



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

APLICACIONES ODONTOLÓGICAS DE CÉLULAS
MADRE DE LA PULPA DENTAL.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

CYNTHIA KAREN RUIZ RIVERA

TUTOR: Mtro. JUAN CARLOS CUEVAS GONZÁLEZ

ASESORA: Esp. LUZ DEL CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

2013



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Mamá y a Papá:

Por **amarme y apoyarme**, en cada etapa de mi vida, porque gracias a su confianza depositada, mi sueño está hecho realidad.

Gracias, por enseñarme los grandes valores de la vida, por ser mis amigos y maestros. Te agradezco **MAMÁ**, por soportar conmigo cada desvelo que provocó la Universidad y por alentarme cada mañana a seguir adelante.

GRACIAS PAPÁ, por corregirme en cada error, por darme las herramientas más grandes, la persistencia y constancia. Este logro, en especial es para ustedes, el más grande hasta el momento: la culminación de mi carrera profesional.

A mis hermanos:

Por brindarme su **incondicional amor**, comprensión y porque a pesar de todo aún seguimos juntos en la batalla. Agradezco el tener una integrante más en la familia, que me ha brindado su total confianza.



A mis amigos

Y esa **persona que hoy ocupa mi mente y mi vida, que me**
mostró el verdadero valor del amor. A mis amigos por darme las
palabras de aliento, cuando pensaba que las salidas se cerraban. Por
enseñarme a **reír, a soñar, a disfrutar.** Sin duda fue la etapa más bella, el
haberla pasado junto a ustedes y aprender algo nuevo todos
días. Gracias por su apoyo constante y por
su amistad y cariño inmesurable.

A mi Tutor y Asesora:

Por iniciarme en su arte con gran apoyo incondicional y por hacer de la
tesis una experiencia nueva y única.

A mi Universidad:

Por haberme mostrado nuevos enfoques de la vida, por enseñarme
el valor de aprender y por abrirme las puertas de su **sabiduría**



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	8
GENERALIDADES	10
Capítulo I	19
1. La célula	19
1.1. Antecedentes históricos	20
1.2. Tipos de células.....	23
1.2.1. Las células procariontes	23
1.2.2. Células eucariontes	27
1.3. Características fisiológicas de la célula	29
1.4. Organización, estructura y funciones de la célula	29
1.4.1. Núcleo	30
1.4.2. Citoesqueleto	31
1.4.3. Citoplasma	32
1.4.4. Ribosomas.....	33
1.4.5. Retículo endoplásmico rugoso (RER)	34
1.4.6. Retículo endoplásmico liso (REL)	35
1.4.7. Aparato de Golgi	36
1.4.8. Lisosomas.....	37
1.4.9. Peroxisomas	38
1.4.10. Mitocondrias.....	39
1.5. Ciclo celular.....	40
1.6. División celular.....	41
1.6.1. Interfase	41
1.6.1.1. Fase G ₁	42
1.6.1.2. Fase S.....	42
1.6.1.3. Fase G ₂	43



1.6.2.	Mitosis.....	43
1.6.2.1.	Profase	44
1.6.2.2.	Prometáfase	44
1.6.2.3.	Metafase	44
1.6.2.4.	Anafase.....	45
1.6.2.5.	Telofase	45
1.7.	Apoptosis	46
Capítulo II	48
2. Las células madre	48
2.1.	Antecedentes históricos	48
2.2.	Definición de la células madre	50
2.3.	Clasificación	50
2.3.1.	Tipos de células madre según su potencialidad	51
2.3.2.	Tipos de células según su origen.....	51
2.3.2.1.	Células madre embrionarias	51
2.3.2.1.1.	Aplicaciones generales de las células madre embrionarias	52
2.3.2.2.	Células madre de tejidos adultos.....	55
2.3.2.2.1.	Células mesenquimales	56
2.4.	Las células madre de la pulpa dental	58
2.4.1.	Pulpa dental	58
2.4.2.	Aplicaciones de odontológicas de células madre de la pulpa dental ...	60
2.4.2.1.	Factores de crecimiento para la regeneración en odontología	61
2.4.2.2.	Regeneración de tejido pulpar mediante células madre de la pulpa dental.....	63
2.5.	Dentina.....	63
2.5.1.	Dentinogénesis.....	64
2.5.2.	Regeneración de dentina mediante células madre de la pulpa dental	65



2.6.	Esmalte.....	67
2.6.1.	Amelogénesis	68
2.6.2.	Regeneración del esmalte mediante células madre de la pulpa dental.....	69
2.7.	Ligamento periodontal	69
2.7.1.	Regeneración de ligamento periodontal mediante células madre de la pulpa dental	70
2.8.	Cemento radicular	72
2.8.1.	Regeneración de cemento radicular mediante células madre de la pulpa dental	72
2.9.	Hueso alveolar	73
2.9.1.	Osteogénesis del hueso alveolar	73
2.9.2.	Regeneración de hueso alveolar mediante células madre de la pulpa dental.....	75
2.10.	Regeneración de un diente completo mediante células madre de la pulpa dental	76
	Capítulo III.....	78
3.	Aislamiento y criopreservación.....	78
3.1.	Definición de criopreservación	78
3.2.	Antecedentes históricos de aislamiento y criopreservación	79
3.3.	Generalidades de aislamiento y criopreservación.....	80
3.3.1.	Agentes crioprotectores	82
3.3.2.	Métodos de criopreservación	82
3.4.	Bancos de criopreservación	83
3.4.1.	Banco de ovocitos	83
3.4.2.	Banco de espermatozoides	83
3.4.3.	Banco de células madre de la pulpa dental	84
3.4.3.1.	Guía de extracción	84
3.4.3.2.	Guía de empaquetamiento	86



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



3.4.3.3. Leche entera pasteurizada como medio de transporte.....	87
3.5. Criopreservación de las células madre de la pulpa dental	87
3.6. Limitantes y dificultades para la criopreservación	93
3.6.1. Criopreservación de ovocitos.....	93
3.6.2. Congelación de espermatozoides	94
3.6.3. Congelación de embriones.....	94
3.6.4. Inconvenientes en células madre en la pulpa dental	95
CONCLUSIONES.....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99



INTRODUCCIÓN

Anteriormente la ciencia sólo se basaba en la observación y se sabía que el hombre estaba formado por fragmentos muy pequeños que componían un todo, pero no se conocían, por falta de avances técnicos y científicos. Años después con la entrada de grandes avances científicos y la llegada del microscopio, observaron que la célula constituye la unidad estructural y funcional básica que compone a los seres vivos, que no hay unidad de vida autónoma más diminuta que la célula y una célula proviene de otra. Sin duda alguna el pensamiento científico ha ido creciendo en el ámbito de la salud, por tanto el regenerar un tejido puede ser la gran incógnita que se ha ido resolviendo al paso de los años. Pero hoy en día, se han descubierto por numerosas investigaciones y extenuantes experimentaciones con ayuda de la bioingeniería, las características y cualidades que poseen células madre (CM). Éstas se encuentran en todos los organismos multicelulares, tienen la capacidad de autorrenovarse, proliferarse y diferenciarse, a su vez se clasifican según su potencial, para formar células especializadas como totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales, por su estado evolutivo en embrionarias y adultas, también llamadas postnatales. Las células de la pulpa dental derivan de las células que poseen un potencial de multidiferenciación y pertenecen al grupo de las CM adultas con capacidad osteodontogénica, adipogénica y neurogénica.



El campo odontológico ha buscado, no sólo la rehabilitación funcional, estética y artificial, sino busca la regeneración autóloga de los tejidos dentales. Hoy en día disponemos de nuevos tratamientos basados en las células madre de la pulpa dental (CMPD) que serán investigados a profundidad, para ser utilizados en un futuro prometedor, ya que las CM de la pulpa dental presentan propiedades inmunes de supresión muy similares a las de las CM mesenquimatosas, por tanto son capaces de estimular nueva formación de tejido óseo, tejido periodontal y de la misma pulpa dental. Fueron las primeras CM dentarias que se criopreservaron, ya que se consideró que había una comunidad de células multipotenciales en tejido dental de dientes adultos, posteriormente se empezó a relacionar con estudios endoteliales y vasculares, pero fue después de su aislamiento que se determinaron sus características. Actualmente se han estudiado sobre todo las CM de la pulpa dental de los terceros molares, dientes primarios y dientes supernumerarios. Tales células tienen gran capacidad de diferenciarse y su interacción con biomateriales las hace ideales para su regeneración tisular. Existe una gran desventaja de estas células, ya que pierden sus propiedades multipotenciales y regenerativas en su expansión *in vitro*, esto se refiere que el experimento se realizará en un ambiente controlado fuera de un organismo.

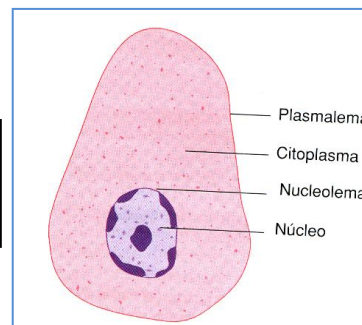
Mediante arduas investigaciones y experimentos se ha alcanzado la regeneración de distintos tejidos pertenecientes a la cavidad bucal, como la pulpa, la dentina y el hueso alveolar, mediante la multiplicación de las células, la agregación de marcadores de diferenciación y un ambiente propicio para su desarrollo.



GENERALIDADES

Las células son las unidades básicas de las que están compuestos los seres vivos, son tan pequeñas que no se pueden ver a simple vista, es por eso que su estudio y conocimiento han ido unidos al invento y desarrollo del microscopio. La aparición de éste permitió el estudio de las primeras células y desde hace algunas décadas se dispone de potentes microscopios electrónicos, que permite gran número de aumentos y una observación detallada de los organismos. Hoy en día sabemos que la mayoría de los organismos que existen, son células o están compuestos en cantidades variables que pueden disponer billones de ellas los organismos más complejos. Cada célula puede ser diferente y en tamaños variables, sin embargo todas las células contienen los mismos elementos y procesos celulares. Todas estas células de las que estamos constituidos forman la mayoría de los seres vivos y están formados por tres elementos básicos ^(Figura: 1), que son el núcleo, citoplasma y membrana. 1, 2.

Figura: 1. Esquema de la célula. ¹



Sin embargo no fue suficiente el uso de instrumentos o técnicas que permitieran observar cada fenómeno y cada estructura para poder explicarlos y entenderlos, sino fue necesario contar con marcos conceptuales para poder



interpretarlos. Es el momento cuando nace el planteamiento de la teoría celular, casi a mediados del siglo XIX Schlden desarrolla la teoría celular para el reino vegetal y Schwann para el reino animal y describe que es un reconocimiento de que la célula es el elemento fundamental del organismo, al que se deben trasladar todos los procesos vitales y tanto las plantas como los animales son agrupaciones de estas unidades vivas potencialmente independientes. Su mayor logro fue idear y publicar una teoría coherente de las células. Hoy en día se aceptan cuatro proposiciones fundamentales: a) todos los organismos están compuestos por células; b) en ellas tiene lugar las reacciones metabólicas del organismo; c) las células provienen de otras células preexistentes; d) las células contienen el material hereditario.^{3, 2}

Actualmente existen 4 millones de especies diferentes y existen dos grupos celulares: los procariontes y los eucariontes, la característica más importante para darle nombre a estos dos grupos, fue la presencia o no de núcleo. Los eucariontes (del griego *eu*, verdadero y *karyon*, núcleo) tienen su material genético encerrado en una envoltura o doble bicapa de fosfolípidos, mientras que los procariontes (*pro*, antes) lo tienen en el citoplasma. El nombre sugiere que los procariontes son los más antiguos en el planeta. Carl Woese infirió la existencia de tres grandes divisiones o dominios en las que se podían agrupar todas las especies biológicas. Los dominios bacteria y Archaea incluyen a todos los procariontes y el dominio Eukarya agrupa a los protistas, hongos, las plantas, también a los animales y éstas se diferencian principalmente por su estructura. Todas estas células tienen gran importancia para nuestro planeta, a pesar de que algunos son patógenos para el ser humano, la mayoría son



indispensables para el desarrollo de la vida en la Tierra, ya que casi todos los gases de la atmósfera son subproductos del metabolismo de los procariontes. Las células eucariontes como hemos mencionado antes, pertenecen al grupo Eukarya, las cuales contienen compartimentos donde se desarrollan diversas funciones, como el núcleo, mitocondria, cloroplasto, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas y lisosomas, así como también componentes muy organizados como el citoesqueleto. Además tienen la capacidad de dividirse por mitosis, éstas presentan DNA en el núcleo ^(Figura 2), sin embargo el DNA es similar al de las procariontes. ^{2,3}

El núcleo es el que contiene la mayoría del genoma en eucariontes y partir de ahí se expresan los genes, los ribosomas forman las proteínas a partir del mRNA, estas se pueden sintetizar en los ribosomas libres o en el retículo endoplásmico rugoso, que es el lugar de plegamiento, en cambio en el retículo endoplásmico liso se sintetizan casi todos los lípidos necesarios para la formación de membranas, a su vez, en el aparato de Golgi se reciben las proteínas provenientes del retículo endoplásmico, terminando su procesamiento. Los lisosomas provienen del aparato de Golgi e intervienen en la digestión celular de sustancias tomadas del exterior, así como también la eliminación de organelos que la célula tiene que desechar, los peroxisomas tienen diferentes funciones, como la degradación de lípidos o la síntesis de proteínas y la mitocondria que es el centro metabólico por excelencia. ^{(Figura:}

^{2)2,3}

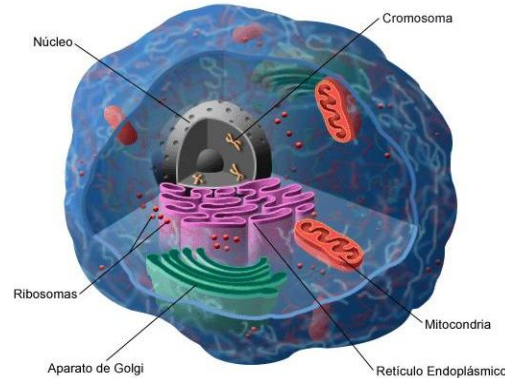


Figura: 2. Anatomía de la célula.⁴

“En general, el material genético de los cromosomas, se encuentra organizado en secuencias de nucleótidos llamadas genes. Los genes portan información esencial para el funcionamiento de la célula y por tanto, deben distribuirse en forma equitativa entre las células hijas”.⁵

Las células que se dividen pasan a través de una secuencia constante, regular y repetitiva de crecimiento y división, llamada ciclo celular, el cual se divide en tres fases, que es la G_1 - S - G_2 y M . Nos basaremos en la división celular de los eucariontes ya que constituyen las células de nuestro organismo, y tienen una división más compleja de pasos llamada mitosis, en donde un conjunto completo de cromosomas es asignado a cada uno de los dos núcleos hijos⁴. Es de gran importancia la división celular, como sabemos, la CM puede dar lugar a células hijas, es aquí cuando aparece su valor. Después de varias investigaciones y años de arduo trabajo, comprendieron que estas células se distinguían por poseer capacidades y características diferentes, a las que hoy en día conocemos y llamamos **células madre**.^{(Figura: 3) 5}

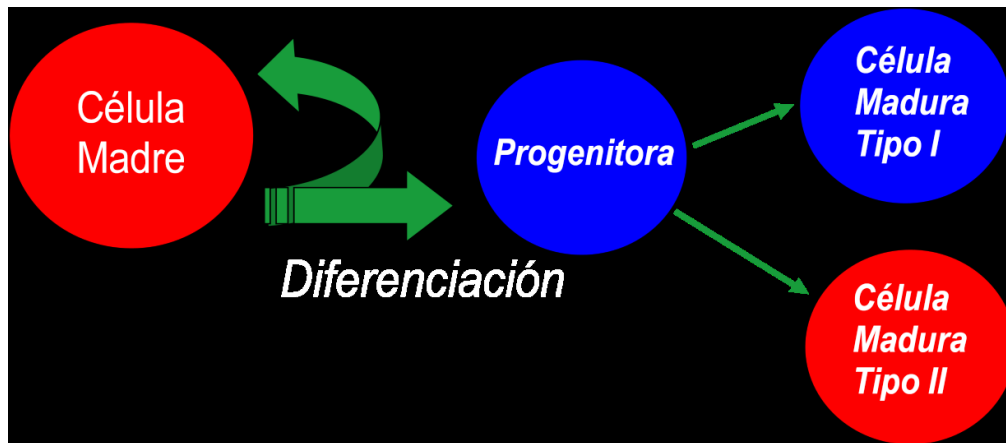


Figura 3: Esquema de la diferenciación.⁶

Durante siglos el hombre ha tratado de comprender la capacidad del cuerpo para reparar o reemplazar las células y tejidos del organismo. Por tal motivo, ha enfocado su máxima atención tanto a comprender como a analizar los mecanismos de reparación y regeneración tisular, profundizando su investigación en las CM. Éstas son células que se encuentran en todos los organismos y que tienen la capacidad de dividirse a través de la mitosis, a su vez diferenciarse y autorrenovarse en varios tipos de células especializadas, lo cual se le denomina plasticidad.^{7,8}

Éstas se clasifican por su potencial de diferenciación, para formar células especializadas en totipotenciales ya que son capaces de generar cualquier célula del organismo, tanto somáticas como germinales. Las CM pluripotenciales son capaces de generar diferentes tejidos o células pertenecientes a diferentes tejidos de las tres capas germinativas y las células

multipotenciales, aunque son capaces de generar distintos tipos celulares su capacidad es menor y en un principio sólo son capaces de generar tejidos derivados de la misma lámina embrionaria. De igual manera pueden clasificarse según por su estado evolutivo en embrionarias y adultas, también llamadas postnatales.^{10, 8, 9}

Las CM de la cavidad bucal, como las de pulpa dental, poseen un potencial de multidiferenciación, que pertenecen al grupo de células adultas o postnatales con capacidad osteoontogénica, adipogénica y neurogénica, estas son células indiferenciadas en un tejido u órgano y pueden renovarse y diferenciarse en tipos de células especializadas (Figura: 4), jugando un papel muy importante en la reparación de tejidos.⁶

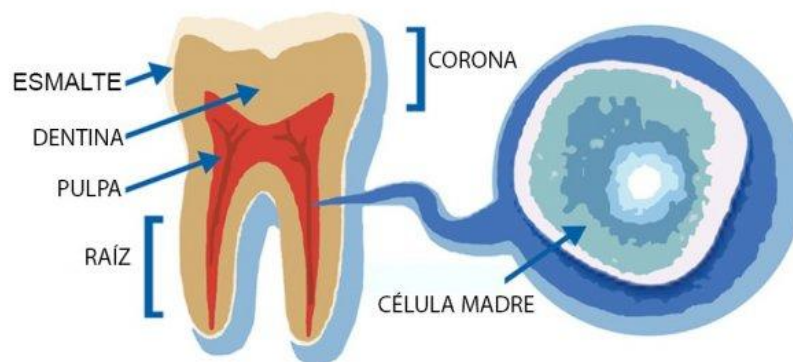


Figura 4: Células madre en pulpa dental.¹¹

Para entender mejor la formación de los tejidos dentales por medio de las CM, tenemos que entender la odontogénesis del órgano dental, y las capas que



formarán las piezas dentarias que son, el epitelio ectodérmico que dará origen al esmalte y ectomesénquima. A su vez originará al complejo pulpo-dentinario, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. La odontogénesis es inducida por el ectomesénquima, estimula al epitelio bucal que reviste al estomodeo. Esta inducción está mediada por agentes químicos que actúan en distintas fases de la odontogénesis.¹²

