debido a la deficiencia de células madre del limbo ( región entre la córnea y la conjuntiva); es necesario el trasplante de tejido, pero el principal problema es la falta de donadores de córnea y el rechazo del tejido trasplantado.

La ingeniería tisular inicialmente utilizaba un cultivo de células madre del epitelio de la córnea tratado para posteriormente ser implantado, pero no presentaba buena adhesión celular. Con el tiempo se usaron transportadores como: gel de colágeno y gel de fibrina; pero se presentaron problemas

debido a biodegradación de los biomateriales que provocaban infección debido a que el gel de colágeno derivaba de animales.

En el año 2006 el doctor Teruo Okano director del instituto de ingeniería biomédica avanzada de la Universidad Wome's Medical de Tokio realizo una técnica en la que la reconstrucción del epitelio de la córnea se realiza, con la obtención de células madre del limbo corneal, éstas son aisladas y cultivadas a 37 °C, luego se reduce la temperatura a 20°C durante 30 minutos para poder manipularlas fácilmente.

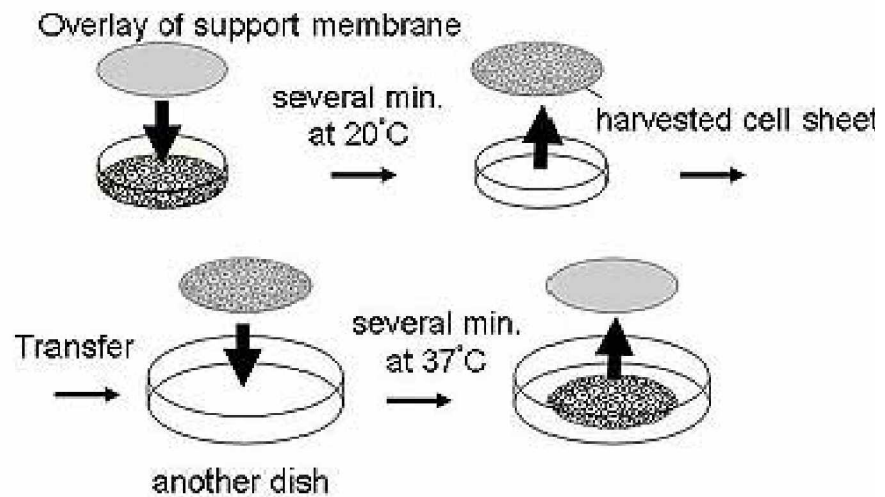


Fig. 33 Manipulación de un cultivo in vitro de tejido corneal. <sup>7</sup>

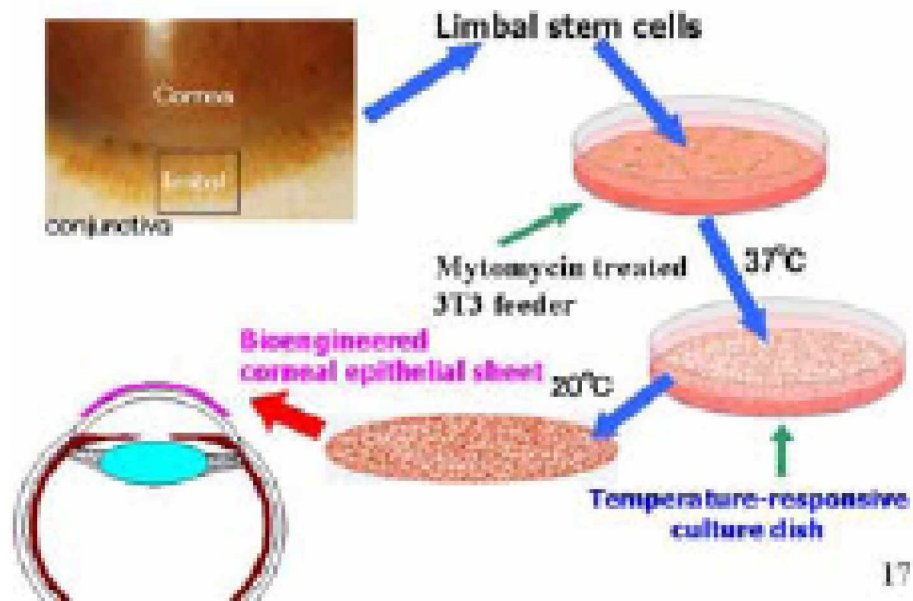


Fig. 34 Trasplante de tejido corneal cultivado in vitro.<sup>7</sup>

Luego son colocadas en una monocapa hecha de PIPAAm (poly N-isopropylacrylamida) de 20 a 30 nm. Para asegurar la fijación y polimerización de la monocapa con la muestra celular se irradia con un haz de electrones.

