



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**CÉLULAS TRONCALES DE LA CAVIDAD ORAL;
APLICACIÓN ODONTOLÓGICA PARA
REGENERACIÓN TISULAR.**

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:

DALIA DENISSE DÍAZ BORJA

TUTORA: Esp. LILIA ESPINOSA VICTORIA

ASESOR: Mtro. FRANCISCO GERMÁN VILLANUEVA SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi Mamá Elena Borja; quien creyó en mí y me apoyó en toda situación, esforzándose cada día. Por su amor, paciencia y cuidados. Por ser la mejor madre que la vida pudo haberme dado.

A mi hermana Karen Díaz, por ser mi mejor amiga, por enseñarme que una actitud positiva en la vida siempre trae consigo bendiciones y en quien siempre he encontrado un respaldo incondicional.

A mi hermana Diana Díaz, por ser como mi segunda madre y cuidarme desde la infancia, por todo su cariño y apoyo dado.

A mi Papá Arturo Díaz[†], quien me enseñó que aprender es fundamental en la vida y por que parte de lo que soy ahora es gracias a él.

A mi alma mater; la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Odontología por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de formarme como profesional.

A mis amigos, que me dieron ánimos para levantarme en cada caída, a los que compartieron éste camino conmigo y aquellos que depositaron su confianza en mí para ser mis pacientes.

A mi tutora Esp. Lilia Espinosa, por su asesoramiento y apoyo para la elaboración de esta tesina.

A la Dra. Luz del Carmen González García, por su tiempo, dedicación y apoyo en todo el seminario.

A todos ellos un agradecimiento especial

Todos tus sueños pueden hacerse realidad si tienes el coraje de perseguirlos. –Walt Disney

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| OBJETIVO GENERAL | 7 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 7 |
| 1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS | 8 |
| 2. GENERALIDADES DE CÉLULAS TRONCALES | 9 |
| 2.1 Definición | 9 |
| 2.2 Características de las células troncales | 9 |
| 2.3 Clasificación de las células troncales | 11 |
| 3. ODONTOGÉNESIS | 16 |
| 3.1 Estadio de brote o yema dentaria | 17 |
| 3.2 Estadio de casquete | 18 |
| 3.3 Estadio de campana | 19 |
| 3.4 Estadio terminal o de folículo dentario | 21 |
| 4. CÉLULAS TRONCALES DE LA CAVIDAD ORAL | 23 |
| 4.1 Células troncales de pulpa dental (DPSCs) | 24 |
| 4.2 Células troncales de ligamento periodontal (PDLSC) | 25 |
| 4.3 Células troncales de dientes temporales exfoliados (SHED) | 27 |
| 4.4 Células troncales de papila apical (SCAP) | 27 |
| 4.5 Células troncales de folículo dental (DFPC) | 28 |
| 4.6 Células troncales de mucosa bucal y encía oral (GSCs) | 29 |
| 4.7 Células troncales de paladar (PaldSCs) | 30 |
| 4.8 Células troncales de tejido adiposo (Ad-MSCs) | 31 |
| 5. TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES | 33 |
| 5.1 Recolección | 33 |
| 5.2 Aislamiento de células troncales | 34 |
| 5.3 Cultivo celular | 35 |
| 5.4 Análisis de colonias | 36 |
| 5.5 Criopreservación | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 6. INGENIERÍA TISULAR | 41 |
| 6.1 Componentes fundamentales | 41 |
| 6.2 Técnicas de Ingeniería Tisular | 43 |
| 7. REGENERACIÓN TISULAR DENTOFACIAL..... | 45 |
| 7.1 Angiogénesis | 45 |
| 7.2 Complejo dentino-pulpar..... | 46 |
| 7.3 Periodonto | 48 |
| 7.4 Hueso | 52 |
| 7.5 Mucosa oral | 57 |
| 7.6 Glándulas salivales | 57 |
| 7.7 Bioingeniería dental | 58 |
| 7.8 Córnea..... | 62 |
| 8. ASPECTOS LEGALES | 66 |
| 8.1 Normas legales..... | 66 |
| 8.2 Bancos privados de células | 68 |
| CONCLUSIONES | 70 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |



INTRODUCCIÓN

Actualmente, en el área médica y odontológica se han desarrollado numerosas investigaciones encaminadas a la regeneración, reparación o reemplazo bioartificial de tejidos y órganos propios del cuerpo humano, que han sido dañados por diversos factores, tales como trauma, enfermedades adquiridas como el cáncer o ciertas anomalías congénitas. La pérdida de tejidos en la región craneofacial, produce serias consecuencias fisiológicas y psicológicas en los pacientes.