En este proceso vamos a distinguir dos fases, la morfogénesis o morfodiferenciación, que consiste en el desarrollo de los elementos coronarios y radiculares, así como el desplazamiento y organización de poblaciones celulares, epiteliales y mesenquimatosas. La segunda fase que es la histogénesis o citodiferenciación que da origen a varios tipos de tejidos dentarios, que son el esmalte, la dentina y patrones de la pulpa previamente formados.^{12, 13}

La pulpa es tejido conectivo vascular, el cual está rodeado de dentina y contiene una población heterogénea de células, entre ellas: los fibroblastos, odontoblastos, células sanguíneas, células de Schwann, células endoteliales, mesenquimatosas indiferenciadas. Las células madre de la pulpa dental se encuentran en dos zonas, la pulpa dental propiamente dicha y en la zona rica de células.⁶ Estudios clínicos, muestran la habilidad de las células pulpares a diferenciarse en odontoblastos para reparar daños a la dentina. Además de que la mayoría de las células corresponden a las mesenquimatosas y fibroblastos, éstas son capaces de crecer en cajas de cultivo, siendo utilizadas para estudiar la diferenciación de las células pulpares.^{6,9,7}



Las características *in vitro* más importantes de las Células Madre de la pulpa dental (CMPD), es que tienen multipotencialidad con capacidad osteodentinogénica, adipogénica, neurogénica, condrogénica y miogénica. Las *in vivo* (*entiéndase como in vivo* a “lo que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo) se caracterizan por la formación de tejido ectópico, complejo dentino-pulpar, células similares a los odontoblastos y tejido de origen similar. Las CM de los dientes deciduos exfoliados (CMDED) tienen excelentes propiedades y sus capacidades *in vitro* poseen multipotencialidad con capacidad dentinogénica, adipogénica, neurogénica, condrogénica y de osteoinducción. Las técnicas *in vivo* tienen capacidad de formación de tejido ectópico, tejido similar al dentino-pulpar, células similares a los odontoblastos y posible formación ósea.^{6, 14}

Por tanto creando un medio idóneo se puede inducir a las células madre pulpares a diferenciarse en células de tipo odontoblastos, osteoblastos, cementoblastos y generar un complejo dentino-pulpar. Estas residen en la periferia de la microvasculatura pulpar favoreciendo la angiogénesis y homeóstasis de los vasos sanguíneos. El origen de la dentina guarda relación con la creación de la pulpa ya que a partir de las CMPD ésta genera dentina reparativa y a su vez propiamente dentina. La capacidad de la pulpa dental para formar dentina reparadora *in vivo*, nos permite asumir que la pulpa dental puede contener células progenitoras. Por otra parte, el esmalte por no contener células no es capaz de regenerarse y cualquier deterioro que sufra es irreversible para su reparación, sin embargo, se ha diseñado un esmalte que imita la formación de los prismas dando la apariencia a esmalte natural, la



diferencia es que es más resistente y contiene flúor, estos prismas ya no son compuestos de hidroxiapatita sino son diseñados como nanopatitas por la bioingeniería. Esto es un gran avance para la ciencia en odontología, pero aún faltan más investigaciones para saber más a detalle, las características y funciones de estos elementos creados para tener resultados satisfactorios y seguros para la aplicación en humanos. Las CMPD han demostrado su potencial de regeneración de los tejidos humanos dentales *in vivo*, por medio de atenuantes investigaciones a lo largo de estas décadas el cultivar, regular la supervivencia, diferenciación y proliferación *in vitro e in vivo* de éstas células, es un campo abierto de investigación para la ciencia, sin embargo la extracción de las CM es simple, pueden aislarse y ser criopreservadas de manera óptima para ser guardadas en bancos y utilizadas en clínica.^{7,6}

Las CMPD fueron inicialmente identificadas en el año 2000 por Gronthos y cols., basándose en sus rasgos de formar colonias únicas de cultivo. Gracias ya a varios estudios sabemos que las células madre son de gran importancia en el estudio de la regeneración tisular, ya que tiene varios beneficios en el ámbito odontológico, tanto en la reparación de tejido dental como es el ligamento periodontal, óseo y posiblemente en algunos años incluso la regeneración de un órgano dental completo.^{6,7,15}



Capítulo I

1. La célula

Todo ser humano está hecho de huesos, músculos, nervios, venas, arterias y sangre, todo esto a su vez está compuesto de la unidad básica de la que están formados la mayor parte de los seres vivos, son tan pequeñas que no se pueden ver a simple vista, es por eso que su conocimiento nos ha llevado ahora a investigar, crecer e ir avanzando en este mundo de la ciencia. El ser humano está compuesto por células y éstas son las unidades vivientes más pequeñas, capaces de tener una existencia independiente, ya que llevan a cabo los procesos vitales de absorción, asimilación, respiración, excitabilidad, conductividad, crecimiento, reproducción y excreción. Todas ellas varían en su tamaño, forma y función, pero independientemente de todo ello comparten características comunes con otras células, ^(Figura: 1.1) como es citoplasma y el núcleo.¹³

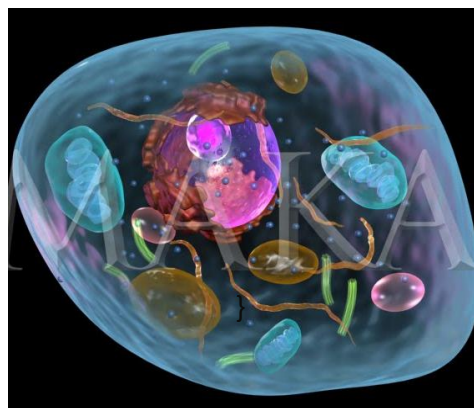


Figura 1.1: La célula.¹⁷



1.1. Antecedentes históricos

Por naturaleza el hombre se basa en la observación y siempre se ha planteado conceptos y teorías que van creando un conocimiento, el deseo de irlo incrementando lo llevó al descubrimiento del microscopio a mediados del siglo XVII y así conquistó un mundo que era inaccesible para el ojo humano. Fue entonces cuando Robert Hook en 1665 descubre que el tejido vegetal está compuesto por pequeñas cámaras, descritas en su libro *"Microscopia"*, en donde muestra imágenes de celdas de corcho, el cual notó que era poroso y esos poros en su conjunto formaban cavidades poco profundas a modo de cajas que llamó *"células"*. Hook sólo observó células muertas pero poco tiempo después Marcelo Malpighi, anatomista italiano observó células vivas y fue el primero en estudiar tejidos vivos al microscopio. Tiempo después un renombrado fabricante de microscopios llamado Anton Van Leeuwenhoek construyó uno de los mejores microscopios de la época ^(Figura: 1.2), gracias a ello fue el primero en observar y dibujar una célula viva, también descubrió diferentes tipos de células como los protozoarios, espermatozoides y bacterias. ^{3, 2}

Figura: 1.2 Microscopio de Anton Van Leeuwenhoek.¹⁷





Las estructuras celulares observadas principalmente en las plantas, revelaban la existencia de pequeñas vesículas y elementos sólidos que las rodeaban (las paredes celulares), pero estas estructuras las veían sólo como un componente más de la planta. Se discutía el modo de cómo se formaban pero nadie dio una propuesta aceptable. En el siglo XVIII las observaciones botánicas eran muy conocidas, pero no tenían un estudio serio. La microscopía animal se enfrentaba a problemas más serios, ya que los tejidos vegetales y animales eran más difíciles de manipular y observar. Tiempo después se despertó el interés por la anatomía microscópica vegetal y fue cuando Charles Brisseau-Mirbel declaró que las células se encontraban en cualquier parte del organismo y especuló la forma en que se producían. Aunque todos sabían que las plantas estaban compuestas por células, describían sus formas y componentes (por ejemplo Antón Van Leewenhoeck, descubrió el núcleo y nombrado tiempo después por R. Brown), nadie estaba seguro que podía ser una célula. Concretamente, en 1839 Theodor Schwann y Mathias Jakob Schleiden fueron los primeros en lanzar la teoría celular, que surge aún cuando no se contaban con instrumentos o técnicas que permitieran observar las estructuras o fenómenos vivos para poder entenderlos y explicarlos, también fue necesario contar con marcos conceptuales que permitieran interpretarlos y ésta se define como “La teoría celular” que puede resumirse en que la célula constituye la unidad estructural y funcional básica que compone los seres vivos, no hay unidad de vida autónoma más pequeña que la célula y una célula proviene de otra. Su logro fue idear y publicar una teoría coherente de las células. Hablando de la continuidad de las células por medio de su división y



que era la unidad metabólica fundamental, aún cuando en ese momento no se conocía muy bien el funcionamiento metabólico de ella.^{3, 2}

Hacia 1860 había varios investigadores que se dedicaban a observar casos de formación celular por medio del análisis de la división celular de las ya preexistentes.²

Esto a su vez combinado con el gran avance de los estudios embrionarios, permitió comprender que la continuidad de la vida podría interpretarse como divisiones celulares a gran escala. De este modo, la célula fue vista como la unidad estructural y funcional de todos los seres vivos y que era común en todos ellos.³

En 1875 se declaró que la célula poseía un núcleo, el cual contenía estructuras especializadas y que contenía una sustancia con gran complejidad física y química. De ahí las investigaciones sobre la célula siguieron creciendo. Años después Rudolph Virchow aplicó la teoría celular en la patología. Ya que él consideraba la enfermedad como un trastorno metabólico y eso lo llevó a plantear que la célula tendría que ser la unidad organizada más pequeña y probablemente incompresible de la actividad fisiológica. Virchow agregó el aforismo "*ovnis cellula e cellula*", que indica que una célula proviene de otra preexistente. Esto hecho y aunado a los experimentos de Pasteur, llevaron a desacreditar la generación espontánea en el pensamiento biológico. La teoría celular iluminó todos los campos de la investigación biológica y estableció que cada célula se forma de la división de otra célula, a este proceso se le conoció



como mitosis. Se reconoció que el individuo es el resultado de las actividades, funciones e interacciones de las células y por medio de esta teoría, se desarrolló la investigación biológica, permitiendo conocer más acerca de la diferenciación, organización y desarrollo de los organismos a partir de la célula. Actualmente se sigue tomando en cuenta la teoría celular y sus cuatro proposiciones fundamentales que son, que todos los organismos están compuestos por células, que donde tienen lugar las reacciones metabólicas del organismo, que las células provienen de otras células preexistentes y por último que las células contienen material hereditario.^{13, 2}

Hoy en día la célula la definimos como la unidad estructural y funcional de los organismos, por lo tanto la unidad fundamental de la vida.¹⁷

1.2. Tipos de células

Hay distintos tipos de células pero se pueden agrupar en dos tipos celulares que son procariontes y eucariontes. Es decir que de acuerdo al DNA que se encuentra en el citoplasma o contenido por una doble membrana se distinguen las células eucariontes y procariontes. La característica que se tomó en cuenta para darle nombre fue la ausencia o presencia de núcleo.²

1.2.1. Las células procariontes

Éstas son las más antiguas en el planeta, son células anucleadas (gr. *Protos*, primero), incluyen las bacterias y las cianobacterias, que son células primitivas

y a partir de ellas evolucionaron las eucariontes. Las procariontes nunca llegaron a alcanzar la complejidad y el tamaño de los eucariontes, quedaron en dimensiones muy pequeñas, por tanto se nutren básicamente por absorción de material, sin embargo, poseen ciertas ventajas. (Figura: 1.3-1.4)

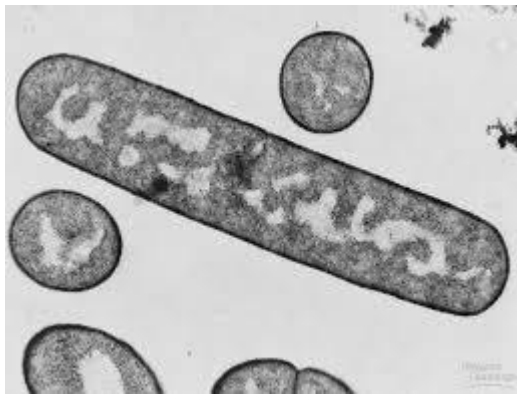


Figura 1.3 Vista microscópica de una célula procarionte¹⁹

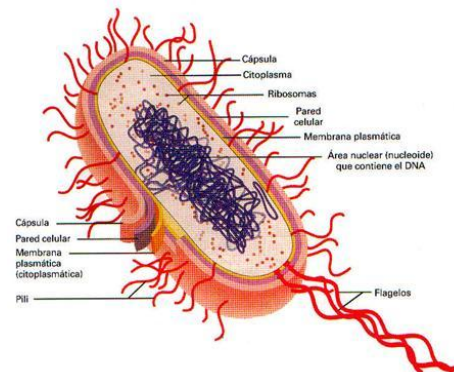


Figura 1.4 Esquema de una célula procarionte.¹⁹

Generalmente se reproducen por fisión o por otros mecanismos muy sencillos. Son células unicelulares y su material genético, no se encuentra rodeado de membrana.²

Las procariontes se encuentran en el dominio Bacteria y Archaea. El dominio de la Bacteria constituye la mayor parte de los seres vivos de nuestro planeta, habitando desde el suelo hasta en ambientes acuáticos, realizando diversas funciones, afectando la salud de varias especies, incluyendo al ser humano. La Archaea, conocidas también como arqueobacterias, comprenden un grupo que sólo habita en ambientes de temperatura elevada o salinidad extremas. En estos grupos se encuentran varios subgrupos que se distinguen



por el ambiente en que se encuentran mejor adaptados y se desarrollan, en algunos de estos lugares se encuentra oxígeno abundante, por tal razón el metabolismo de estos microorganismos es aerobio y otros están prácticamente privados de oxígeno, por lo tanto su metabolismo es anaerobio, así que los organismo anaerobios estrictos mueren en presencia de esta molécula.^{2, 18}

Todas las procariontes tienen una estructura más simple y carece de orgánulos rodeados por membrana, su traducción y transcripción se presentan directamente acopladas en el citoplasma porque su DNA no está encerrado en su núcleo, por otra parte la mayoría de estas células usa su membrana citoplasmática para generar energía y contiene genomas compactos y pequeños que están constituidos por DNA circular.¹⁷

Las características más significativas de estas células, además de que carecen de envoltura nuclear, es que su ADN está asociado con las proteínas histonas, normalmente tiene una cadena larga de ADN, aunque puede tener hasta cuatro cadenas idénticas, también poseen genes que contienen plásmidos y genes que son importantes para la bacteria. Presentan organelos membranosos y muchas de ellas pueden presentar membranas internas que desempeñan funciones como la fotosíntesis. Estas células no presentan citoesqueleto, su reproducción se basa principalmente por bipartición; la célula primero duplica su material genético haploide, después aumenta de tamaño para finalmente aparecer un tabique que divide en dos, otra manera de reproducción es por fenómenos de sexualidad, ya que intercambian su



material genético entre bacterias de la misma especie, o en ocasiones, con bacterias de especies diferentes. El tamaño de esta célula es muy pequeño, su tamaño varía de entre 0.2 y 2.0 micras de diámetro y de 2 a 8 micras de longitud, aunque también se conocen bacterias que se ven a simple vista como *Epulopiscium fishelsoni*, por otra parte la nutrición de los procariontes es bastante variada, como son los fotoautótrofos, que utilizan la energía del Sol y el bióxido de carbono, los heterótrofos, que usan luz como fuente de energía y compuestos orgánicos como fuente de carbono. Los quimioheterótrofos, que como fuente tanto de energía, como de carbono, utilizan compuestos orgánicos y los quimioautótrofos, que obtiene la energía de la oxidación de compuestos orgánicos, entre estos está el sulfuro de hidrógeno, y el bióxido de carbono como la fuente principal del carbono.^{2,3}

El grupo Archaea constituye un gran grupo de procariontes, entre ellos se encuentran organismos metanogénos que obtienen su energía de la reducción de bióxido de carbono para producir metano, éstos se localizan en medios anaerobios ricos en materia orgánica en descomposición, como el tracto digestivo de los animales, aguas estancadas, fuentes termales y el fondo de los océanos. Los halófilos (amantes de la sal) crecen usando como fuente de energía proteínas, pero requieren de altas concentraciones salinas para sobrevivir y los termófilos (amantes del calor), viven en fuentes termales sulfurosas y en pilas humeantes de residuos de carbón, uno de los sitios para recolectar este tipo de procariontes es en el vulcanismo activo. Es de gran importancia la existencia de los procariontes para nuestro planeta, porque a pesar de que algunos son patógenos para el ser humano, la mayoría son



indispensables para el desarrollo de la vida en la Tierra, ya que casi todos los gases de la atmósfera son subproductos del metabolismo de estas células, como el nitrógeno, constituyente fundamental de las proteínas y ácidos nucleicos.^{2, 17}

1.2.2. Células eucariontes

Se tiene la idea de que los primitivos eucariontes, debieron ser células simples que carecían de mitocondrias y cloroplastos, se dice que sufrieron proceso de endosimbiosis, pero la hipótesis más aceptada propone que la aparición de mitocondrias y cloroplastos son el resultado de fusión de varias líneas de bacterias y posiblemente de Archaeas. Varios autores comentan que las bacterias aerobias establecidas permanentemente en las células eucariontes primitivas, posiblemente les proporcionaban energía a cambio de alimento seguro y alojamiento, después con el tiempo estos procariontes perdieron su individualidad al transferir parte de su genoma a la célula hospedera y tiempo después, se formó la mitocondria en la célula.^{1, 20, 2}

Como ya hemos mencionado antes, estas células pertenecen al dominio Eukarya, en la cual se incluyen a los reinos protistas, hongos, plantas y animales. La característica principal es que presentan compartimentos, donde se localizan diversas funciones, los cuales están separados por una membrana citoplasmática. Estos compartimentos son llamados organelos, como el núcleo, la mitocondria, el cloroplasto, el retículo endoplásmico liso y rugoso, el aparato de Golgi, los lisosomas, los peroxisomas y componentes muy

organizados como el citoesqueleto. Generalmente las células eucariontes se dividen por medio de la mitosis, un proceso muy diferente al de la bipartición de procariontes (Figura: 1.5-1.6). Tales células no tienen plásmidos, pero presentan DNA fuera del núcleo, en las mitocondrias y los cloroplastos, su DNA es similar a la de los procariontes.^{20, 17, 2}

De esta misma forma, el grupo de procariontes sintetizadoras, presentan una gran cualidad en aprovechar la energía solar y usar como fuente de carbono una sustancia orgánica. Se supone que estos procariontes fotoautótrofos fueron los ancestros de los cloroplastos. La presencia de estos endosimbiontes que aprovecharon la energía, tuvieron gran impacto en la evolución posterior de los organismos multicelulares.^{17, 2}



Figura 1.5: Vista microscópica de una célula eucarionte.²¹

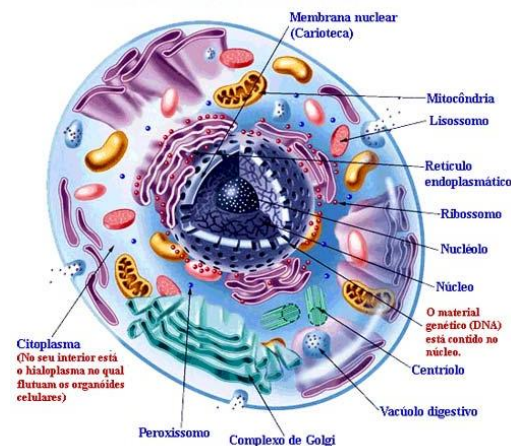


Figura 1.6: Morfología de una célula eucarionte.²²



1.3. Características fisiológicas de la célula

Las células poseen propiedades fundamentales vitales. Las funciones normales de las células o expresiones vitales se considera que son, la **absorción**; representa la capacidad celular de captar sustancias del medio exterior, la **secreción**; ya que tienen la capacidad de transformar moléculas absorbidas en productos, que posteriormente son eliminados en forma de secreción, la **excreción**; las células tienen la capacidad de descartar productos de desecho formados por sus procesos metabólicos, **respiración**; la célula produce energía mediante el oxígeno, en la oxidación de nutrientes, **irritabilidad**; es la capacidad de la célula de reaccionar ante un estímulo, **conductividad**; es la capacidad de transmitir un impulso, **contractilidad**; posee la capacidad de acortarse en una dimensión determinada, como reacción ante un estímulo y la **reproducción** ya que son capaces de renovarse por crecimiento y división.^{23, 5}