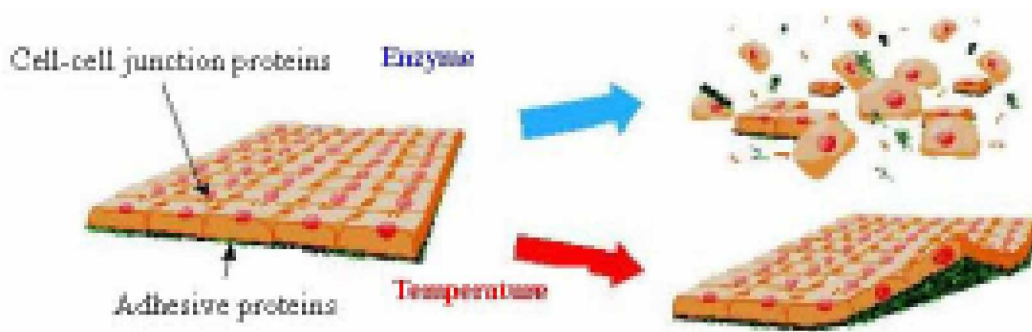


Fig. 35 Monocapa de N-isopropylacrylamida.<sup>7</sup>

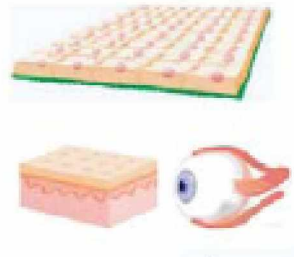


Fig. 36 Monocapa de N-isopropylacrylamida <sup>7</sup>

Posteriormente se procede a una intervención quirúrgica en donde se trasplanta la monocapa y 5 minutos después del trasplante las células madre adultas se adhieren al estroma de la córnea sin necesidad de sutura.

Es posible observar como la superficie de la córnea se mantiene clara y la agudeza visual mejora significativamente después de un año pos-cirugía en pacientes que han recibido trasplantes de células madre adultas.<sup>(7)</sup>

Múltiples investigaciones establecen que los trasplantes de células madre adultas podrían utilizarse en un futuro también en la formación de tejidos gruesos tridimensionales para producir estructuras mas resistentes en tejidos como arterias y venas. <sup>(7)</sup>

Para resolver problemas de úlceras esofágicas, se planea el uso de trasplantes endoscópicos autólogos de células madre de epitelio de la mucosa bucal colocadas en la úlcera del esófago.<sup>(7)</sup>

Otro posible uso sería el reemplazamiento de tráquea mediante un trasplante de células madre en combinación con una estructura de soporte tubular formado a partir de materiales sintéticos; en éste caso la regeneración de la parte aérea del epitelio en el lumen de las prótesis dependería de la migración de células desde posiciones vecinas de la tráquea. Se piensa que con ésta técnica se puede obtener un epitelio maduro capaz de resistir el proceso normal de respiración. <sup>(7)</sup>

## **CAPÍTULO IV**

### **APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EN ODONTOLOGÍA.**

## **CÉLULAS MADRE ADULTAS Y SU IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO CRANEOFACIAL.**

Durante el desarrollo craneofacial, la formación ósea se puede dar por dos vías; una vía de osificación intramembranosa, que se caracteriza por ocurrir a nivel embrionario durante la formación y desarrollo de la mayor parte del esqueleto craneofacial; y una vía endocondral, ésta es característica del esqueleto postcraneal, ocurre en la base del cráneo y en la articulación temporomandibular. <sup>(6)</sup>

El desarrollo y crecimiento de suturas óseas es a partir de una vía de osificación intramembranosa en donde las células óseas se originan a partir de células madre mesenquimales. El desarrollo y crecimiento del cóndilo mandibular también es una forma de crecimiento intramembranoso.