Mediante la Terapia Celular y la Ingeniería Tisular basada en células troncales, se pretende crear tejidos con la identidad histológica del propio paciente para eliminar la problemática de encontrar donantes compatibles, así como la necesidad de administrar inmunosupresores para evitar el rechazo de un injerto.

Es por ello que las células troncales han sido estudiadas ampliamente por sus características de auto-renovación, que les da el potencial de originar células hijas indiferenciadas con la capacidad de diferenciarse para formar tejidos especializados, reemplazando células enfermas y disfuncionales por células saludables y funcionales.

Debido a los problemas éticos y legales existentes, para poder obtener células troncales embrionarias, nace la necesidad de estudiar células troncales de origen dental, lo que permite mediante un procedimiento no invasivo, la obtención y cultivo de estas células, criopreservándolas para su uso posterior.

La presente tesina tiene como finalidad dar a conocer una revisión bibliográfica actualizada sobre la regeneración de estructuras de la región dentofacial,



utilizando células troncales; así como el análisis y comprensión de sus propiedades, presentándolas como una herramienta innovadora y una alternativa prometedora en la regeneración tisular.



OBJETIVO GENERAL

- ✓ Informar con evidencia científica actualizada al gremio odontológico, de las características, propiedades y usos clínicos de las células troncales, de tal forma que puedan orientar a los pacientes correctamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Explicar los conocimientos básicos relacionados con las células troncales.
- ✓ Explicar el procedimiento para la obtención de células troncales de origen dental.
- ✓ Dar a conocer los alcances clínicos reales aplicados en Odontología.
- ✓ Informar sobre los aspectos legales relacionados con las células troncales.

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS





2. GENERALIDADES DE CÉLULAS TRONCALES

2.1 Definición

Las células troncales también llamadas células tallo, pluripotenciales precursoras o células madre, son células no diferenciadas que permanecen como tal durante el desarrollo embriológico, con la capacidad de auto-replicarse por largos periodos de tiempo, con elevada proliferación y gran potencial de diferenciación *in vitro* e *in vivo*.^{1,2,3,4}

2.2 Características de las células troncales

Todas las células troncales, independientemente de su origen, son diferentes de otros tipos celulares por sus principales características:

- Estas células son indiferenciadas porque no tienen estructuras específicas de un tejido que les permitan realizar funciones especializadas.⁵
- La capacidad de auto-renovación es el proceso mediante el cual una célula troncal se divide ilimitadamente para generar una o dos células hijas con el potencial de proliferación y diferenciación.^{5, 6}

Esta división puede ser:

- a) Simétrica: cuando se generan dos células hijas indiferenciadas idénticas entre sí o dos células hijas con un grado de diferenciación diferente a la célula progenitora.
- b) Asimétrica: cuando se obtiene una célula hija con las mismas propiedades que su progenitora y otra, con un fenotipo diferente.