1.4. Organización, estructura y funciones de la célula

La célula eucarionte contiene mayor número de estructuras y posee organelos membranosos y no membranosos distribuidos en todo el citoplasma de la célula y que cada uno tiene una función diferente para su supervivencia.¹³



1.4.1. Núcleo

La célula se haya compuesto por un núcleo que es muy complejo en su estructura, funcionamiento y actividad biológica, éste contiene, ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), que son estructuras fundamentales para la vida. Este es redondo u ovoide, dependiendo de la forma de la célula ^(Figura 1.7-1.8). Está rodeado de una envoltura nuclear que posee aberturas, llamados poros nucleares, esta envoltura está compuesta de dos capas de fosfolípidos similares a la membrana plasmática de la célula, también contiene cuatro nucléolos, que son cuerpos redondos, densos, contruidos por ARN contenido en el núcleo y estos nucléolos no poseen una membrana limitante. Es una región especializada, donde se concentran numerosos copias de DNA que poseen información para la síntesis de RNA de los ribosomas. Este DNA de genoma nuclear se asocia con las proteínas específicas conocidas como histonas y forman cromatina, que puede ser compacta conocida como heterocromatina o extendida llamada eucromatina. La eucromatina es activa, pues el DNA puede ser copiado a RNA, y la heterocromatina es inactiva, pues sus genes no pueden ser copiados en RNA. El intercambio selectivo que de proteínas y moléculas de RNA entre el núcleo y el citoplasma se efectúa a través de los poros nucleares. Los núcleos de las células metabólicamente activas replican DNA y sintetizan los diferentes tipos de RNA (ribosomal, de tranferencia, el mensajero) lugares del núcleo. ^{13,20,17}

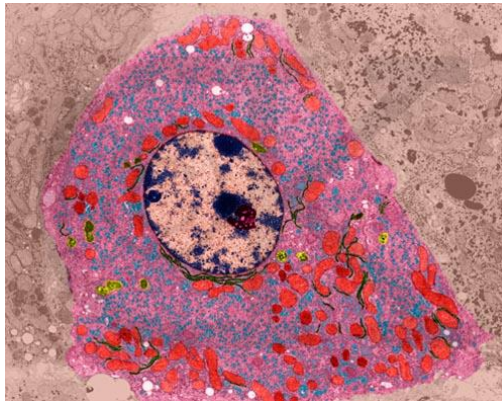


Figura: 1.7 Vista microscópica del núcleo.²⁴

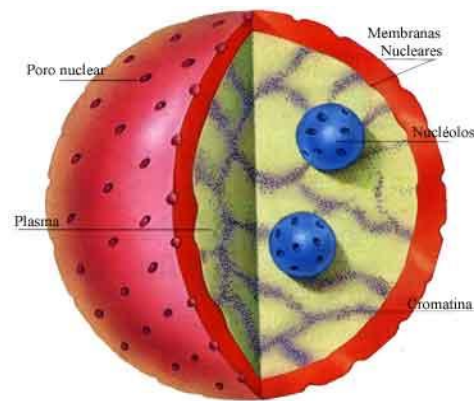


Figura 1.8 Esquema del núcleo.²⁵

1.4.2. Citoesqueleto

Es una malla tridimensional que tiene la función de estabiliza y mantener la forma celular, organiza el citoplasma y participa en el movimiento. Se caracteriza por su gran cantidad de filamentos de naturaleza proteínica, distribuidos en el citoplasma celular, también existen proteínas accesorias, que unen los componentes y tienen fundamental importancia para la función del citoesqueleto.^{23, 20}

Existen tres tipos de filamentos citoplasmáticos, los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios, todos son diferentes en su diámetro, composición proteínica y función, pero todos ellos participan en la organización del citoplasma y organización de la célula. La ubicación del citoesqueleto dentro de la célula no es fija, pero en cambios como la mitosis y citocinesis, los filamentos se organizan de forma específica y ordenada en el

citoplasma, (Figura: 1.9) además contribuye el desplazamiento de los componentes intracelulares y la movilidad de la célula como unidad.^{23, 20}

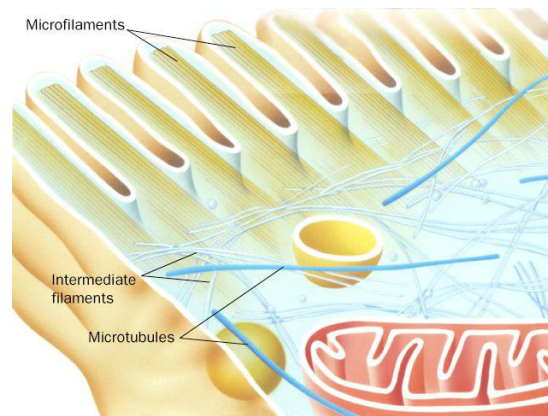


Figura: 1.9 Esquema de filamentos del citoesqueleto.²⁶

1.4.3. Citoplasma

Éste contiene las estructuras necesarias para la absorción y la generación de productos celulares. El citosol es parte del citoplasma que contiene las organelas y solutos, este utiliza los materiales captados por la célula para producir energía, también actúa en la excreción de los productos de desecho y estas funciones son llevadas a cabo en el retículo endoplásmico (Figura: 1.10). Éste está limitado por la membrana celular y rodea al núcleo o a la célula, es aquí donde tiene lugar la mayoría de los procesos metabólicos y son dirigidos por el núcleo celular.¹³

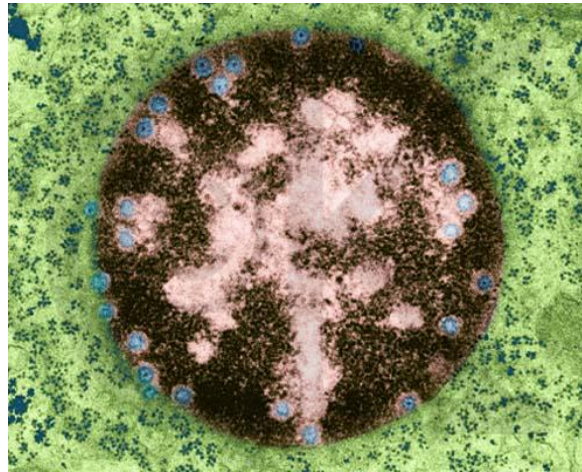


Figura 1.10. El citoplasma celular.²⁷

1.4.4. Ribosomas

Son proteínas muy pequeñas compuestas de proteínas y RNA ribosómico. Actúan como una superficie para la síntesis de proteínas. Cada ribosoma se compone de dos subunidades llamadas 50S y 30S, estos se encuentran en los nucléolos. Son componentes esenciales para la síntesis de proteínas durante el proceso de traducción de la información genética codificada en la célula (Figura: 1.11). Las proteínas se forman a partir de la unión de aminoácidos a través de un enlace peptídico, las proteínas que se forman en el ribosoma a partir de mRNA en donde siguen al menos dos rutas, que forman parte del citoplasma, o sea que las proteínas se sintetizan en los ribosomas libres y en otro caso, pueden seguir la ruta cretora, que quiere decir que los ribosomas se asocian con el sistema de membranas del retículo endoplásmico rugoso.^{1, 2}

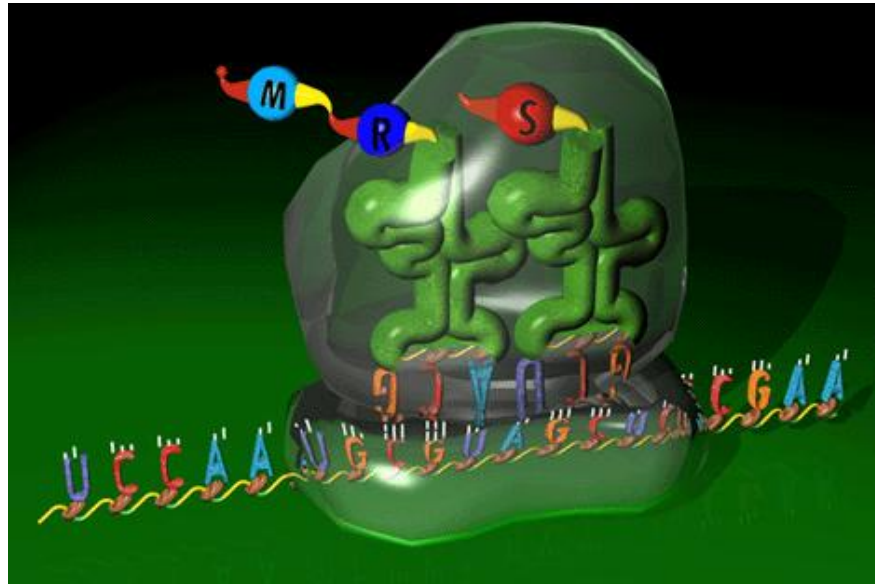


Figura: 1.11. El ribosoma.²⁸

1.4.5. Retículo endoplásmico rugoso (RER)

Es una red de sacos aplanados o cisternas, túbulos y vesículas que se encuentra constituida por una membrana continua que limita un espacio denominado lumen. La unión de ribosomas a la superficie de la membrana del RE le da la apariencia rugosa, de ahí deriva su nombre ^(Figura: 1.12). Éste participa en la síntesis de proteínas ya que forma la base estructural para la síntesis y distribución de las proteínas en el interior de la célula. Es en éste organelo donde se efectúa el plegamiento de las proteínas y donde se inicia la adición de los carbohidratos (glucosilación), también es un sitio de control que elimina las proteínas que no se han modificado correctamente.^{5, 2}



Figura: 1.12. Esquema de RER.²⁹

1.4.6. Retículo endoplásmico liso (REL)

Este carece de ribosomas y presentan una estructura tubular. Se encarga de sintetizar gran cantidad de lípidos, donde se producen las actividades enzimáticas necesarias para el metabolismo de algunos fármacos, compuestos tóxicos y la síntesis de los materiales de secreción. Puesto que los lípidos son hidrofóbicos, su síntesis no puede llevarse a cabo en el citosol (Figura: 1.13). Los lípidos recién sintetizados, son transportados por medio de vesículas o mediante proteínas acarrreadoras.^{20, 2}

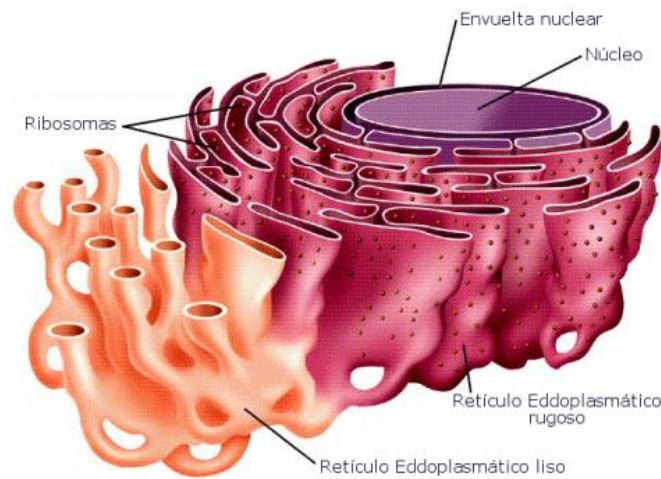


Figura: 1.13 Esquema REL.³⁰

1.4.7. Aparato de Golgi

Este organelo tiene dos caras, una convexa llamada cis, que se encuentra normalmente orientada hacia el núcleo y donde pasan las proteínas de un saco a otro, hasta salir finalmente por la cara trans, después de haber sido modificadas (Figura: 1.14). El aparato de Golgi es estructuralmente asimétrico, él recibe las proteínas sintetizadas por los ribosomas que se separan del retículo endoplásmico, se desplazan hacia él y es donde termina su procesamiento. Éste ayuda a clasificar, condensar, empaquetar y liberar las proteínas que producen el RE, también guarda las proteínas modificadas en vesículas, éstas se dirigen hacia la superficie celular después de pasar por el aparato de Golgi y por último su contenido es descargado en el espacio extracelular circundante. El aparato de Golgi continúa con el proceso de glucosilación que se inicio en el RE, es decir, termina la formación de glicoproteínas, que incluye la

modificación y la síntesis de nuevos azúcares, para construir una variedad de oligosacáridos, que darán especificidad a las proteínas que los posean.^{20, 2}

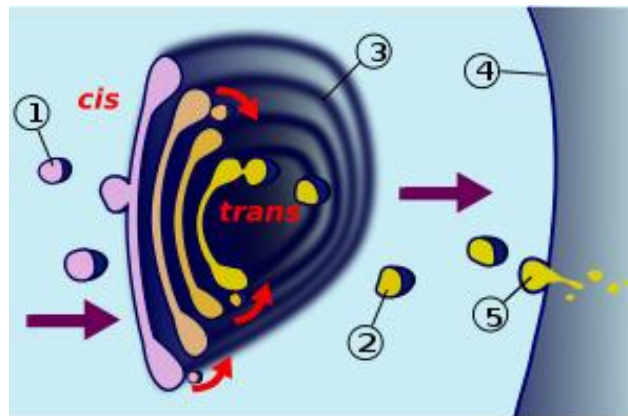


Figura: 1.14. Esquema del Aparato de Golgi y sus caras cis y trans.³¹

1.4.8. Lisosomas

Los lípidos y las proteínas finalmente son exportados hacia su lugar de destino por medio de pequeñas vesículas, que se desprenden de la región trans del aparato de Golgi, denominadas lisosomas, son pequeños cuerpos rodeados de membrana que contienen una variedad de hidrolasas. Éstas se encuentran dentro del aparato de Golgi para actuar en procesos de digestión intracelular. Son vesículas membranosas de enzimas digestivas muy activas, que pueden degradar cualquier sustancia orgánica de importancia biológica (Figura: 1.15). La digestión celular tiene lugar dentro del lisosoma y además éste proporciona un material de defensa contra la invasión de bacterias y de otros agentes extraños.^{13, 3, 2}

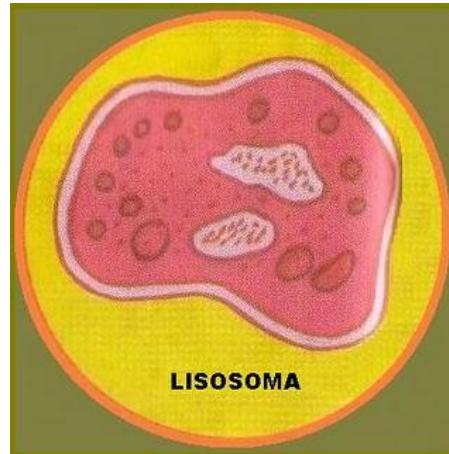
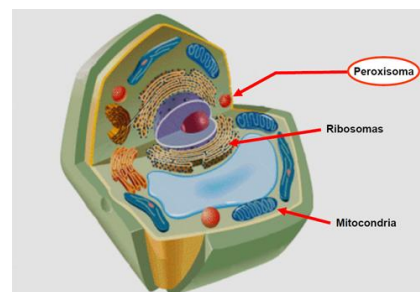


Figura: 1.15. Estructura del lisosoma.³²

1.4.9. Peroxisomas

Son organelos redondeados, unidos a la membrana que llevan a cabo diversas funciones metabólicas con sus 40 enzimas oxidativas, en especial oxidasa de urato, catalasa y oxidasa de ácido A-amino (Figura: 1.16). Al igual que las mitocondrias, el peroxisoma utiliza la mayor parte de oxígeno disponible en las células, también están relacionadas con la síntesis de lípidos, así como a su degradación. Se encuentran en el citoplasma de la célula eucariota.^{3, 2}

Figura 1.16. Ubicación de los peroxisomas en la célula.³³



1.4.10. Mitocondrias

Cada mitocondria posee una membrana externa lisa y una membrana interna plegada (Figura: 1.17-1.18). En la célula se presentan organelos, cuyas funciones es generar moléculas energéticas, en este caso moléculas de ATP y se emplea en todo tipo de trabajo celular. Este trabajo de energía se procesa en pequeños organelos de formas variadas. La mitocondria se considera el centro metabólico por excelencia, en donde, mediante la oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos, se sintetiza la mayor parte del ATP que requieren las células. Estas efectúan la combustión de los metabolitos procedentes de los nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) para sintetizar la molécula energética por excelencia, de la cual depende en gran medida la vida.^{3, 2}



Figura: 1.17 Esquema 3D del ribosoma.³⁴

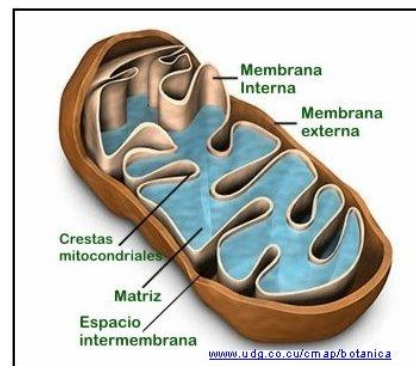


Figura: 1.18. Esquema del ribosoma.³⁵

1.5. Ciclo celular

La mayoría de las células atraviesan una secuencia y serie de fenómenos regulares y repetitivos de crecimiento y división, que constituye el ciclo celular. Se divide en dos fenómenos principales, que es, la **interfase**, que es un período prolongado durante el cual la célula crece, aumenta su contenido y replica su material genético y la **mitosis**,^(Figura 1.19) que consta de un período más corto durante el cual la célula divide su núcleo y citoplasma, lo que da origen células hijas.^{1,2}