Los procesos de resorción y aposición ósea están modulados por el periostio el cual deriva de poblaciones de células madre.

## **FORMACIÓN Y ERUPCIÓN DENTAL.**

El proceso de erupción y formación dental están regulados en su mayor parte por el ligando del factor nuclear kappa (RANKL) , el cual esta localizado en los osteoblastos, células del estroma de la médula ósea y en tejidos periodontales. En el año 2001 Shiotani y colaboradores localizaron a la molécula RANKL expresada en los osteoblastos del tejido periodontal, durante la erupción dental y el movimiento ortodóntico, debido a que en dichos procesos la compresión y retracción del periodonto estimula la proliferación y diferenciación de las células madre. <sup>(6)</sup>

Lo anterior indica que en un medio de cultivo de osteocitos se puede estimular la proliferación de las células madre mesenquimales y su diferenciación a osteoblastos; esto podría ser útil en un futuro para regenerar

zonas con resorción ósea provocada por tratamientos ortodónticos o bien por consecuencia de una enfermedad periodontal.

## **REGENERACIÓN DENTAL CON CÉLULAS MADRE**

Diferentes estudios han encontrado que una fuente importante de células madre mesenquimales es la pulpa dental; cultivos in vitro señalan que éstas células pueden diferenciarse a por lo menos tres tipos celulares: osteoblastos, condroblastos y adipositos.<sup>(6)</sup>

En las últimas décadas, se ha investigado el potencial de las células madre adultas para formar estructuras dentales funcionales. El laboratorio Sharpe, reemplazó células mesenquimales adultas con células madre generadas de células madre no dentales en ratones con epitelio bucal embrionario; la recombinación de células madre mesenquimales y epitelio bucal estimularon la odontogénesis; éstos resultados proveen un significativo avance hacia la creación de cultivos celulares que pueden ser usados en transplante dentro de la cavidad oral adulta para regenerar tejidos dañados.<sup>(6)</sup>

Investigadores de la Universidad del sur de California han conseguido generar nuevas raíces dentales en cerdos gracias a células madre adultas procedentes de dientes humanos. El hallazgo se ha reportado en la revista Plos ONE y se piensa que en un futuro puede tener aplicaciones cónicas en cirugía dental para sustituir a los implantes de titanio.

Un equipo dirigido por el Dr. Songtao Shi recolectó células madre de la papila apical de terceros molares extraídos a 25 jóvenes de entre 18 y 20 años; primero estudiaron el comportamiento de las células in vitro en cultivos e in vivo en ratones para saber a que linajes celulares podían diferenciarse. Se considero que las células madre obtenidas de la papila apical tienen mayor potencial de diferenciación que las obtenidas de la pulpa dental. Concretamente se estableció que estas células son capaces de regenerar



todos los tejidos de la raíz dental, pues se logró obtener células formadoras de dentina, cemento y ligamento periodontal.

Una vez identificadas las células madre apropiadas para crear una nueva raíz; los investigadores reemplazaron el incisivo de un cerdo enano, con una estructura formada con el cultivo celular obtenido in vitro y un transportador celular hecho de hidroxiapatita, rellenaron el alveolo y tres meses después de haber realizado el trasplante se observó la formación de ligamento periodontal alrededor de una raíz ya remineralizada. Aunque no era tan resistente en comparación con las otras raíces del cerdo, tenía la suficiente calidad para cumplir su función; los investigadores colocaron tiempo después en el interior de la raíz artificial un endoposte y una corona de porcelana.

Según Shi en un futuro ésta técnica podría ser muy útil para eliminar a los implantes convencionales de titanio; afirma que la idea no sólo es aplicar la técnica, sino desarrollar otras nuevas técnicas en donde se demuestre el potencial terapéutico de las células madre adultas. <sup>(31)</sup>

Otro estudio realizado en Nagoya, Japón; logró la regeneración de defectos óseos de una paciente de 26 años de edad con antecedentes de periodontitis juvenil. El examen clínico mostró múltiples defectos óseos y movilidad de II y III grado.