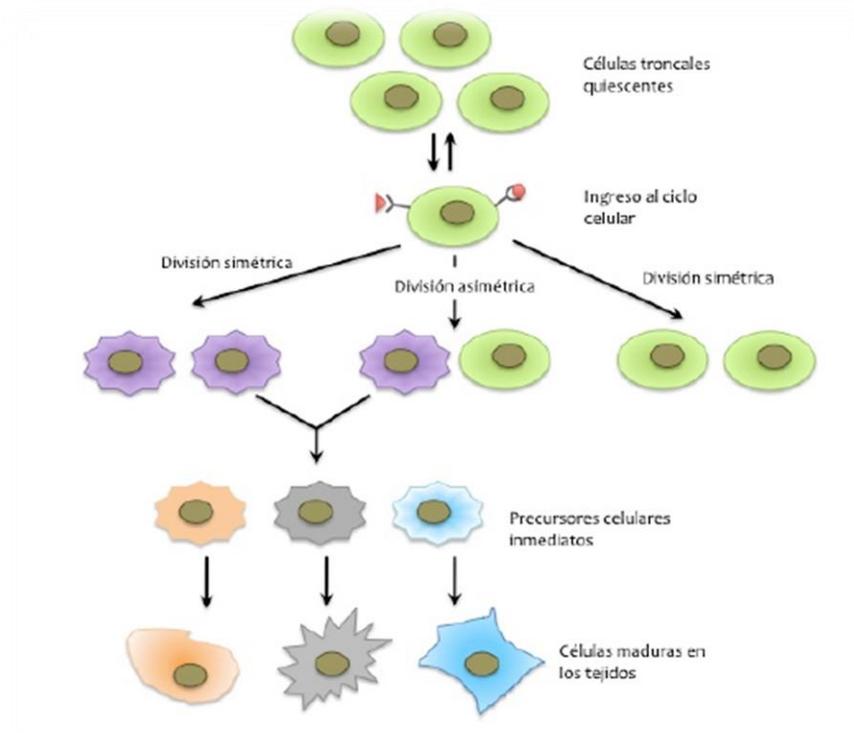


Fig.1 Auto-renovación de las células troncales⁷

- El potencial de proliferación se refiere a la multiplicación de las células por mitosis sin cambiar el fenotipo indiferenciado, lo que permite a las células expandir su número durante el desarrollo y restaurar su concentración tras una lesión.
- El potencial de diferenciación es la capacidad que tienen las células troncales de adquirir un fenotipo específico dando como resultado células especializadas.
- La plasticidad o transdiferenciación es la capacidad que tienen las células troncales de ser aisladas de un tejido para generar grupos celulares distintos a los de su tejido de origen y a veces incluso en tipos celulares que son de una capa germinal embrionaria diferente.⁸

2.3 Clasificación de las células troncales

Las células troncales se pueden clasificar de dos maneras:

- Por su potencial de diferenciación
- Por su origen y forma de obtención.

Por su potencial de diferenciación se dividen en:

a) *Células troncales totipotenciales*

Estas células son capaces de originar un embrión y un individuo completo, diferenciándose hacia cualquier estirpe celular. Ejemplo: el cigoto.^{8, 12}

b) *Células troncales pluripotenciales*

Son células que no pueden dar origen a un individuo completo, pero sí a los tejidos u órganos correspondientes a los tres estratos germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Ejemplo: células troncales pluripotentes de la pulpa dental.^{8, 12}

c) *Células troncales multipotenciales*

Son células que pueden originar un subconjunto de tipos celulares, de su misma capa o linaje de origen embrionario. Ejemplo: células troncales de piel.^{8, 12}

d) *Células troncales oligopotenciales*

Este tipo de células dan origen a dos o más tipos celulares en un tejido. Ejemplo: célula madre neuronal.^{8, 12}

e) *Células troncales unipotenciales*

Tienen la capacidad de diferenciarse únicamente en células de su propio tipo. Ejemplo: células germinales.^{8, 12}