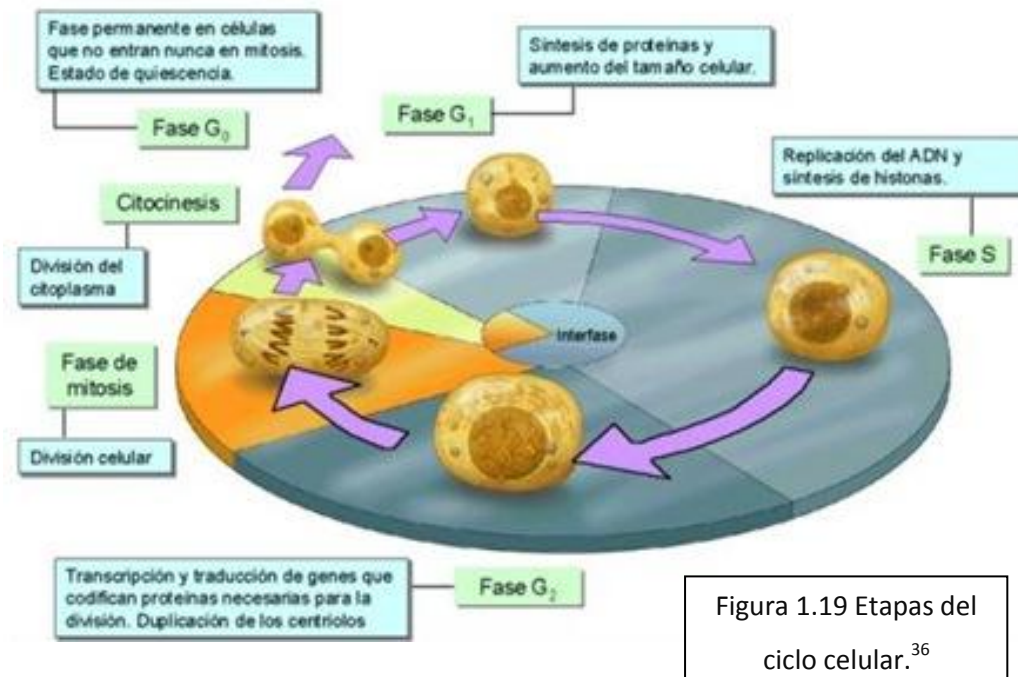


Figura 1.19 Etapas del ciclo celular.³⁶



1.6. División celular

Las células se reproducen mediante el proceso conocido como división celular y en este proceso su material genético se reparte entre dos nuevas células hijas. En las plantas y los animales multicelulares, la división celular es el procedimiento por el cual el organismo crece, partiendo de una sola célula, y los tejidos dañados son reemplazados y reparados. Cuando una célula alcanza cierto tamaño crítico y cierto estado metabólico, se divide, las dos células hijas entonces comienzan a crecer nuevas células hijas son casi idénticas entre sí, como a su progenitora. Son similares, en parte, porque cada nueva célula recibe aproximadamente la mitad del contenido del citoplasma, incluidos los organelos de la célula materna. La razón más importante de esta similitud, a nivel de estructura y función, es que cada nueva célula, hereda un duplicado exacto de la información genética de la célula madre. Para completarse esta división, puede requerir desde pocas horas, hasta varios días, dependiendo del tipo de célula y de factores externos como la temperatura y los nutrimentos disponibles.^{1, 5, 13}

1.6.1. Interfase

Antes de la división, la célula debe duplicar su ADN, sintetizar histonas y otras proteínas asociadas con el DNA de los cromosomas, producir una reserva adecuada de organelas para las dos células hijas y ensamblar las estructuras necesarias para que se lleve a cabo la mitosis ^(Figura: 1.20). La interfase se divide en tres etapas que es la fase G₁ (gap, lapso) que es donde inicia la síntesis de



macromoléculas esenciales para la duplicación de ADN, la fase S (síntesis) en la que se duplica en DNA y finalmente la fase G₂, que es cuando la célula se prepara para la mitosis.^{1,5}

1.6.1.1. Fase G₁

Es la fase de actividad bioquímica intensa y es el estadio inicial de reposo, ya que es un periodo de crecimiento celular, por duplicación de organelos y macromoléculas, también la producción de material celular o secreción igual que síntesis de RNA y otros fenómenos en preparación para la mitosis siguiente. Las células hijas que se forman durante la mitosis entran en la fase 1, estas células sintetizan RNA, en consecuencia se normaliza el volumen celular, que se produjo por la división de la célula a la mitad durante la mitosis. Durante este período comienzan a separarse y a duplicarse los centriolos, (Figura: 1.20) cada miembro del par original de los centriolos da un centriolo hijo más pequeño y cada uno de los organelos tiene su propio cromosoma, organizado de manera muy semejante.^{5,1,13,2}

1.6.1.2. Fase S

Ocurren los procesos finales para la división celular, la cual completa la síntesis de ADN y éste se duplica, ya que va a llegar a una nueva división que es la fase G₂. En este es el lapso de síntesis de división celular, donde se duplica el genoma, se incorporan todas las nucleoproteínas indispensables, incluidas las



histonas, dentro de la molécula de ADN, con lo cual se forma el material de la cromatina, la célula contiene ahora el doble de material genético. (Figura: 1.20) 5,1

1.6.1.3. Fase G₂

Esta es la fase entre el período de la síntesis de DNA y el inicio de la mitosis. Terminan los preparativos para la reproducción y se sintetizan proteínas asociadas a los cromosomas y finalmente disminuye la actividad metabólica, se almacena energía para la mitosis, se sintetiza tubulina para el ensamble de microtúbulos necesarios para la mitosis y se analiza también la replicación de ADN para detectar posibles errores y corregirlos. (Figura 1.20) 5,1,2

1.6.2. Mitosis

Finalmente ocurre la mitosis, en la que tiene lugar el reparto del material genético, que incluye diferentes estadios de división celular y citoplasmática, esto en tiempo relativamente corto. En esta fase tenemos la distribución de forma precisa y equitativa del material genético de la célula que se reproduce y que ha sido replicada durante la fase S, de manera que al finalizar este proceso, las dos células hijas reciban su copia idéntica del genoma de la célula original. La mitosis comienza al terminar la fase dos y por consiguiente se completa el ciclo celular. Primero se divide en un proceso denominado cariocinesis, seguido de la división del citoplasma, llamada citocinesis. El proceso de mitosis se divide en cinco etapas distintas que son, la profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. (Figura 1.20) 5, 1,2



1.6.2.1. Profase

Ésta tienen cuatro cambios estructurales, en la cual el núcleo se descondensa y se desintegra, comienza la construcción del aparato mitótico, los centriolos emigran hacia los polos de la célula, los microtúbulos crecen y se modifican, los cromosomas se descondensan, observándose como largos filamentos y posteriormente se desintegra la envoltura nuclear. (Figura: 1.20) 5,1,2

1.6.2.2. Prometafase

Es aquí cuando se inicia la fosforilación de las láminas nucleares que empiezan a descomponer y desaparecer la envoltura nuclear, se terminan de condensar los cromosomas y los microtúbulos que se extienden a partir de los centrosomas que forman el huso mitótico. Algunos autores piensan que los microtúbulos polares tienen a su cargo el conservar el espaciamiento entre los polos durante el fenómeno de mitosis, y que los microtúbulos ahusados favorecen la migración de los cromosomas de tal manera que se orientan en alineación con el huso mitótico. (Figura: 1.20) 1, 2

1.6.2.3. Metafase

Fase en la cual los cromosomas por sí mismos se van ubicando hacia el ecuador de la célula para quedar alineados en el plano ecuatorial. Cada cromosoma se mantiene en tensión sobre la placa metafásica, orientados con



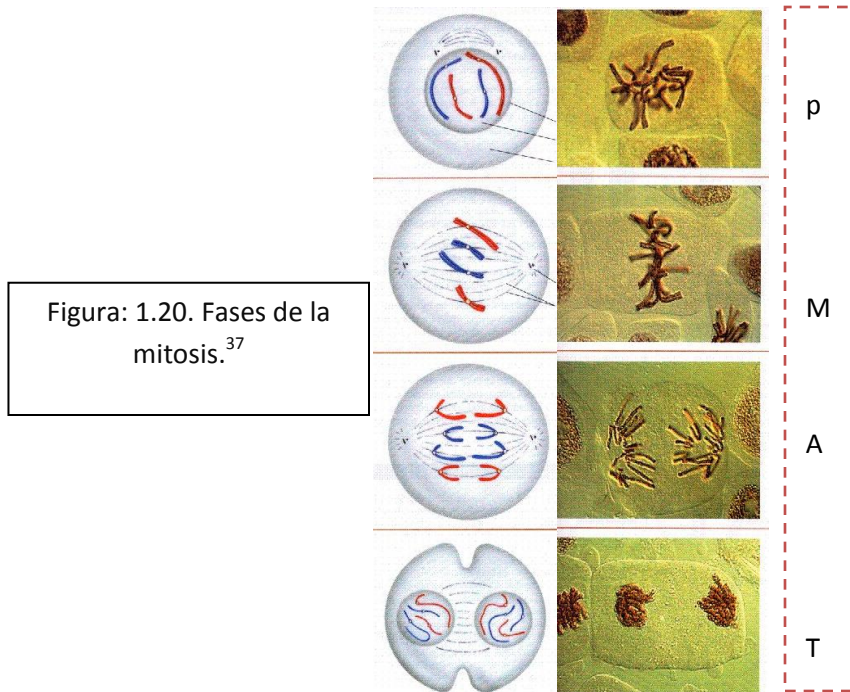
los ejes longitudinales en ángulo recto con el eje del huso, condensados al máximo (Figura: 1.20). Esto señala el final de la metafase.^{5,1,2}

1.6.2.4. Anafase

Al comienzo de la anafase, la etapa más rápida de la mitosis, los centromeros se separan simultáneamente en todos los pares de cromatidas, para quedar independientes, es aquí cuando cada cromosoma tiene su propio centromero y se une a uno de los polos, hacia el que migra, por una fibra del huso. También la célula y el huso se alargan iniciando la citocinesis y la formación del surco de división. (Figura: 1.20) 5,1,2

1.6.2.5. Telofase

Esta es la fase final de la mitosis y se caracteriza por la citosinesis (división del citoplasma en dos partes iguales) y la reconstrucción del núcleo. Al iniciarse la telofase, los cromosomas ya alcanzaron los polos opuestos y el huso comienza a dispersarse en dímeros de tubulina y a desaparecerse, también se forman las membranas y la envoltura nuclear, los cromosomas se van desenrollando y se va haciendo visible el nucléolo y posteriormente un centriolo junto a cada uno de los previos. (Figura: 1.20) 5, 1,2



1.7. Apoptosis

En la división de un individuo la apoptosis o muerte celular, es tan importante como la división celular. Es el resultado de varios factores como, lesión aguda, accidentes, falta de aporte vascular, destrucción por patógenos o el sistema inmunitario y programación genética. Por ejemplo en el ser humano mueren millones de células de la médula espinal y el tubo digestivo para equilibrar la proliferación celular en los tejidos, a este tipo de muerte se le denomina muerte celular programada, sin embargo, existe muerte por daño o envejecimiento, proceso denominado necrosis. La mayoría de las células fabrican proteínas que forman parte de una maquinaria para su propia destrucción, esta maquinaria letal contiene enzimas capaces de degradar



proteínas (proteasas) y su activación produce, directa o indirectamente, cambios celulares característicos. Las enzimas involucradas en el proceso de apoptosis normalmente permanecen inactivas en las células, respondiendo a mecanismos de control estrictos. La apoptosis es la fragmentación de una célula en partículas rodeadas de membranas que son eliminadas mediante fagocitosis por células especializadas. Normalmente la muerte celular tiene lugar en los sitios de plegamiento o invaginación de los tejidos ^(Figura 1.21). La apoptosis es un tipo de muerte activa, que requiere gasto de energía por parte de la célula y es un proceso ordenado en el que no se desarrolla un proceso inflamatorio. ^{1,13}

Las CM adultas se encuentran en células hematopoyéticas en la medula ósea y poseen capacidad multipotencial para formar varios tipos de células. Se han encontrado células madre en la pulpa dentaria, así como en el encéfalo, músculo, piel, tracto digestivo y vasos sanguíneos. Constituye una gran esperanza a futuro el hecho que estas células puedan reemplazar a los tejidos que no funcionan correctamente, dañados o incluso muertos. ^{5, 1, 2}

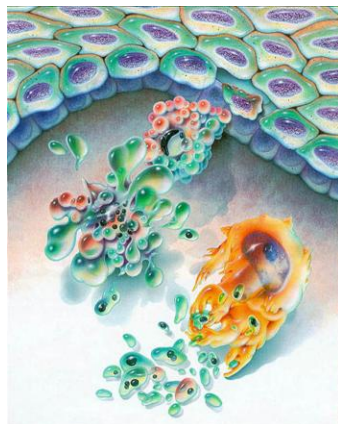


Figura: 1.21.
Células en
apoptosis.³⁸



Capítulo II

2. Las células madre

En los últimos años hemos visto que las CM han pasado a ser de sólo un concepto de interés científico, a interés de la sociedad en general, esto deriva ya que las células poseen diferentes capacidades, entre ellas la capacidad de diferenciarse y dividirse en distintos tipos de células especializadas. Por tal razón la posibilidad de realizar tratamientos médicos en enfermedades diversas y de difícil manejo por medio de éstas, ha reavivado aún más el debate sobre las posibles aplicaciones terapéuticas a muchos campos de la salud. Las investigaciones con CM están enfocadas a desarrollar tratamientos para enfermedades como Alzheimer, Parkinson, diabetes, esclerosis múltiple, desordenes neurológicos entre otras. El avance en las investigaciones sobre células madre está ampliando el campo del conocimiento acerca de cómo un organismo se desarrolla desde una simple célula, hasta de qué modo células sanas reemplazan a células dañadas. Esta promisoría área de la ciencia está impulsando a los científicos a investigar las posibilidades de aplicar terapias celulares para tratar enfermedades, las cuales son referidas como medicina reparativa o medicina regenerativa.^{7,39}

2.1. Antecedentes históricos

El hombre ha tratado de comprender la capacidad del cuerpo para reparar o reemplazar las células y los tejidos del organismo. En el año 1700



aproximadamente el investigador francés René Antonie de Réaumur publicó su trabajo de regeneración de extremidades y garras de cangrejo, en donde hubo descubrimientos que causaron un gran impacto en las ciencias biológicas y médicas, por estas razones a finales del siglo XIX y principios del siglo XX la investigación de la ingeniería tisular se enfocó primordialmente en la regeneración y sus fundamentos celulares. Por lo tanto las observaciones de este período, permitieron llegar a la conclusión de que las células madre son requeridas para la mayoría de los procesos de regeneración, se dieron cuenta que en casos como en la regeneración de la piel, sangre, músculo y hueso en los mamíferos, o durante el reemplazo de tejidos perdidos en gusanos, existen células de reserva denominadas *stem cell*, que sólo necesitan ser activadas para su regeneración en respuesta al daño o agresión tisular. La primera célula humana aislada a partir de un embrión fue en 1998 y esto ha generado discusiones, debates éticos y políticos.^{40, 41, 42}

En la década de los 80', se logró obtener un cultivo procedente de embriones de ratones. En los 90' científicos de la Universidad de Wisconsin consiguieron CM embrionarias humanas y desde 1989 de utilizan células madre del cordón umbilical para más de 75 enfermedades malignas y no malignas. Las CMPD fueron las primeras células en aislarse, para determinar sus características y su identificación en la pulpa, así como verificar sus altas tasas proliferativas y capacidad para formar tejidos mineralizados, ambos *in vivo e in vitro* en el año 2000.^{6, 10}

2.2. Definición de la células madre

Son un tipo especial de células que se encuentran en todos los organismos y tienen la capacidad de dividirse a través de la mitosis, a su vez diferenciarse y autorrenovarse en varios tipos de células especializadas, lo cual se le denomina plasticidad, tienen la capacidad de proliferar dando lugar a células hijas idénticas, junto con la capacidad de especialización, que es la diferenciación a células especializadas. (Figura: 2.1-2.2) 7,8, 39, 14



Figura: 2.1 Células madre.⁷

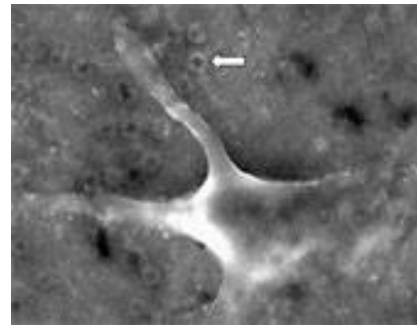


Figura: 2.2 Célula madre adherida a una membrana.⁴³

2.3. Clasificación

Las células madre se pueden diferenciar según su potencialidad y según su origen.⁸



2.3.1. Tipos de células madre según su potencialidad

Podemos clasificar a las CM en totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales.

Las CM totipotenciales son capaces de generar cualquier célula del organismo, tanto somáticas como germinales. Las CM pluripotenciales son capaces de diferenciarse en diferentes tejidos o células pertenecientes a diferentes tejidos de las tres capas germinativas y las células multipotenciales aunque son capaces de producir distintos tipos celulares, su capacidad es menor y en un principio sólo son capaces de generar tejidos derivados de la misma lámina embrionaria.³⁹

2.3.2. Tipos de células según su origen

Según su origen las CM se pueden clasificar en células madre embrionarias y células madre de tejidos adultos.

2.3.2.1. Células madre embrionarias

Las CM embrionarias provienen de un grupo de células, provenientes de la masa interna del embrión en un estadio temprano de la gestación (5 días) ^(Figura: 2.2). Sin embargo para aislarlas es necesario destruir el embrión. Éstas poseen la capacidad de autoregenerarse y de diferenciarse en muchos tipos celulares, una propiedad denominada versatilidad celular. Esta capacidad abre la posibilidad de

utilizarlas para reemplazar tejidos dañados y enfrentar enfermedades degenerativas.^{14, 6, 39}



Figura: 2.3 Embrión.⁶

2.3.2.1.1. Aplicaciones generales de las células madre embrionarias

Estas células mantienen la capacidad pluripotente de generar todos los tipos celulares del organismo que derivan del ectodermo, mesodermo y endodermo a excepción de la placenta^(Figura: 2.4). El gran objetivo es el poder dirigir las células indiferenciadas a la formación de tejidos u órganos, por métodos de reemplazo celular. Las células seleccionadas para estos fines terapéuticos en humanos deben



ser seleccionadas por su estabilidad genética y normalidad. Se ha demostrado *in vitro* que a la exposición de estímulos o agentes químicos adecuados, pueden inducir la diferenciación de estos cuerpos embrionarios hacia un linaje específico, por ejemplo un agente es el ácido retinoico. También se ha sugerido que las células madre embrionarias pueden tener su aplicación en el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas con potencial farmacéutico. En efecto, algunos tipos celulares como cardiomiocitos y hepatocitos generados desde CM embrionarias humanas podrían proporcionar una población ideal de células para evaluar con mayor exactitud la efectividad de un determinado fármaco o su toxicidad. Este sistema proporcionaría ventajas adicionales ya que las células humanas pueden revelar la toxicidad de ciertas drogas que no necesariamente se detectan en los análisis convencionales, como en los ensayos desarrollados con líneas celulares de ratón o los ensayos llevados a cabo *in vivo* en animales. La aplicación de las células madre embrionarias que ha recibido mayor atención en los últimos años es la terapia de reemplazo celular o medicina regenerativa, lo que permitiría el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades debilitantes, tales como diabetes tipo I, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Parkinson y enfermedades de las células sanguíneas. Las investigaciones están enfocadas en reemplazar células dañadas por células funcionales que restituyan la función normal de los tejidos u órganos de forma más eficiente a través de terapias convencionales como son los trasplantes y terapias farmacológicas,. Sin embargo, hasta la fecha el éxito de estas terapias es limitado, existiendo varias interrogantes que aún necesitan ser resueltas. Se necesitan más investigaciones y ensayos clínicos antes de que estas sean disponibles. La gran promesa de estas células reside en la posibilidad de encontrar cura o tratamientos, debido a la capacidad de estas células para crecer indefinidamente y diferenciarse *in vitro* en

múltiples tipos celulares o tejidos. Sin embargo, no obstante el potencial que encierran estas células, aún persisten grandes desafíos por superar antes de que puedan ser utilizadas efectivamente en terapias celulares. Se hace evidente entonces la necesidad de seguir investigando en la derivación y caracterización de estas células en otras especies animales, antes de que podamos ver cumplidas las grandes expectativas que se han generado en torno a sus prometedoras aplicaciones. Otra desventaja es que se podrían utilizar para realizar trasplantes, provocando reacciones de rechazo al no proceder del mismo paciente y debido a su capacidad de diferenciación pueden provocar tumores.^{42, 41, 44, 45}