Primero la paciente fue sometida a evaluación hematológica, posteriormente para poder extraer células madre de la sangre periférica fue preparada con un tratamiento de 10 mg/kg de factor estimulante de colonias granulocíticas de una compañía cubana, se aplicó cada 12 horas hasta un total de 4 dosis. Tres horas después de la última inyección se obtuvo litro y medio de sangre; posteriormente la sangre obtenida se concentró por sedimentación y se le agregó hidroxietilalmidón al 6 %, luego se tomó una pequeña muestra de la suspensión para realizar un recuento celular y al dar positivo con el antígeno CD34 se procedió a realizar una cirugía periodontal en donde después de

realizar un curetaje abierto se inyectó en cada zona afectada por los defectos óseos de 0.5 a 1 ml del concentrado celular.

Se siguieron las mismas indicaciones después de una cirugía periodontal habitual y a los tres meses en una toma radiográfica se mostró neoformación ósea; y a los seis meses la movilidad dental había disminuido.

Las células madre adultas pueden ser de utilidad en el tratamiento de la periodontitis, teniendo en cuenta la posibilidad de regeneración ósea que puede derivar de éste tratamiento. <sup>(33)</sup>

## **CONCLUSIONES.**

Es tema de controversia el uso terapéutico de las células madre, pues anteriormente su aplicación comprendía solo a las células madre embrionarias lo que con el avance de las investigaciones generó un debate bioético, religioso y político sobre los métodos de obtención, uso y destrucción de las mismas; pues éstas prácticas instrumentalizan, violan y desvalorizan la vida humana. Por el contrario las instituciones médicas afirman que las tecnologías resultantes de éstas investigaciones tienen un gran potencial médico.

Es por ello que con el paso del tiempo y para evitar éstos problemas éticos se han incrementado las investigaciones en torno al uso de las células madre adultas pues entre sus ventajas sobre las células madre embrionarias está su método de obtención pues se extraen del mismo o de varios pacientes adultos con su debido consentimiento y además no hay problema en que sea rechazado un injerto de células pues es de origen autólogo.

Las células madre adultas poseen un potencial de diferenciación que las hace viables para generar varios tipos de linaje celular, participan en la regeneración tisular de varios tipos de tejido. Cabe mencionar que aunque ésta nueva alternativa terapéutica promete efectivos resultados tiene limitantes que frenan su posible aplicación; siendo una de las más importantes, el alto costo que representan las investigaciones para el desarrollo de técnicas que sean capaces de mostrar las señales y factores implicados en los procesos de auto-renovación y diferenciación; sin dejar de mencionar el costo de laboratorio utilizado durante los métodos de obtención y cultivo, así como el equipo quirúrgico para su posterior trasplante experimental.

A pesar de las limitantes a las que se ha tenido que enfrentar la ingeniería celular ha sido posible aplicarla en procedimientos regenerativos de varios

tejidos u órganos humanos y en animales de manera exitosa, por ésta razón es importante continuar con los estudios e investigaciones con el fin de ampliar el conocimiento acerca de la biología básica y propiedades de las células madre adultas para comprender mejor su plasticidad y el efecto de la misma en la regeneración tisular.

En la actualidad el tratamiento con células madre se considera uno de los grandes avances de la medicina. En odontología se espera que la ingeniería de células madre adultas brinde una nueva alternativa terapéutica; y que el odontólogo este informado de la existencia de nuevas técnicas con las que se puede lograr la rehabilitación de pacientes con perdida tisular importante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Langman, **Embriología Médica con orientación clínica**, 10ª edición Buenos Aires 2007. Editorial. Panamericana.
2. Thompson & Thompson, Robert Nussbaum. **Genética en medicina**. 5ª edición Barcelona España 2004.
3. George Morstyn and William Sheridan. **Cell Terapy. Stem Cell Transplantation, Gene Terapy and Cellular Inmunotherapy**, 1996 Cambridge University Press, USA. 1996.
4. [www.ugr.es/~eianez/biotecnología/clonembrion.htm](http://www.ugr.es/~eianez/biotecnología/clonembrion.htm). **Células madre: conceptos básicos**.
5. German F. Falke, Anthony Atala, **Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular**. Laboratory for tissue engeneering and cellular therapeutics, Department of Urology Childrens Hospital, Harvard Medical School. Argentina año 2000.
6. Juan Carlos Munéver Niño. **Aspectos celulares y moleculares de las células madre involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica**. Volumen 46 N°. 3, Colombia , fecha de publicación 08/0582007.
7. Cultivos e Ingeniería Celular. **Ingeniería celular**. Año 20006
8. [www.ideasrapidas.org/célulasmadre.htm](http://www.ideasrapidas.org/célulasmadre.htm)
9. Juan Carlos Munéver Niño. **Biología de las Células Stem**. Instituto Unidad de Investigación Básica Oral. Aceptado 09-05-2005.
10. Luis Martínez Lostao. **STAT 1 en la apoptosis inducida por fludarabina e inhibidores de Jak kinasas en las células de LLC-B. Papel de las células adherentes en la apoptosis inducida por fludarabina**. Universidad Autónoma de Barcelona, Diciembre del 2004.