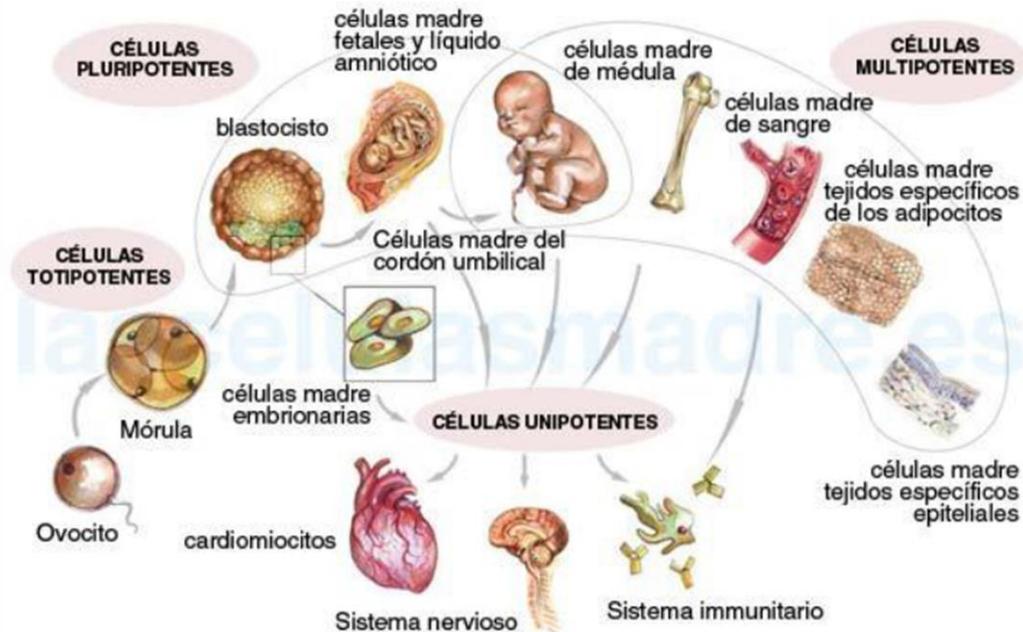


Fig. 2 Potencial de diferenciación de las células troncales⁹

Por su origen y forma de obtención se clasifican en:

a) *Células troncales embrionarias*

Son células totipotenciales capaces de dar origen a todas las células del organismo y se derivan de un embrión humano que se encuentra en la fase de blastocisto en el desarrollo embriológico. La capa externa del blastocisto, el trofoblasto es la fuente de células troncales embrionarias.^{8, 33}

Estas células se pueden obtener por dos formas: la primera, de los embriones sobrantes conservados en congelación después de un proceso de fecundación *in vitro* y la segunda, la constituyen los embriones humanos obtenidos por clonación terapéutica. Estas fuentes requieren la manipulación de embriones, con lo que conllevan problemas éticos, sociales y legales.



Fig.3 Célula troncal embrionaria¹⁰

b) Células troncales adultas o somáticas

Son células indiferenciadas que se encuentran en los tejidos adultos, después del desarrollo embrionario. Se han encontrado en tejidos como el cerebro, la médula ósea, sangre, músculos esqueléticos, dientes, corazón, intestino, piel, córnea, hígado, epitelio ovárico y testículos. Permanecen en estado de reposo y pueden renovarse a sí mismas o diferenciarse en células especializadas cuando son activadas por una lesión del tejido o enfermedad, manteniendo y reparando los tejidos donde se encuentran. Estas células pueden contener anomalías de ADN adquiridas con la edad; que pueden ser causadas por el medio ambiente, toxinas o errores en la replicación de ADN.⁸

La cantidad limitada de estas células en los tejidos puede constituir un obstáculo para su utilización en terapia celular, en tanto no se identifiquen los factores que estimulan su proliferación y maduración en cultivo.

Las células troncales pluripotenciales del cordón umbilical son recogidas de la sangre del cordón umbilical en el nacimiento. Estas pueden producir todas las células sanguíneas (hematopoyéticas) del cuerpo.

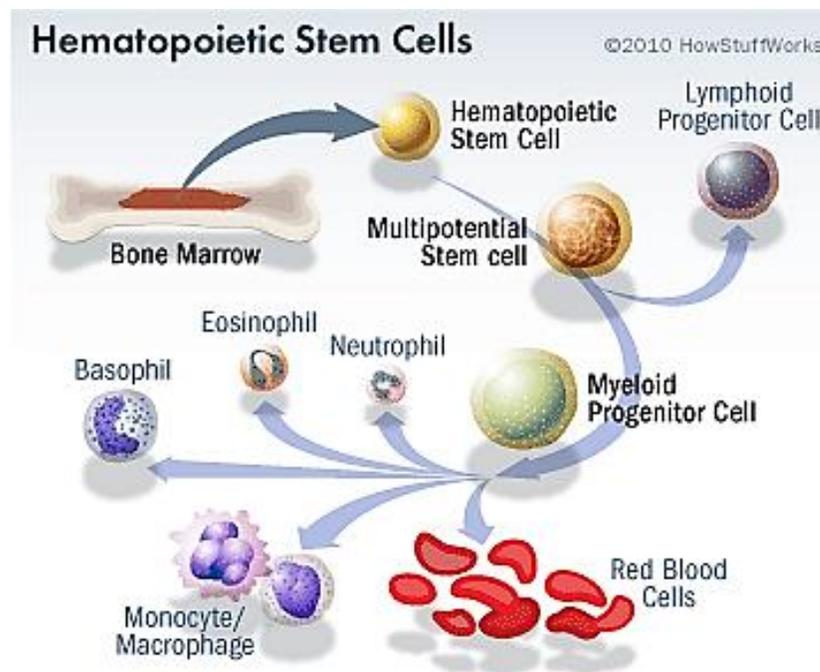


Fig. 4 Células troncales hematopoyéticas¹¹

c) Células troncales iPS (induced Pluripotent Stem cells)