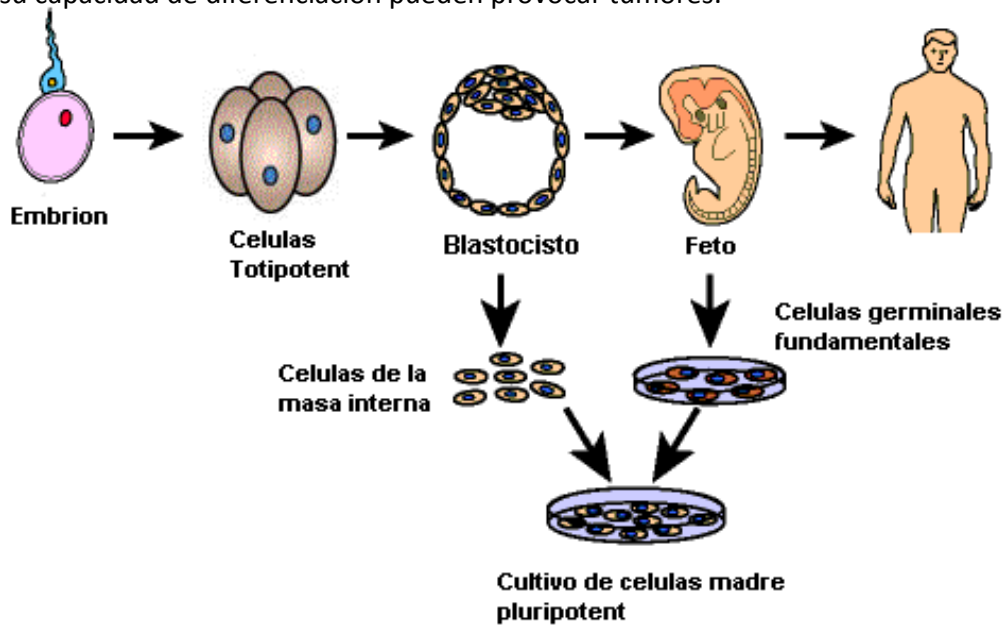


Figura: 2.4 Diferenciación de las células madre en diferentes tipos celulares.⁴⁶

2.3.2.2. Células madre de tejidos adultos

Las CM adultas, también llamadas postnatales, son células multipotenciales no especializadas que se encuentran en un tejido especializado y por tanto poseen la capacidad de dar lugar a células especializadas del tejido en el que se encuentran. Éstas tienen la capacidad de autorregenerarse y dar lugar a dos células hijas idénticas y como resultado la formación de células de reparación de las capas de origen germinativas. Actualmente se han identificado tejidos de la médula ósea ^(Figura: 2.5), hematopoyético, córnea, retina, neuronal, hepático, epidérmico, páncreas, pulmón, músculo cardíaco y esquelético, tracto gastrointestinal y pulpa dental ^(Figura: 2.6). Las CM del adulto no son muy utilizadas en terapias humanas, aunque el número de extracción de células es mayor que el número de células derivadas del embrión y también pueden aplicarse de forma autóloga, de tal manera, sin riesgo de rechazo. En un individuo adulto se conocen células madre adultas, que se encargan de regenerar los tejidos en continuo desgaste, como la piel o sangre, o de regenerar tejidos dañados. ^{39, 6, 23, 45, 47}

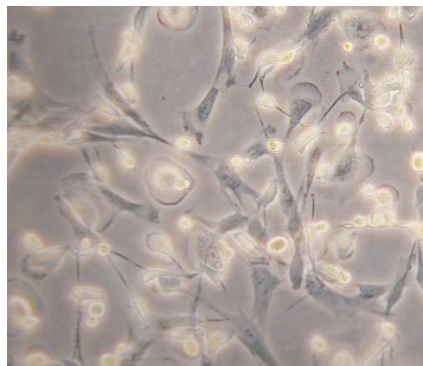


Figura: 2.5 Cultivo de células madre de la médula ósea.¹⁴

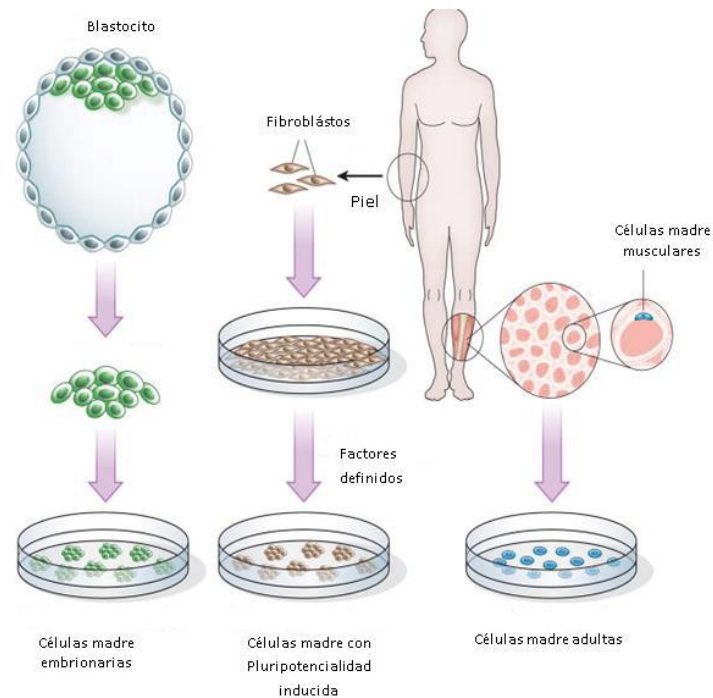


Figura: 2.6 Tipos de células madre según su origen.⁴⁸

2.3.2.2.1. Células mesenquimales

Se ha encontrado otro tipo de CM, denominada mesenquimal que puede diferenciarse en numerosos tipos de células de los tres tejidos embrionarios (musculares, vasculares, nerviosas, hematopoyéticas, óseas, etc).⁴⁹

Actualmente la fuente más usada para la extracción de estas son las células madre mesenquimales (CMM) humanas, que están presentes en el estroma de la médula ósea y su papel es contribuir la regeneración de los tejidos



mesenquimáticos (hueso, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo y estroma) que se han podido diferenciar en rasgos típicos de osteocitos, condrocitos o adipocitos respectivamente.^{14,6, 49}

Dependiendo de su origen éstas células se pueden dividir en células mesenquimales embrionarias y somáticas. Las mesenquimales embrionarias (CME), son células pluripotenciales ó sea que cada una de ellas es capaz de producir todos los tipos celulares de un organismo y las células mesenquimales somáticas o adultas, son en su mayoría, multipotenciales, ya que generan una gran variedad de tipos celulares dentro de un tejido específico, sin embargo, éstas no representan ningún reto ético, ya que generalmente se obtienen de tejidos desechados, como la placenta o la sangre del cordón umbilical. Tienen la capacidad de reproducir muchas generaciones sin perder su capacidad de diferenciarse.^{42, 6, 14}

Estas células han tenido mucha mayor importancia en la última década. Estudios recientes han demostrado la plasticidad, dando origen a células no hematopoyéticas como miocitos, células nerviosas entre otras. La gran capacidad de poseer multipotencialidad y la plasticidad de estas células las hacen un blanco perfecto para su aplicación clínica. Se pretende que sean utilizadas en enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco y hematopoyético entre otros.^{42, 14}

Las CCM también se pueden aislar de la médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, cerebro, médula espinal, tejido adiposo, pulpa dentaria, vasos sanguíneos, músculo esquelético, piel, tejido conjuntivo, córnea, retina,



hígado, conductos pancreáticos, folículo piloso, tejido gastrointestinal y pulmón.⁴⁹

2.4. Las células madre de la pulpa dental

Son células que tienen el potencial de convertirse en tejido y son importantes en la regeneración y reparación del daño. Por sus características particulares, podrían utilizarse para reparar y generar tejido cardíaco, después de un infarto, así como tejido cerebral, nervioso, muscular, óseo, cartílago y tejido de la cavidad bucal, como esmalte, dentina, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento. El objetivo de las CM en odontología es que los tejidos dañados o perdidos sean reparados o reemplazados usando células del mismo paciente sin el riesgo al rechazo, lo que representa numerosos beneficios, por tal razón esta área prometedora de la ciencia, investiga la posibilidad de CM para tratar enfermedades. Un obstáculo de las CM es que gradualmente, pierden sus propiedades multipotenciales y regenerativas en su expansión *in vivo*.^{9, 14, 47, 50}

2.4.1. Pulpa dental

Según Bluteau et al refieren que en año 2008 se encontraron dos sitios diversos de las CMPD sugeridos, que son la pulpa dental propiamente dicha y la zona rica en células y según Sloan et al. en el 2009 encontraron dos capas, una zona pobre en células y una zona rica en células (Figura: 2.7). Está formada de compuestos ectodérmicos y mesenquimales, ésta contiene células de la cresta neural de la que se ha demostrado plasticidad o capacidad multipotencial. Su

tejido conectivo vascular laxo, altamente vascularizado e innervado, contiene una población heterogénea de células, entre ellas se encuentran los fibroblastos, los odontoblastos, células sanguíneas, células de Schwann, células endoteliales, mesenquimatosas entre otras. Está formada un 75 % de agua y 25% de materia orgánica, que son células y matriz extracelular.^{6, 7, 12, 50}

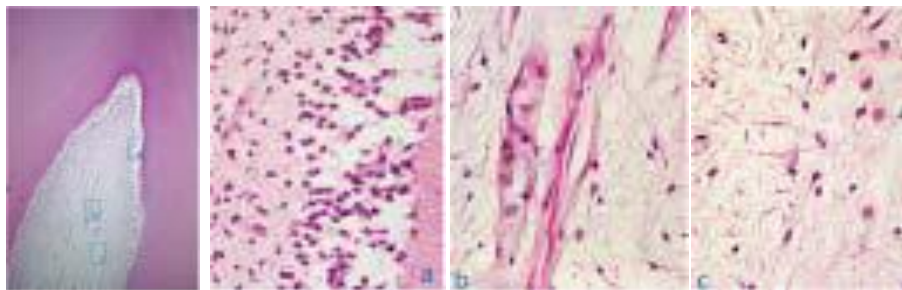


Figura: 2.7 Ubicación de las células madre en la pulpa dental.⁷

Existen células pulpares de reserva, denominadas también mesenquimáticas indiferenciadas, que derivan del ectodermo de la cresta neural. En la etapa adulta serán la población de reserva pulpar, porque poseen la capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos, según el estímulo que actúe sobre ellas. Un estimulante potente muy importante para la diferenciación y proliferación de las células es el endotelio-vascular (VEGF). El número de células disminuye con la edad, por lo consiguiente se presenta una reducción en la capacidad de autodefensa de la pulpa. Generalmente se ubican en la región subodontoblástica y en la proximidad de los capilares sanguíneos y se le denominan células perivasculares. Mientras que las células indiferenciadas del periápice dan lugar a distintas líneas celulares como los



fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos y odontoblastos como respuesta ante situaciones clínicas.^{6, 12}

Actualmente se han identificado CMPD, que han sido aisladas de la pulpa postnatal, con marcadores útiles para identificarlas con marcadores relacionados con el endotelio y el músculo liso como VCAM-1 molécula de adhesión vascular, CD146 y actina α de músculo liso.¹²

2.4.2. Aplicaciones odontológicas de células madre de la pulpa dental

Para hablar de la terapéutica basada en el empleo de las CM es importante saber y comprender el concepto de transdiferenciación, que es la capacidad de las CM para ser trasplantadas bajo determinadas condiciones y dar origen a diferentes linajes celulares.^{51, 52, 53}

Se ha investigado que la pulpa de dientes permanentes y temporales, puede ser usada para la regeneración de dentina y hueso alveolar. La medicina regenerativa se basa en contribuciones de la biología molecular, la biología celular, la nanotecnología y el desarrollo de nuevos biomateriales. La regeneración es un campo que aplica los principios de las CM, la ingeniería de tejidos y los factores de crecimiento para reemplazar o mejorar las funciones biológicas de todos los tejidos del cuerpo (Figura: 2.8) 8, 28

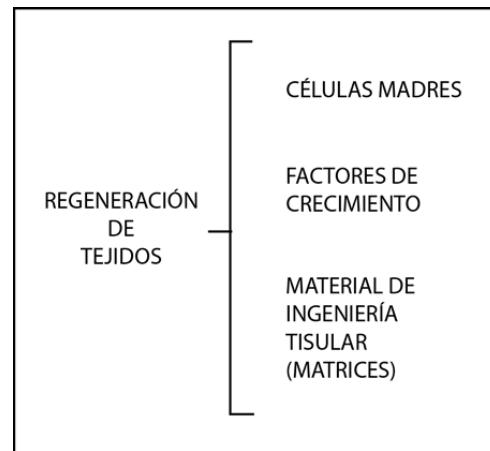


Figura: 2.8 Triada para la regeneración

2.4.2.1. Factores de crecimiento para la regeneración en odontología

Estas son proteínas que se unen a los receptores de la célula e inducen la proliferación celular o citodiferenciación. Varios de estos factores de crecimiento tienen la capacidad de estimular en mayor o menor grado la división celular en distintos tipos de células, sin embargo unos son más específicos y sólo son de un tipo celular. También son utilizados para controlar la actividad de las CM, así que aumenta la tasa de proliferación, induciendo a las células en un tipo de tejido estimulando las CM para sintetizar y secretar matriz mineralizada y para inducir la regeneración de tejidos lesionados. (Figura:

2.9) 9



Abreviatura	Factor	Fuente primaria	Actividad	Utilidad
BMP	Proteína morfogenética ósea	Matriz ósea	BMP inducen a la diferenciación osteoblástica y mineralización del hueso	Usadas para sintetizar CM y secretar matriz mineral
CSF	Factor estimulante de colonias	Amplio rango de células	CFS como las citoquinas que estimulan la proliferación de las células mesenquimales y epiteliales	Pueden ser usadas para incrementar el número de las CM
EGF	Factor de crecimiento epidermal	Glándulas submaxilares	Promueve la proliferación de las células mesenquimales y epiteliales	Pueden ser usadas para incrementar en número de CM
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico	Amplio rango de células	Promueve la proliferación de muchas células	Pueden ser usadas para incrementar en número de CM
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas	Plaquetas, células endoteliales, placenta	Promueve la proliferación de tejido conectivo y células del músculo liso	Pueden ser usadas para incrementar en número de CM
TGF Beta	Factor de crecimiento transformante	Matriz dentinal, activación de células TH, células T ayudadoras y las células asesinas naturales (NK)	Promotor antiinflamatorio, promueve la reparación, inhibe la proliferación de macrófagos y leucocitos	Está presente en la matriz de la dentina y ha sido usada para promover la mineralización del tejido pulpar

Figura: 2.9 Principales factores de crecimiento en odontología.⁹

Las proteínas morfogenéticas óseas, estimulan la diferenciación de CM madre de la pulpa también la regeneración de tejidos periodontales e inducen la diferenciación de osteoblastos y mineralización ósea. Y el factor fibroblástico (FGR) ejerce una influencia inhibitoria en la proliferación de células inmaduras óseas, ya que su función es limitar la osteogénesis.⁹

2.4.2.2. Regeneración de tejido pulpar mediante células madre de la pulpa dental

Para la creación de ésta, se utilizan CMPD, ya sea de dientes deciduos o adultos, con células endoteliales microvasculares (para formar vasos sanguíneos funcionales) que son introducidas en un depósito hecho de colágeno, en un material reabsorbible, para después ser implantadas en el tejido subcutáneo de ratones inmunodeficientes ^(Figura: 2.10) y en un periodo de 14 a 28 días, los autores observaron que el tejido pulpar formado se asemejaba a la pulpa dental, esto en un futuro con la bioingeniería podríamos dar lugar a nuevo tejido pulpar y evitar pérdidas dentales prematuras.⁷

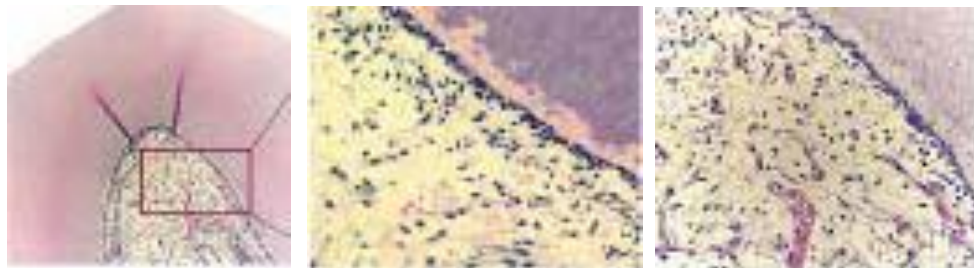


Figura: 2.10 Vista microscópica de la pulpa dental inoculada en ratones inmunodeficientes.⁷

2.5. Dentina

También llamada sustancia ebúrnea o marfil, es el eje estructural del diente, está delimitado por una cavidad llamada cámara pulpar que contiene la pulpa



dental. Está compuesta por matriz orgánica, de fibras de colágeno en un 20%, matriz inorgánica principalmente mineral de hidroxiapatita en un 70% y 12% de agua, elástica, flexible y su textura es ligeramente blanda. Esto permite el impacto de la masticación sin que el esmalte se fracture, ya que la elasticidad se debe a la presencia de matriz de túbulos, que llega desde la unión amelodentinaria hasta la pulpa.^{13, 12, 50}

2.5.1. Dentinogénesis

Se le consideran tres etapas 1) Elaboración de matriz orgánica, 2) Maduración de la matriz y 3) Precipitación de sales minerales. La formación de la dentina comienza en el estadio de campana avanzada, ésta se inicia en la zona del vértice de la papila dental que corresponde a las futuras cúspides o bordes incisales, desde donde continúa en dirección cervical para contruir así la dentina coronaria ^(Figura: 2.11). La dentina radicular se produce con posterioridad y en sentido apical bajo la inducción de la vaina epitelial de Hertwig.^{12, 13}

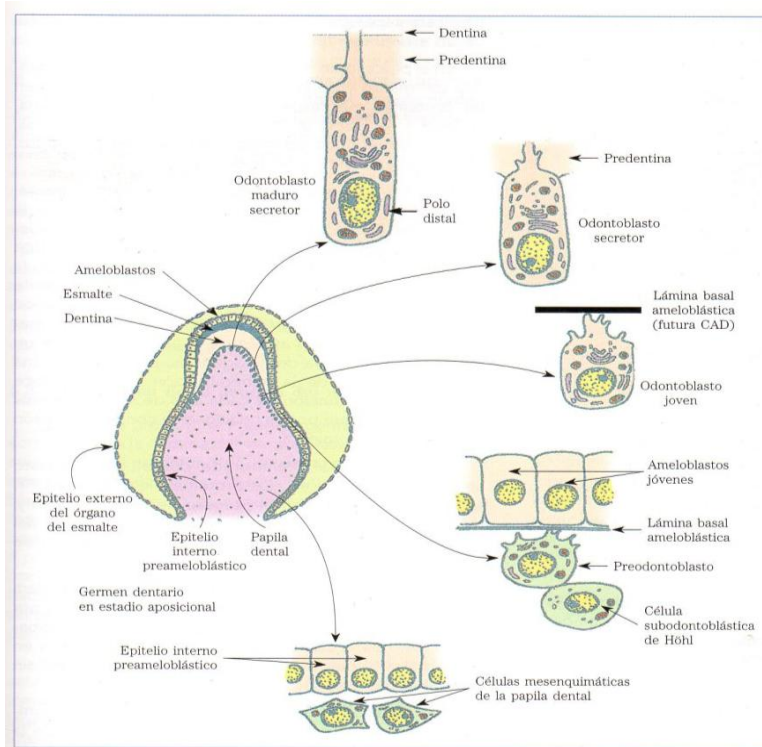


Figura: 2.11 Estadios de diferenciación de los odontoblastos.¹²

2.5.2. Regeneración de dentina mediante células madre de la pulpa dental

La regeneración de la dentina tiene que ver mucho con la regeneración de la pulpa ya que a partir de CM ésta genera dentina reparativa y a su vez propiamente dentina. En el año 2000 se encontró que las células pulpares son trasplantadas con hidroxapatita y fosfato tricálcico en ratones inmunocomprometidos, generaban estructuras similares a la dentina, con sus

fibras de colágena perpendiculares a la superficie que se encuentra mineralizada, tal como ocurre en las investigaciones *in vivo*, en presencia de la sialoproteína mineral y en otro estudio en 2004 se demostró que la dentina desmineralizada puede inducir la diferenciación de las CM pulpaes en odontoblastos, lo cual va a resultar en la formación de dentina. (Figura: 2.12) 14, 7