11. Eduardo T. Cánepa. **Proliferación o quiescencia: Una difícil decisión celular**. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires Argentina 19-04-2007.
12. [www.genecards.org/cgi-bin/cardisp.pl](http://www.genecards.org/cgi-bin/cardisp.pl)
13. [es.wikipedia.org/wiki/ingeniería de tejidos](http://es.wikipedia.org/wiki/ingeniería_de_tejidos)
14. [www.ecojoven.com.uno/os/célulasm.html](http://www.ecojoven.com.uno/os/célulasm.html)
15. Agustín G. Zapata. **Bioética e Investigación con células troncales**. Universidad Complutense de Madrid 2003.
16. [www.embrios.org/célulasmadre/medicina\\_reparadora.htm](http://www.embrios.org/célulasmadre/medicina_reparadora.htm)
17. [es.wikipedia.org/wiki/célula\\_madre](http://es.wikipedia.org/wiki/célula_madre)
18. [www.criocelt.com](http://www.criocelt.com). **Células madre embrionales**.
19. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2005. **Células madre embrionarias**.
20. Leticia Santos, MC. Dra. en C. **Vía de señalización Notch, nuevas estrategias para tratamiento de cáncer**. División de Biología Molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. A.C. Volumen 48, N°2.
21. [www.medigraphic.artemisa](http://www.medigraphic.artemisa). **Vía de señalización Notch**.
22. Víctor M. Arce. **Receptores asociados a Tirosina/Quinasa**. Año de aceptación 2005.
23. [www.cbm.uam.es/cmurga/presentaciones/wnt2.pdf](http://www.cbm.uam.es/cmurga/presentaciones/wnt2.pdf). **Vía de señalización wnt**.
24. Claudia Mera Reina, Angélica Roa Lara. **Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto renovación**. Revista Ciencias de la Salud, año/ volumen 5. N° 1. Colombia.
25. Cesar Rodas Mazariegos. **Médula ósea roja**. España 2004.
26. [es.wikipedia.org/wiki/núcleo\\_celular](http://es.wikipedia.org/wiki/núcleo_celular).40. **Organización celular básica**.
27. Ainhoa Iriberrí. **Huérfanos de células madre**. Madrid 2007.
28. Stem Cell Research. **Informe Donaldson**. Estados Unidos 2001.

29. Marc Hedrick. **Tissue Engineering. Células madre adultas contra las células madre embrionarias.** (UCLA) Abril 2001.
30. Peter Uher, Petra Baborova. **Methodological Aspects of Attempts to Transdifferentiate Adult Stem Cells Into Embryonic-like Cells in vitro.** Biomed Publicación Médica Facultad Palacky Olomouc. República Checa 2008.
31. **Regeneración dental con células madre.** Universidad del sur de California. Año 2007.
32. Dra. Amparo Pérez Borrego. Colaboradores. **Utilización de células madre en los defectos óseos en la periodontitis juvenil.** Presentación de un caso. Año 2000.
33. es.wikipedia.org/wiki/genomahumano/ortodoncia/célulasmadre.
34. [www.ugr.es/eianez/inmuno/cap-14](http://www.ugr.es/eianez/inmuno/cap-14). **Generalidades de las Citoquinas.**
35. <http://mammary.nih.gov/reviews/gene-expresión>
36. <http://imagenes.google.com.mx>
37. <http://www.biomedcentral.com/>
38. <http://www.cstj.co.jp/reference/pathway/images/hedgehog>.