Figura: 2.12 Reparación de la dentina estimulada por células madre.⁷

Otro factor de importancia es un andamio que sirva como una matriz extracelular temporal para que exista una óptima función, nutrición, adhesión, proliferación, señalización celular y esto se va a conseguir inoculando células en la dentina, para así permitir el crecimiento de las células en el material, que finalmente terminará desarrollándose como un tejido normal y funcional. En estudios realizados por Valencia y cols, muestran la habilidad de las CM pulpaes de diferenciarse en odontoblastos para reparar daños a la dentina y demostraron que las proteínas morfogenéticas formadoras de hueso (BMP) pueden regular la diferenciación de CM pulpaes en odontoblastos y estimular la formación de dentina reparativa.^{14, 7, 6}



2.6. Esmalte

Es una sustancia dura protectora también llamada adamantino o sustancia adamantina, que recubre toda la corona del diente, ofreciendo protección al tejido dentino-pulpar ya que también es el tejido más duro del organismo por sus millones de prismas mineralizadas y resiste la fractura durante el estrés masticatorio. Esta dureza se debe a que posee un 96% de matriz inorgánica microcristalina que son los cristales de hidroxiapatita, formados por fosfato de calcio, un 3% de agua y un 0.36% de matriz orgánica. El esmalte maduro no contiene células ni prolongaciones celulares, frente a una enfermedad, el esmalte reacciona con pérdida de sustancia, siendo incapaz de repararse, su forma de reaccionar ante cualquier agente físico, químico o biológico es con pérdida de sustancia. En sus propiedades físicas posee **dureza**, se da al obtener un porcentaje elevado de materia inorgánica, que son los cristales de hidroxiapatita, la **elasticidad** es muy escasa debido a su extrema dureza, pues la cantidad de agua y sustancia orgánica que posee es muy reducida, el **color y la transparencia** se da porque es esmalte es translúcido, su color varía entre un blanco-amarillento y un blanco-grisáceo, pero este color no es propio del esmalte sino que depende de las estructuras subyacentes, en especial de la dentina, la **permeabilidad** es escasa, aún así hay un transporte molecular como iones de fluoruro y la **radiopacidad** que es muy alta ya que es la estructura más radiopaca del organismo humano por su alto grado de mineralización.^{13, 12}

2.6.1. Amelogénesis

Es una serie de procesos los cuales originará el esmalte. Dichos procesos consta de dos fases que es 1) la elaboración de matriz orgánica extracelular y 2) la mineralización casi inmediata de la misma que conlleva a la formación, nucleación y elongación de los cristales y la eliminación de la matriz orgánica y maduración del cristal. Los ameloblastos pasan por fases que son la morfogénesis, organización, diferenciación, secreción, maduración y protección. En la mineralización el estadio A) inicialmente se va formando el esmalte, B) el esmalte inicial se calcifica a medida que se forma más esmalte, C) se producen más incrementos, D) prosigue el depósito y la mineralización de la matriz y en E y F) la matriz se forma a los lados en unas áreas cervicales de la corona. (Figura: 2.13) 13,12

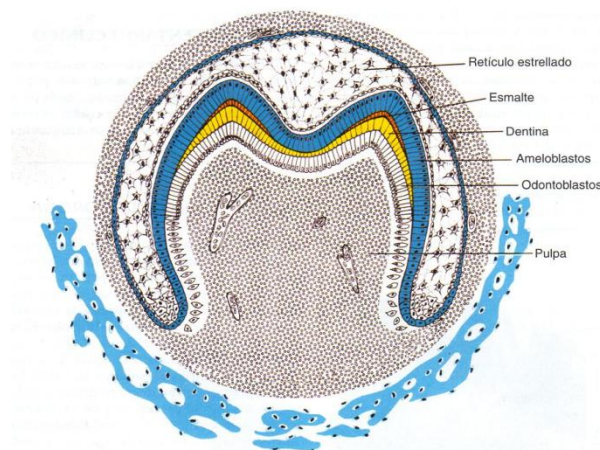


Figura: 2.13 Capa secretada por ameloblastos subyacentes en los vértices de las cúspides.¹³



2.6.2. Regeneración del esmalte mediante células madre de la pulpa dental

El esmalte se considera el material más duro y resistente del organismo, éste no contiene células por lo que no es capaz de regenerarse. Se han hecho investigaciones donde se ha creado esmalte que imita a la formación de prismas, que no son compuestos por hidroxiapatita, sino que la bioingeniería los ha llamado nanopatitas. Estos resultan ser muy similares en tamaño y composición a los cristales de hidroxiapatita. Investigaciones de Hanks y cols, destacan que las CM de la pulpa pueden formar nódulos mineralizados *in vivo*, distintos a la del esmalte mineralizado, estos fueron evaluados con espectrometría infrarroja y microscopía óptica de rayos X, en un medio de ácido ascórbico, dexametasona y fosfato en altas concentraciones. Aún faltan muchos estudios e investigaciones para poder formar esmalte *in vivo e in vitro* aunque existen investigaciones de la creación de esmalte en ratones inmunocomprometidos, pero su posible terapéutica en seres humano aún es escasa.^{7,6}

2.7. Ligamento periodontal

Las células que rodean al diente se le conoce como folículo dental y algunas de estas células, que se encuentran adyacente al órgano del esmalte, migran en la periferia durante los estadios de caperuza y campana, desde el órgano del esmalte migran hacia el folículo para desarrollar hueso y ligamento periodontal. Es una capa delgada de tejido conectivo fibroso, que por medio de sus fibras, une al diente con el hueso alveolar. Sus principales fibras que se



insertan por un lado, en el cemento, y por el otro, en la placa cribosa del hueso alveolar. Las funciones principales son soportar, resistir las fuerzas de masticación, mantener suspendido el diente en su alvéolo, actuar como receptor sensorial propioceptivo y la función de mantener un control posicional en la mandíbula y una correcta oclusión. Se va a ubicar en el espacio periodontal, que está localizado entre la posición radicular del diente y la posición compacta periódontica de hueso alveolar. El fibroblasto es el más abundante en el ligamento y es la célula que produce la sustancia que conforma el tejido conectivo, incluido el colágeno, los proteoglucanos y la elastina.^{13, 12}

2.7.1. Regeneración de ligamento periodontal mediante células madre de la pulpa dental

Se han realizado estudios donde al intentar formar un diente completo se ha generado tejido como dentina, hueso, pulpa y periodontal, pero en muy escasos estudios, lo que si se ha investigado más a profundidad, CM en ligamento periodontal ya que en 2004 Seo y cols reportaron la presencia de CM en el ligamento periodontal humano. Estas células fueron capaces de diferenciarse en precementoblastos, adipocitos y células formadoras de colágeno. En este estudio las células fueron cultivadas *in vitro* e implantadas subcutáneamente en la superficie dorsal área periodontal de 12 ratones inmunocomprometidos. Después de 6 semanas los investigadores encontraron que estas células expresan marcadores de CMM STRO-1 y CD146/MUC18 *in vitro*, y que pueden diferenciarse en cementoblastos, adipocitos y fibroblastos.



Se observó *in vivo*, en ambos grupos de roedores, la capacidad de las células del ligamento para generar cemento y reparar el tejido periodontal. Así que esto abre aún más la posibilidad terapéutica de regenerar tejido destruido durante la enfermedad periodontal.^{14, 50}

Otra investigación por Tzong y cols que decidieron llevar a cabo la regeneración de tejidos dentinarios y pulpares, por medio de las CM pulpares, con el propósito de saber si estas estructuras, al ser trasplantadas en mandíbulas de cerdos, tenían algún tipo y función. Utilizaron un andamiaje a base de tri-copolímero y estas demostraron la regeneración de un diente con formación de ligamento periodontal, raíz, pulpa, dentina e incluso cemento (Figura: 14). La regeneración periodontal es un reto para la búsqueda del tratamiento de la periodontitis crónica y actualmente se utilizan estructuras donde se inoculan CM con factores de crecimiento, para así poder obtener cementoblastos, osteoblastos y fibroblastos.^{14, 54, 55}

No existen muchos estudios en donde las células madre de la pulpa dental puedan regenerar ligamento periodontal, en cambio existen otras investigaciones donde se han encontrado células en el ligamento periodontal que pueden reparar el mismo tejido. Se han creado tejidos dentales *in vivo* por medio de las CM de la pulpa donde regeneran, dentina, pulpa, ligamento periodontal, pero en conjunto.^{14, 6, 56, 57}



2.8. Cemento radicular

Tejido conectivo mineralizado, que deriva de la capa celular ectomesenquimática del saco o folículo dentario que rodea el germen dentario. A semejanza del esmalte, el cemento cubre la dentina, aunque sólo en porción radicular y tiene como función principal anclar las fibras del ligamento periodontal a la raíz del diente. El cemento es similar al hueso alveolar, ya que su dureza y composición son químicamente similares.¹²

2.8.1. Regeneración de cemento radicular mediante células madre de la pulpa dental

Estudios comentan que al colocar CMPD en el área a tratar han detectado tejido mineralizado similar al cemento radicular. Sin embargo estudios registrados han aislado varias proteínas del cemento como la proteína 55kDa conocida como proteína de adhesión al cemento (CAP), una proteína que está relacionada y derivada del cementoblastoma humano (CP). El CEMP1 es un nuevo componente cemento y la presencia del cual parece estar limitada a cementoblastos y sus progenitores. Para entender la función de CEMP1, se investigó en Escuela Superior de Tokio la Universidad Médica y Dental de Tokio, que la proteína CEMP1 expresión durante la diferenciación de células del ligamento periodontal humanos, fosfatasa alcalina de células del ligamento periodontal expresa preferentemente CEMP1. La sobreexpresión de la CEMP1 en células del ligamento periodontal aumentó la diferenciación de cementoblastos y fenotipos periodontales. Los estudios demuestran que por



primera vez la CEMP1 No sólo es una proteína marcadora de los cementoblastos, sino también regula el compromiso del cementoblasto de las células del ligamento periodontal. Ésta proteína está asociada al proceso de mineralización ya que regula la composición y morfología de los cristales de hidroxiapatita, también regula la regulación de la osteopontina, proteína que está relacionada al proceso al mismo proceso de mineralización. Por tal razón esta proteína juega un papel muy importante en el proceso de cementogénesis y posteriormente con más estudios realizados sobre esta proteína, y conociendo sus características morfológicas nos abre la puerta al mundo de la regeneración de tejidos que conforman en periodonto y tejidos mineralizados.^{58, 59, 60}

2.9. Hueso alveolar

El primer arco faríngeo da origen al hueso alveolar y maxilar. Es un tejido conectivo mineralizado de origen ectomesenquimático y se forma del saco o folículo dentario. Cubre y protege la totalidad de la superficie radicular del diente desde el cuello hasta el ápice. Es un hueso compacto con múltiples y pequeñas perforaciones, a través de las cuales pasan los vasos sanguíneos, los nervios y los vasos linfáticos.¹²

2.9.1. Osteogénesis del hueso alveolar

El hueso alveolar tiene un mecanismo de osificación llamado yuxtaparacondral (Figura 2.14), que en el cartílago de Merkel, denominado cartílago primario, sirve como guía pero no participa. La osificación se efectúa en forma de una

estructura paralela y ubicada a lado del cartílago. El inicio de la formación del hueso se produce a las seis o siete semanas, e inicia como un anillo óseo alrededor del nervio mentoniano y luego las trabéculas se extienden hacia atrás y hacia adelante, en relación externa al cartílago de Meckel. El hueso embrionario del cuerpo de la mandíbula tiene un aspecto de canal abierto hacia arriba, donde se aloja el paquete vasculo-nervioso y los gérmenes dentarios en desarrollo. Al avanzar la osificación del cartílago de Meckel, crece excepto a nivel de la sínfisis mentoniana, así la formación del cuerpo de la mandíbula finaliza en la región donde el paquete vasculo-nervioso se desvía hacia arriba. A las doce semanas aparecen en el mesénquima otros centros de cartílago de Meckel, que juegan un papel muy importante en la osificación endocondral de la rama del maxilar.^{12, 13}

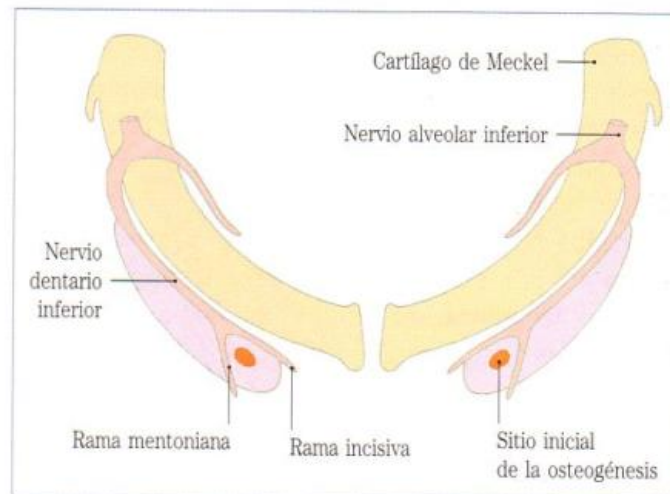


Figura: 2.14 Osificación yuxtaparacondral de la mandíbula.¹²



2.9.2. Regeneración de hueso alveolar mediante células madre de la pulpa dental

En 2001 Mankani ha mostrado la efectividad de las CM en reparación ósea de modelos animales, donde son reproducidas en laboratorio y trasplantadas localmente al sitio del defecto óseo. En un futuro las CM serán capaces de producir tejido óseo del complejo cráneo-facial para reparar defectos producidos por enfermedades degenerativas, ya que pueden ser una alternativa para tratar las deficiencias mandibulares, trastornos de la ATM y la fisura del paladar y labio hendido. También fueron utilizadas para mejorar la regeneración tras las extracciones de terceros molares, se colocaron CMPD en matrices y andamios de colágeno de los mismos terceros molares y se compararon las densidades óseas con otra zona de extracción (Figura: 2.15- 2.16), en 7 días se apreciaba como en el lado de la matriz de las células madre, existía mayor densidad ósea. Estos estudios se revisaron tres meses después y se dieron cuenta que había una arquitectura adecuada, vascularizada y organizada. Esto comprueba que con una matriz adecuada y con CM pulpaes se puede conseguir eficazmente la regeneración ósea. Sólo se pudo realizar 7 veces más este procedimiento a pesar de los resultados favorables que presentó y posteriormente se pretende realizar el mismo estudio en una población más amplia.^{61, 14}



Figura: 2.15 Extracción de la pulpa dental. Se coloca una esponja de colágeno sin CM y se sutura.¹⁴



Figura: 2.16 Extracción del tercer molar. Se coloca una esponja de colágeno y entre la esponja y se forma un biocomplejo. Se sutura.¹⁴

2.10. Regeneración de un diente completo mediante células madre de la pulpa dental

El desarrollo de dientes es el resultado de interacciones recíprocas entre el mesénquima y las células epiteliales, en donde el epitelio provee la información necesaria para la iniciación y determinación de la forma. Basados en esta afirmación, Ohazama y cols en el 2004, recombinaron las células del epitelio oral con CM pulpares y la médula ósea adulta. Este tejido recombinado fue posteriormente inoculado en mandíbulas de ratones, las cuales se mostraron capaces de formar estructuras dentales, si estaban



adecuadamente estimuladas. Algunos autores utilizan una estrategia con un método de agregación celular o desarrollo biológico que consiste en la unión de células mesenquimales y células epiteliales para formar una pieza dentaria, la cual consiste en cultivar colágeno, células de odontoblastos, ameloblastos y fibroblastos, para la creación de la nueva pieza. En este método se utilizaron células madre de incisivos y molares dentales en la capa sub-renal de ratones de laboratorios con bioingeniería y se llegó a la conclusión que siendo una pieza única radicular, es más fácil de crear que una multiradicular. Según Yu y cols en el 2007 al estudiar la capacidad de regeneración de las CM de la médula ósea, compararon con las CM pulpares y concluyeron las de la pulpa poseen una mayor capacidad odontogénica. Para conseguir la regeneración de un diente biofuncional es necesario conocer el proceso de crecimiento y desarrollo de éste, hoy en día la ingeniería tisular basada en CM, ha determinado que para generar un diente entero, la fuente de células tiene que ser de un germen dentario, sin embargo para reparar parte de algún tejido dentario, podrían ser necesarios uno o dos tipos de CM.^{6, 7, 52}



Capítulo III

3. Aislamiento y criopreservación

Las CM son aisladas temporalmente, como lo recomiendan varios estudios para así confirmar la salud de éstas, posteriormente multiplicarlas en grandes cantidades y ser criopreservadas a bajas temperaturas para ser utilizadas en un futuro.

3.1. Definición de criopreservación

La criopreservación es el depósito, congelamiento y almacenamiento de CM, estas células son congeladas a temperaturas de -190°C . A esta temperatura las células se conservan vivas pero inanimadas, lo que permite que se conserven en buen estado para su utilización futura. (Figura: 3.1) 62, 63



Figura: 3.1 Células en criopreservación.⁶⁴

La criobiología se refiere a entender los efectos que causan las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares (Figura: 3.2), ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo, ya que enlentece estas reacciones.⁶³



Figura 3.2 Células madre a bajas temperaturas.⁶⁵

3.2. Antecedentes históricos de aislamiento y criopreservación

Accidentalmente se descubrió, la capacidad del glicerol para proteger las células del daño por congelamiento y se ha demostrado que tiene dos componentes, el daño directo de los cristales de hielo y el daño secundario, causado por el aumento de la concentración de solutos. La congelación intracelular es letal, pero generalmente se puede evitar por enfriamiento suficientemente lento, y bajo las condiciones habituales. Sin embargo, el hielo extracelular juega un papel importante en los tejidos. Los crioprotectores



actúan principalmente mediante la reducción de la cantidad de hielo que se forma en cualquier temperatura bajo cero. Si se podría introducir suficiente crioprotector, la congelación se evitaría por completo y un estado vítreo puede ser producido, pero el daño tóxico y osmótico, causado por las altas concentraciones de crioprotector que se requiere, podría convertirse en problemas serios. La caracterización de la criobiología del espermatozoide comenzó hace unos 20 años, donde se determinaron diferentes parámetros de los espermatozoides, entre los cuales se encuentran los cambios bioquímicos, estatus energético, integridad de la membrana, temperatura de transición de fase de la membrana lipídica, integridad de elementos subcelulares y morfología de acrosoma. El desarrollo de las técnicas de criopreservación ha tenido un enorme impacto en muchos campos, sobre todo en la medicina reproductiva.^{63, 49}

3.3. Generalidades de aislamiento y criopreservación

El aislamiento y la criopreservación tienen como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y la funcionalidad celular a bajas temperaturas, por tanto la criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre las células, ya que el tiempo biológico es consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío enlentece estas reacciones.⁶³

Sin embargo este no es un proceso exento de problemas, ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y



la interacción célula-célula en los tejidos a criopreservar. Por lo tanto la estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, como es su comportamiento durante la congelación y la descongelación que definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos difíciles durante la congelación para la vida de la célula, es la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas. Al ya entender y aplicar adecuadamente la criopreservación hoy en día, hay una especial atención a la conservación de tejidos, órganos y embriones humanos, para utilizarlos en la investigación y su posterior aplicación terapéutica (trasplantes) llegando a crear verdaderos archivos biológicos. Las células tienen diferente tamaño, manejan diferente composición de solutos y en general el éxito de la criopreservación está correlacionado con la complejidad de los sistemas biológicos congelados. La membrana plasmática de la célula, tiene una estructura muy organizada, según el modelo de mosaico fluido, estas membranas se componen básicamente de lípidos anfipáticos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos, que varía depende al tipo y especie celular. El transporte a través de las membranas es el punto decisivo para la supervivencia celular en posdescongelación. Las membranas son las que sufren más daño en la etapa de congelación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos.^{62,63}



3.3.1. Agentes crioprotectores

Son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto de solidificación de una solución dada. Se pueden clasificar como crioprotectores, de alcoholes, azúcares y dimetil sulfóxido. También se pueden clasificar de acuerdo a su permeabilidad celular en agentes penetrantes y no penetrantes. Los penetrantes son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. El más utilizado es el dimetil sulfoxido que es hidrosoluble, de bajo peso molecular, desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras se ha utilizado como uno de los mejores crioprotectores. Entre otros crioprotectores penetrantes encontramos el glicerol y el propanediol. Los agentes no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, muy efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes para ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son la sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano.^{62, 63}

3.3.2. Métodos de criopreservación

Estos los podemos clasificar de acuerdo a la velocidad del congelamiento y descongelamiento en protocolos de congelación de las cuales, las adiciones del crioprotector suele hacerse por varios pasos y al bajar la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable, por lo tanto la descongelación rápida se hace velozmente a temperatura ambiente o a baño de agua a 30°C. La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la



congelación de embriones, por Trouson en 1986, lo cual implica la rápida deshidratación celular.⁶³

3.4. Bancos de criopreservación

Son centros de almacenamiento para muestras de cultivos celulares, con la finalidad de aislarlas y criopreservarlas para su uso futuro.^{63, 66}

3.4.1. Banco de ovocitos

Los primeros bancos de criopreservación, fueron el de los ovocitos ya que la condición de esterilidad posterior a quimioterapia o radioterapia en patologías neoplásicas, puede ser evitada con la criopreservación de ovocitos, adicionalmente, mujeres que sufren patologías del sistema reproductivo o mujeres que desean alargar la maternidad, y asegurar su potencial de fertilidad usando esta técnica.⁶³

3.4.2. Banco de espermatozoides

Existe también el banco de espermatozoides, y a pesar de que fueron las primeras células criopreservadas, aún hay investigaciones para intentar mejorar la sobrevivencia de estas células en pacientes con infertilidad y problemas oncológicos. Y con el paso de los años y nuevas investigaciones se han abierto más posibilidades de criopreservar gran variedad de células, entre



las cuales ya existe la posibilidad de criopreservar células madre de la pulpa dental, cerebro, médula ósea, cordón umbilical, sangre etc.^{63, 15}

3.4.3. Banco de células madre de la pulpa dental

El Banco de células madre llamado Bioeden en Austin Texas, es uno de los más reconocidos a nivel mundial y cuenta con el aislamiento y criopreservación de CMPD para su uso terapéutico en un futuro.⁶⁶

Sin embargo para que las CM del diente sean criopreservadas hay un proceso inicial, que el cirujano dentista debe llevar a cabo. Si un paciente desea criopreservar sus células para utilizarlas posteriormente, en alguna de las enfermedades de su propio organismo, sin temor al rechazo, tales como la piel, huesos, músculos, corazón e incluso cerebro, podrá disponer de ellas, hasta 20 años, ya que constan de esa viabilidad las células madre.^{63, 66}

El Banco de células proporcionará un kit de recolección, que consta de la caja de empaquetado, el tubo colector, la etiqueta de identificación y los paquetes de gel.⁶⁶

3.4.3.1. Guía de extracción

En la guía de extracción el primer paso que dará el cirujano dentista será llenar con leche entera de vaca pasteurizada el tubo colector, el siguiente paso será enjuagar la boca del paciente con algún antiséptico (Listerine, Duclonato de

clorhexidina) durante un minuto, posterior al enjuague, el cirujano realizará la extracción normal, donde no será necesario enjuagar el diente, ya que la sangre ni la anestesia interfieren con el proceso de criopreservación. Lo siguiente será colocar inmediatamente el diente en el tubo colector que previamente contiene la leche, cerrarlo perfectamente y colocar la etiqueta con los datos requeridos, que son el nombre del paciente, nombre del tutor en caso requerido, o caso que el paciente es menor de edad y la fecha del nacimiento. Finalmente se colocará el tubo colector al refrigerador, en lo que éste es recolectado para su envío al laboratorio, es muy importante sólo refrigerarlo y no congelarlo (Figura: 3.3). El diente debe ser sano, sin caries profundas, abscesos y si el paciente presenta caries incipientes, retirarlas dentro de boca. Nos menciona el laboratorio que cuenta con sólo 72 horas para que el diente llegue al banco en buenas condiciones y poder hacerse el procedimiento.⁶⁶

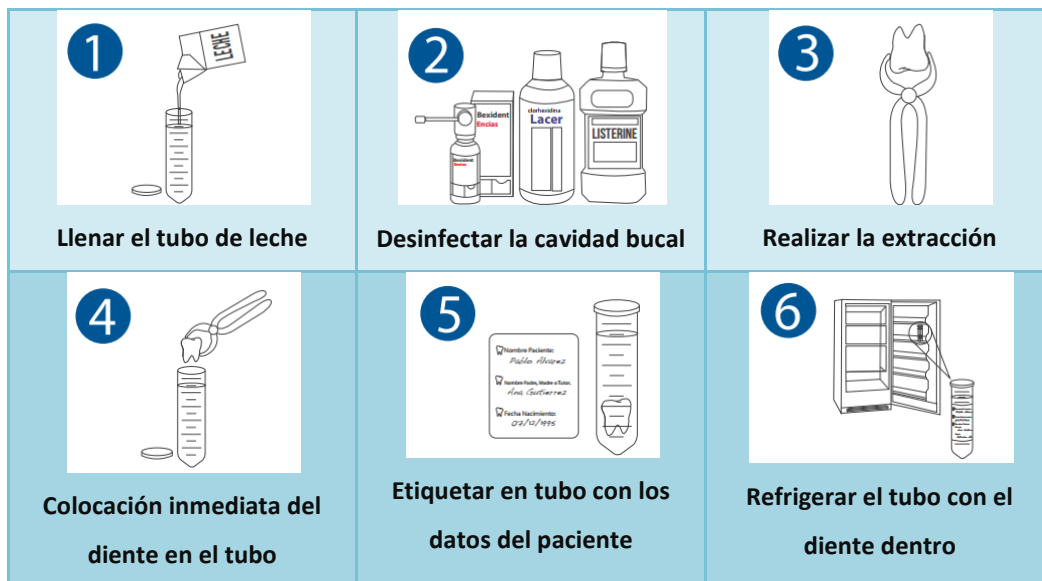


Figura: 3.3 Guía de extracción para el cirujano dentista.⁶⁶

3.4.3.2. Guía de empaquetamiento

Finalmente existe una guía de empaquetamiento ^(Figura: 3.4) para que la muestra posteriormente ser enviada al laboratorio, la cual consiste en simples y sencillos pasos, para mantener protegido el empaque lo mejor posible.⁴⁰

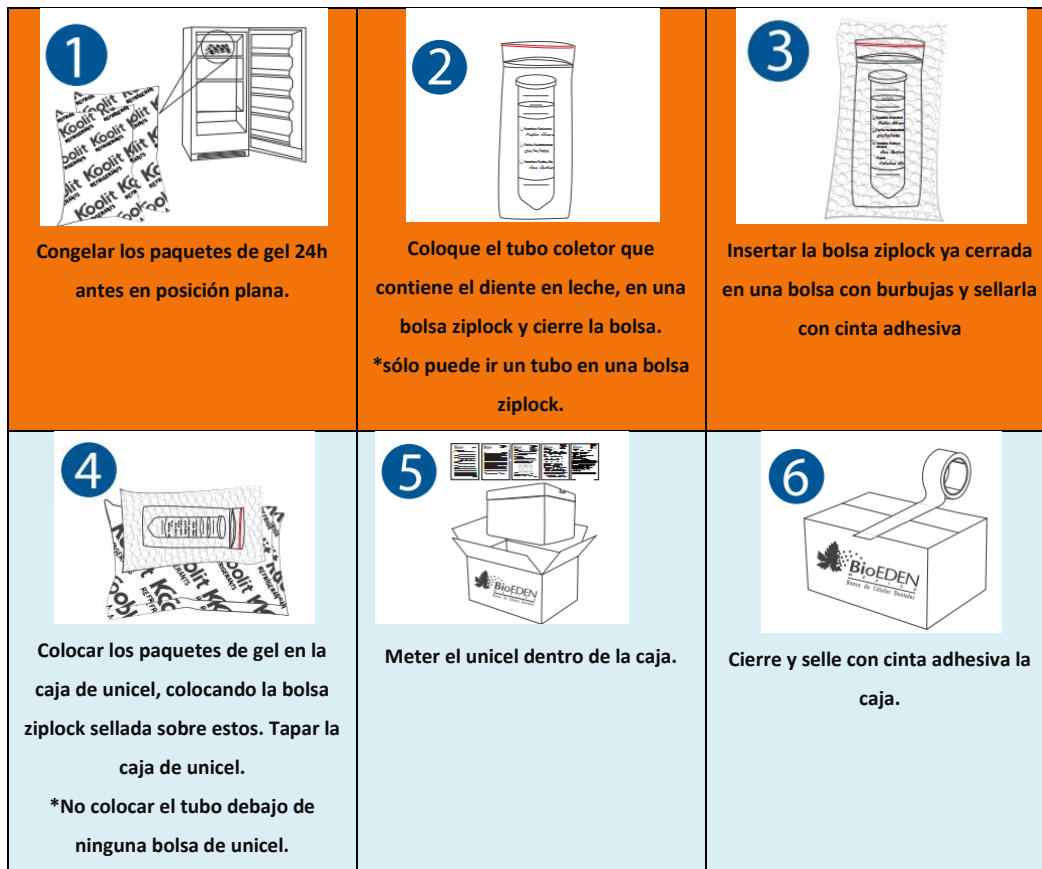


Figura 3.4 Guía de empaquetamiento.⁶⁶



3.4.3.3. Leche entera pasteurizada como medio de transporte

Hace varios años la leche se ha utilizado como corto transporte idóneo de los dientes, además que es fácil adquirirla, también contiene varias ventajas para el transporte de este tipo de tejido.⁶⁶

Bieoden nos menciona que la extracción del diente se tiene que llevar a un medio le leche de vaca pasteurizada, esto es porque la osmolaridad y el pH es similar al tejido dental. Al ser comparada con otros medios, la leche conserva viables las células por más tiempo y al mantener la leche en refrigeración se maximiza la durabilidad de la vida celular, hasta 120 horas sin perder su viabilidad y funcionalidad. Finalmente la leche entera de vaca contiene gran cantidad de elementos, antivirales, antibacteriales y antimicrobianos que mantienen el diente y las CM en un estado excelente antes de su procesamiento.⁶⁶

3.5. Criopreservación de las células madre de la pulpa dental

El nuevo interés en la ingeniería de los tejidos es el empleo de las CM aisladas en los tejidos adultos y actualmente la inclinación en el uso terapéutico de las CM en la terapia de regeneración de los tejidos dentales.¹⁵



Bioeden nos proporciona 6 etapas de seguimiento del proceso de laboratorio para el aislamiento y la criopreservación que consta de una duración de 21 días, para llegar al término del procedimiento ^(Figura: 3.5) Estas consisten en: ⁴⁰

	Etapa	Duración (días)	Descripción
1	RECEPCIÓN DEL DIENTE	0-1	Recepción y evaluación inicial por un equipo biólogos de biólogos.
2	EVALUACIÓN DE LABORATORIO	1-2	Iniciación del proceso de extracción celular.
3	TIEMPO EN CUARENTENA	4-6	El diente se remueve de cuarentena, donde todas las muestras son descontaminadas y examinadas.
4	PRESENCIA DE CÉLULAS	8-16	Se detecta actividad celular, que constantemente está en monitoreo. Esta será una indicación positiva, que nos informa que el proceso se está llevando correctamente.
5	PRUEBA FINAL	14-20	Las células madre al pasar todas las pruebas de criopreservación, serán confirmadas con buenas condiciones de salud y viables.
6	CRIOPRESERVACIÓN COMPLETADA	15-21	Se aíslan y criopreservan las células madre para su uso futuro.

Figura: 3.5 Etapas de seguimiento.⁶⁶

El proceso de laboratorio, consiste en que al recibir el diente se hace la desinfección previa del diente, la multiplicación celular, hacer pruebas de calidad a la célula y la criopreservación a largo plazo. (Figura: 3.6) ⁶⁶



Las pruebas de calidad son muy importantes ya que de esto dependerá si esa célula es útil, para la asegurar la calidad y aplicabilidad terapéutica para su uso futuro, si no se desecha. Todas las muestras que se conservan con Bioeden serán sometidas a estas pruebas y supervisadas por la FDA. En estas se verifica la **morfología** celular, lo que es la forma, el tamaño y el fenotipo del patrón de crecimiento celular, donde se percataarán del tipo de célula mesenquimal indiferenciada, también se verifica las **tasas de crecimiento** celular y se asegura que la tasa sea consistente con las células sanas, inmaduras e indiferenciadas, se requiere 800,000 células en 21 días, esta prueba detecta y elimina otro tipo de células que no se encuentran en la pulpa dental pero no son CM, en las pruebas de **contaminación**, se detecta la posible infección de bacterias, hongos o agentes virales en las células, también se constata la **diferenciación y multipotencialidad** celular, donde se confirma que las CM puedan generar células adiposas y óseas ya que ésta es una propiedad única de las CM multipotenciales y finalmente se confirma la presencia de marcadores en la superficie de la célula, que por medio de la tinción de



inmunofluorescencia, se hace presente el antígeno STRO-1 propio de las CM. Éstas se almacenarán en lugares separados para tener un mayor grado de seguridad y son almacenadas a una temperatura de -196°C .⁶⁶

En otros estudios realizados se aisló, se caracterizó y se indujo a la diferenciación celular, CM derivadas de extractos de la pulpa dental de premolares de pacientes jóvenes que fueron extraídos por cuestiones de tratamientos de ortodoncia. Por tanto las CM aisladas en los cultivos, formaron colonias clonogénicas después de 5 semanas de cultivo, presentando células con morfologías alargadas, aplanadas y fibroblásticas. Finalmente los resultados muestran que a partir de la pulpa dental es posible aislar CM adultas con características clonogénicas y también son capaces de recibir estímulos para inducir su diferenciación celular, formando tejido mineral similar al depositado con las células que darán origen a la dentina o tejidos mineralizados, como hueso y cemento radicular. Sin embargo aún no se conocen las señales necesarias para la diferenciación al fenotipo celular específico, por lo que la investigación actual está encaminada a investigar cuáles son los mecanismos moleculares involucrados en el tránsito de una población celular progenitora con característica de CM a una población comprometida hacia un linaje dental o célula diferenciada. Para este estudio se tomaron 5 pacientes sanos de ambos sexos, de entre 12 y 18 años de edad, que acudieron a la Clínica de Odontopediatría de la división de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. El tratamiento se basó en la extracción de los premolares en donde el tejido pulpar se extrajo de la cavidad y se colocaron en medio DMEM frío estéril.



Para llevar a cabo el aislamiento de las CM se colocaron en una solución de 3mg/mL de colagenasa tipo 1 y 4mg/mL de tripsina durante 10 minutos, pasando este tiempo de reposo se lavaron con medio DMEM con suero fetal bovino al 10% durante tres minutos. Los extractos de la pulpa dental se dejaron crecer en cajas de cultivo modificadas Eagle's suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina 100 UI/mL), estreptomycin (100mg/mL), fungisón (0.3mg/mL), 100 mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de piruvato de sodio, hasta obtener colonias clonogénicas aproximadamente de 2 a 5 semanas de cultivo. Este medio de cultivo se cambió cada tercer día, para garantizar el medio celular. Se demostró que poseen marcadores de membrana específicos de células progenitoras: STRO-1 Y CD-44, estos marcadores codifican para proteínas especializadas que actúan como receptores y tienen la capacidad de señalización o adhesión. Posteriormente los resultados arrojaron que a partir del tejido pulpar utilizando métodos de digestión enzimática, es posible aislar células o colonias individuales, después de un periodo de cultivo de 14 a 20 días donde muestran una morfología tipo fibroblástica, alargada y aplanada que se pueden ubicar en colonias clonogénicas, que es una característica esencial de las CM postnatales. Las CM se consideran células progenitoras capaces de responder a estímulos diferenciadores específicos y para confirmarlo se realizó un estudio de diferenciación *in vitro* donde se utilizó un estímulo que promoviera la formación de nódulos mineralizados por medio de dexametasona en los medios de cultivo celular y los resultados arrojan que las células que recibieron dexametasona son capaces de formar nódulos mineralizados, cuando se comparan con las CM cultivadas en ausencia de

estímulo mineralizante. (Figura: 3.7) Se encontró que las proteínas involucradas más importantes en el proceso de biomineralización son la sialoproteína ósea (BSP) y osteopontina (OPN).^{15, 52}

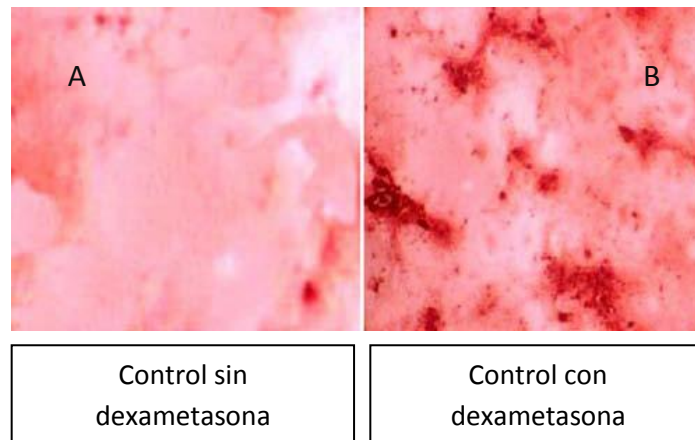


Figura: 3.7 Nódulos de fosfato de calcio depositados por células madre diferenciadas con dexametasona (B) y control (A) teñidos por alizarina S.¹⁵

La proteína con mayor expresión de BSP nos habla de diferenciación de las CM, ya que la BSP es una proteína involucrada en la nucleación de los cristales de hidroxiapatita y se presenta entre un 8 al 12% del total de proteínas no colágenas del hueso alveolar, cemento radicular, dentina y algunas subpoblaciones del ligamento periodontal. Finalmente se dio como resultado que las CM derivadas de la pulpa dental de dientes deciduos, células del ligamento periodontal y células madre mesenquimales de la médula ósea han sido diferenciadas hacia células osteoblásticas y/o cementoblásticas, expresando marcadores como BSP, OPN, osteocalcina, fosfatasa alcalina, colágena tipo I entre otras y bajo otros estímulos diferenciadores a células



adiposas, neuronales y musculares entre otras. Esto significa que las células de la pulpa contienen subpoblaciones celulares, son catalogadas como multipotenciales, con capacidad de diferenciación hacia un fenotipo mineralizante.^{15, 52}

3.6. Limitantes y dificultades para la criopreservación

Los tejidos y células con más dificultades para son criopreservar el testicular y el ovárico, pues su compartimentalización lo hace más complejo. En la criopreservación de los ovocitos, la condición de esterilidad posterior a la quimioterapia o radioterapia en patologías neoplásicas, puede ser evitada con la criopreservación de los ovocitos.⁶³

3.6.1. Criopreservación de ovocitos

La ovogénesis presenta cambios bioquímicos y estructurales en el núcleo, el oolema y el complejo oocito-granulosa, por lo tanto los elementos del citoesqueleto, la progresión del ciclo celular, la morfogénesis del huso, entre otros, son importantes factores determinantes para el desarrollo de protocolos de criopreservación específicos para cada estado de madurez. Los ovocitos son extremadamente sensibles a la temperatura por los cristales de hielo formados durante la congelación y descongelación, por tanto las cromátidas pueden ser afectadas durante estos procesos.⁶³

3.6.2. Congelación de espermatozoides

Estas fueron las primeras células en criopreservarse y pesar de esto los intentos de mejoramiento para su criopreservación aún es objeto de estudio e investigación, principalmente por la poca sobrevivencia de estas células en pacientes con infertilidad y problemas oncológicos. Y no hubo avances significativos hasta el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol en espermatozoides de toro, empezando así una opción viable para campos, como la reproducción asistida en humanos. (Figura: 3.8) 63



Figura: 3.8 Congelación de espermatozoides.⁶⁷

3.6.3. Congelación de embriones

En la congelación de los embriones humanos, tres medidas técnicas deben ser usadas para un mejor control del periodo inestable de cambio de fase en la solución que rodea al embrión y en el embrión mismo, las cuales son el control



de las tasas de congelación y descongelación, a medida que la tasa de enfriamiento aumenta, la probabilidad de que el hielo intracelular pueda formarse también aumenta. La crioprotección bioquímica ha sido demostrada para embriones humanos así como para otras células. Por lo tanto la congelación de embriones puede ser realizada en diferentes estadios de desarrollo, teniendo cada uno diferentes tasas de sobrevivencia, así como también ventajas y desventajas. Cada tipo de célula debe ser congelado conociendo su perfil biofísico, el cual dictará mediante ensayos de permeabilidad y volumen osmóticamente inactivo las diferentes soluciones criopreservantes (penetrantes y no penetrantes) y el mejor protocolo de criopreservación de esa célula.⁶³

3.6.4. Inconvenientes en células madre en la pulpa dental

Esto puede llegar a pasar en ocasiones, en cualquier procedimiento biológico y puede deberse a distintos factores como el tiempo que estuvo en aflojamiento el diente en boca, el tiempo que pasa desde que se exfolia hasta que llega al laboratorio, también se debe al manejo del diente, el estado de salud e higiene del mismo.⁶⁶



CONCLUSIONES

En general, las CM son células capaces de formar cualquier tipo de tejido al diferenciarse, con la estimulación apropiada. Las CM del adulto tienen mayor fiabilidad porque no tienen riesgos de rechazo al paciente ya que son autólogas y no existe la formación de tumores. Hoy en día las podemos encontrar en diferentes tejidos como la piel, hígado, cordón umbilical, médula ósea, pulpa dental, entre otros y esto se debe que a medida que avanza el desarrollo embrionario, se van formando diferentes poblaciones celulares con potenciales de diferenciación cada vez más restringidos, a la edad adulta estas células sólo se encuentran en algunos tejidos. Desde hace algunos años, se han identificado CM en la pulpa dental, por lo tanto se han abierto investigaciones en la terapéutica de estas células para la regeneración de tejidos de la cavidad bucal, por ejemplo la dentina, que al inocular las células madre directamente en ella, tienen la capacidad de diferenciarse en odontoblastos y así poder regenerar este tejido, para esto es necesario el uso de proteínas como receptores unidos a la célula, que inducirán la proliferación celular o citodiferenciación. Otros estudios han mencionado que colocando CMDP con hidroxiapatita y fosfato tetracálcico en ratones inmunocomprometidos, generaban estructuras similares a la dentina, con sus fibras de colágena perpendiculares a la superficie que se encuentra mineralizada. Actualmente para poder generar pulpa dental a partir de CM, se trasplantan células al tejido vasculonervioso con células endoteliales, para la posterior formación de vasos sanguíneos y la pulpa en general, sin embargo, el tejido adamantino no se ha logrado expresar, con prismas de hidroxiapatita, pero se ha logrado crear con



bioingeniería un material parecido llamado nanoapatita. En el caso del ligamento periodontal se han encontrado CM pertenecientes al mismo tejido, las cuales lograron ser capaces de diferenciarse en precementoblastos, adipocitos y al mismo tiempo ser células formadoras de colágeno, reparar tejido periodontal y cemento, este último también se ha caracterizado, como un tejido mineralizado a partir de las CM de la pulpa. El hueso es parte importante de la cavidad bucal, por tal razón esto se ha llevado a la investigación la regeneración de este tejido, en estudios recientes se ha inducido su creación, trasplantando CM y andamios de colágeno, dando como resultado un tejido adecuadamente vascularizado y organizado, en donde el objetivo principal y más complejo de la regeneración de tejidos mediante CM de la pulpa dental, es crear por medio de la bioingeniería un diente con todos sus componentes, mediante CMPD y CM de la médula ósea, ya que éstas pueden ser capaces de formar estructuras dentales, si son adecuadamente estimuladas. Otro experimento en ratones de laboratorio se ha manejado este tipo de células para la regeneración de estos tejidos, el cual lograron la diferenciación de las CM en el complejo dentino-pulpar pero sin organización. Por tal motivo aún faltan muchas investigaciones, en donde se logre diferenciar de manera organizada y adecuada a las CM por medio de los marcadores de las proteínas y en un ambiente inocuo para el desarrollo y duplicación de estas células. La medicina regenerativa junto con la bioingeniería son los encargados de proporcionarnos más estudios e investigación, para que en un futuro sea posible, regenerar cualquier tipo de tejido, para poder llegar a la regeneración de un órgano dentario completo y poder generar con las células del propio cuerpo.



Sus múltiples estudios, las ha caracterizado por sus potentes capacidades de poder formar hasta un órgano faltante del cuerpo y llegar al entendimiento y a al tratamiento de enfermedades degenerativas, como el Alzheimer y Parkinson.

Las CM representan un cambio en la visión del organismo vivo, por lo tanto, hoy en día se trabaja rigurosamente para poder entender la diferenciación, ser capaces de dar órdenes necesarias, manipularlas para que trabajen correctamente en la regeneración y así dar origen a nuevas células especializadas, para su futura aplicación terapéutica.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gartner L. Hiatt J. **Texto Atlas de Histología**. 3ª ed. Mc Graw Hill Interamericana de México; 2008.
2. Jiménez L.F. **Conocimientos fundamentales de biología**. 3ª ed Pearson Educación. México D.F.; 2006.
3. Avers C. **Biología celular**. 2ª ed. Grupo editorial Interamericana. México D.F.; 1998.
4. Campus Visual de IBEP. **Simulador de Biología celular**.
<http://www.lbep.edu.co/campusvirtual/moodle/>.
Consultado en internet el 20 de septiembre del 2013 a las 20:38h.
5. Curtis H, Barnes N. **Biología**. 6ª ed. Panamericana. Buenos Aires; 2001.
6. Valencia R, Espinosa R, Saadia M, Velasco N, Huerta A. **Panorama actual de las células madre de la pulpa de dientes primarios y permanentes**. Rodyb. 2010 May; 36(11): 8-10.
7. Céspedes D, Perona M. **Futuro de la odontología restauradora**. Estomatología Herediana. 2010 Jun; 20(1): 44-48.
8. Castillo H. **Células madre de la pulpa dental**. AMD estudiantil. 2012 Jun; 6-9.
9. Rendón J, Jiménez L, Urrego A. **Células madre en la odontología**. Revista CES Odont. 2011; 24(1): 52-56.
10. Munévar N, Becerra A, Hernández A. **Biología de las células stem**. U.I.B.O. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2005: 95-105.
11. Arezola, clínica Dental. **Células madre dentales**.
<http://www.clinicaarezola.com/células-madre-dentales/>



Consultado en internet el 20 de septiembre del 2013 a las 21:30h.

12. Gómez F. ***Histología y Embriología bucodental***. 3ª ed. Panamericana. **Madrid, España; 2011.**

13. Avery J, Chiego J. ***Principios de Histología y Embriología bucal con orientación clínica***. 3ª ed. Mosby. Madrid, España; 2007.

14. Sanguino D, Carrión J. ***regeneración de tejidos orales mediante células madre***. Gaceta dental 231. 2011 Dic; 94-106.

15. Magallanes M, Carmona B, Álvarez M. ***Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental***. Revista Odontológica Mexicana. 2010 Mar, 14; 15-20.

16. A sigth om the inside MAKKA. ***Some of my 3D artworks***.

<http://www.Makadiseno.blogspot.mx/2009/11/algunos-de-mis-trabajos-en-3d-some-of.html>

Consultado por internet el 22 de Septiembre del 2013 a las 5:35h.

17. Brock M, Mchael T. ***Biología de los microorganismos***. 12ª ed. Panamericana. Madrid, España; 2009.

18. Lazcano J. ***El origen de la vida. Evolución química y evolución biológica***. 9ª ed. Manual Moderno. México D.F; 2000.

19. Biología: la ciencia de la vida. ***Estructura básica de la célula***.

<http://www.Biología-lacienciadelavida.blogspot.mx/2010/04/estructura-basica-de-la-celula-4-ano-html>

Consultado en internet el 24 de Septiembre del 2013 a las 21:39h.

20. Laguna J. ***Bioquímica de laguna***. 7ª ed. Manual moderno. México D.F; 2013.



21. La ciencia y sus demonios. **Origen evolutivo de las membranas eucariontas.**

<http://www.lacienciaysusdemonios.com/2010/01/29/el-origen-de-las-membranas-euca/>

Consultado en internet el 28 de Septiembre del 2013 a las 20:21h.

22. Duiops. **Morfología de una célula eucarionta.**

http://www.duiops.net/seresvivos/celula_moto_

Consultado el 28 de Septiembre del 2013 a las 21:34h.

23. Geneser F. Histología Ed. Médica Panamericana 2000, 3ª ed.

24. Cells II. Celula organization. **The nucleos.**

<http://www2.estrellamountain/facultad/farabeel/BLOBK/biobookcell2.html>

Consultado el 5 de Octubre del 2013 a las 23:07h.

25. El cuerpo humano. **El núcleo de la célula.**

<http://www.elcuerpohumano.blogspot.mx/search/label/nucleo%segun2celular>

Consultado el día 4 de Octubre del 2013 a las 19:20h.

26. Metodos avanzados en biología celular y genética, departamento de Bio.Mol UAM. **El citoesqueleto.**

http://www.cbm.uam.es/cmurgalclasesMBF/citoesqueleto_2011.pdf

Consultado el día 5 de Octubre del 2013 a las 20:20h.



27. Cells II. Celular organization 2010. ***The cytoplasm***

<http://www2.estrellamontain/faculty/farabee/BIOBK/biobookcell2.html>

Consultado el día 5 de Octubre del 2013 a las 21:30h.

28. La base de la herencia. ***La expresión génica.***

<http://www.rekursostic.es/ciencias/biosfera/web/alumno2bach./lerato/genetica/contenido12.htm>

29. Zoraidarojasnivelcelular. ***La célula.***

<http://www.zoraidarojasnivelcelular.wordpress.com/s-2/>

Consultado el día 7 de Octubre del 2013 a las 14:35h.

30. Escuelapedia información didáctica. ***Retículo endoplasmico.***

<http://www.escuelapedia/reticuloendoplasmico/>

Consultado el día 8 de Octubre del 2013 a las 8:50h.

31. Wikipedia. ***Aparato de Golgi.***

http://www.es.wikipedia.org/wiki/Aparato_de_Golgi

Consultado el día 7 de Octubre del 2013 a las 19:35h.

32. Mirada biológica de la vida. ***La célula.***

<http://www.mirada.biologica.blogspot.mx/2013/03/la-celula-html>

Consultado en internet el día 7 de Octubre del 2013 a las 20:05h.



33. Guía metabólica. ***¿Cómo se forma un peroxisoma?***

<http://www.guiametabolica.org/informacion/¿como-se-forma-peroxisoma?enfermedad=395>

Consultado en internet el día 9 de Octubre 2013 a las 13:20h.

34. Salud y calidad.com. ***Glutación mitocondrial, un antioxidante clave.***

<http://www.blog.saludycalidad.com/glutation-mitocondrial-un-antioxidante-clave>

Consultado en internet el día 13 de Octubre del 2013 a las 12:43h.

35. BIOLÓGICAS y educación para la salud. ***Células eucariontes.***

<http://www.hnncbiol.blogspot.mx/08/01/celulas-eucariontes.html>

Consultado en internet el día 15 de Octubre del 2013 a las 18:33h.

36. Biogenmol, la ciencia de la vida. ***Ciclo celular.***

<http://www.biogenmol.blogspot.mx/2008/08/ciclo-celular.html>

Consultado en internet el día 16 de Octubre del 2013 a las 15:15h.

37. Fundación Ana Vázquez. ***La mitosis.***

<http://www.fundacionanavazquez.wordexpress.com/2007/12/13/mitosis/>

Consultado en internet el día 16 de Octubre del 2013 a las 14:20h.

38. EL PAÍS, BLOGSOCIEDAD. ***El suicidio celular que nos mantiene con vida.***



<http://blogs.elpais.com/la-doctora-shora/2011/12/el-suicidio-celular-que-nos-mantiene-con-vida.html>

Consultado en internet el día 17 de Octubre del 2013 a las 15:45h.

39. Prosper F, Verfaillie C. **Células madre adultas**. ACAVI. Servicio de hematología y Área de Terapéutica celular. 2003; 26(3): 35-64.
40. Giraldo J, Madero J, Ávila M, Cuneo S, López C, Escobar M, et al. **Las células madre**. Revista colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2013; 2(54): 54-62.
41. Montiel E, Montiel F. **Origen y migración de las células troncales**. Int J. Morphol. 2012; 30(4): 1332-1337.
42. Flores E, Montesinos J, Mayani H. **Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica**. Revista RIC. 2006 Ago; 58(5): 498-511.
43. Patología del aparato locomotor. **Co-cultivo de células madre adultas mesenquimales y células de shwann en presencia de membranas de policarbonato**.

http://www.fundacionmapfre.org/fundacion/es_es/prevencion-salud-medio-ambiente/publicaciones-y-estudios/revistas/otras-publicaciones/revista-patologia-aparato-locomotor/revista-patologia-aparato-locomotor.jsp



44. Cruañas A, Martínez E, Bermudo C. **Estomatología regenerativa de las células madre a la Ingeniería tisular.** Revista Científico Estudiantil de las Ciencias Médicas de Cuba 2008 Abr: 48-59.

45. Arias M, Felmer R. **Biología de las células madre embrionarias(ES Cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina.** INIA Carrillanca. 2004 Ene 21; 41: 185-195.

46. Biología Bachillerato. IES. Fuentes nuevas. **Células madre troncales (Stem cell).**

<http://www.espacios.liceocervantesroma.ne/bigeo/files/2013/01>

Consultado en internet el 14 de Octubre del 2013 a las 12:38h.

47. Munévar J, Becerra A, Bermudez C. **Aspectos celulares y moleculares de las células madre involucradas en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica.** Acta Odontológica Venezolana. 2008; 46(3); 1-6.

48. Mato E. **Células madre: un nuevo concepto de medicina regenerativa.** Revista Cubana de Endocrinología. 2004; 15(2).

49. Todovoric V, Markovic D, Milosevic-Jovcic, Petakov M, Balint B, Colic M, et al. **Dental pulp stem-cell potential significance in regenerative medicine.** Stom Glas. 2008; 5: 170-185.}

50. Zavan B, Bressan E, Sivollella S, Brunello G, Gaidin C, Perrarensse N. **Dental pulp stem an tissue Engineering strategies for Clinical Application**



on Odontoiatric field. Biomaterials Science and Engineering. University of Padova. 2011 Sep; 340-345.

51. Sakar A. ***Las células madre se encuentran también en los dientes.***

Asociación Dental Mexicana, ADM. FNCC. 2012 Jun; 7-8.

52. González L, Nova J, Font A. ***Investigación de las células madre de origen dentario. Actualización.*** Gaceta Dental. 201 Mar; 223: 118-128.

53. Hernández P, Dórticos E. ***Tras la huella de las células madre.*** Revista Cubana de Hematología, inmunología y Hemoterapia. 2010; 26(2): 18-22.

54. Pérez A. Nuñez C. ***De la terapia celular a la regeneración peridontal.*** Revista Cubana de Estomatología. 2009 Abr; 8(2): 1-8.

55. Carin F, Menchini F, Biagie E, Salvade A, Sbordone L, Balani M. ***Estudio experimental sobre la utilización de las células madre humanas en la terapia de los defectos periodontales: resultados preliminares.*** Avances en periodoncia. 2011; 23(2): 97-107.

56. Pérez A. Dominguez L, Sástigui Z, Hernández P. ***Utilización de las células madre en el tratamiento de defectos óseos periodontales.*** Revista Cubana de Estomatología. 2009; 46(4): 108-116.

57. Rosales R. ***Tejido óseo de las células madre para tratar defectos bucodentales.*** Gaceta UNAM. 2013 Jul 22; 4527: 14.



58. Nikolic A, Krstic D, Trivanovic S, Nojsilovic J, Sun I, Kocic J, et al.

Mesenchymal Stem Cell properties of Dental pulp cells from Deciduous teeth. Belgrade. 2011; 63(4): 933-442.

59. Rivera A, Carmona B, Arzate H. ***Producción y caracterización de una proteína recombinante del cemento (CEMP1) en células Drosophila Melangaster (DML-2-23).*** Revista odontológica Mexicana. 2013 Jun; 17(2): 76-80.

60. González A, Gómez E, Arzate H. ***Proteínas específicas del cemento radicular CEMP1 y CAP en las células neoplásicas.*** Journal of Oral Research. 2013 Abr 09; 2(1): 11-17.

61. Betacourt K, Barciela J, Guerra J, Cabrera N. ***Uso de las células madre en el complejo bucofacial.*** Revista Arc. Médico Camagüey. 2012; 16(5): 1637-1646.

62. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. ***Cryopreserved Dental Pulp Tissues of exfoliated Deciduous Teeth is a feasible stem cell Resouce for Regenerative Medicine.*** Plosone. 2012 Dic; 7(12):2-12.

63. Mábel L. ***Fundamentos de criopreservación.*** Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2006; 57(4): 291-300.

64. Instituto Inser. Fertilidad Humana. ***Bancos de semen.***

www.inser.com.co/congelacion-y-almacenamiento-bancos-de-semen/



65. Instituto Ingenes. Fertilidad y genética. ***Bancos de semen.***

<http://www.ingen.es.blogspot.mx/2009/11/bancos-de-semen.html>

Consultado en internet el 20 de Octubre del 2013 a las 12:36h.

66. Banco de Células Dentales. BILDEN MÉXICO. ***Tratamientos actuales con las células madre que pueden tratar diferentes enfermedades.***

[Http://www.bioeden.com](http://www.bioeden.com)

Consultado en internet el 19 de Octubre del 2013 a las 14:40.