Una célula pluripotente inducida (iPS) es una célula extraída de cualquier tejido adulto, que se ha modificado genéticamente para que se comporte como una célula madre embrionaria. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse

en cualquier célula de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo.^{12, 19, 33}

Shinya Yamanaka de la Universidad de Kioto en Japón creó la primera célula iPS a partir de un ratón en 2006 y a partir de células adultas humanas en el 2007.¹⁹

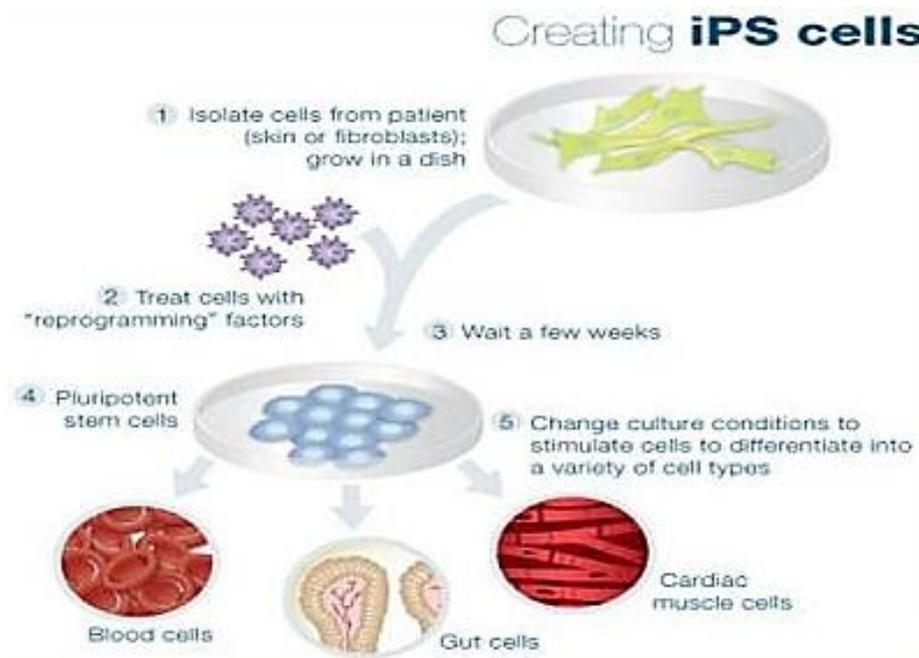


Fig. 5 Células troncales iPS⁶⁰



3. ODONTOGÉNESIS

Para comprender las características de las células troncales de los tejidos dentales es necesario conocer los procesos biológicos que inducen y regulan el desarrollo dental.

La odontogénesis es el proceso embriológico que dará lugar a la formación del germen dental, donde intervienen los tejidos endodermo y mesodermo, separados por la capa basal. Este periodo comienza en el segundo trimestre de embarazo extendiéndose hasta después del nacimiento.¹³

En la formación de los dientes participan dos capas germinativas: el epitelio ectodérmico, que origina el esmalte, y el ectomesénquima que forma los tejidos restantes (complejo dentino pulpar, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar).

La acción inductora del ectomesénquima sobre el epitelio bucal y las diferentes estructuras de origen mesenquimático, conduce hacia una interdependencia entre ambos tejidos que es conocida como interacción epitelio-mesénquima; dicha interacción dará como resultado la determinación, diferenciación y organización de los tejidos dentales.¹⁴

La primera manifestación consiste en la diferenciación de la lámina dental, a partir del ectodermo que tapiza el estomodeo.

Aunque cada diente tiene una secuencia temporal específica y un desarrollo morfológico distinto, existen ciertos estadios del desarrollo comunes a todos los dientes.

3.1 Estadio de brote o yema dentaria

En la sexta semana de vida intrauterina, las células basales del epitelio bucal inducidas por el ectomesénquima subyacente proliferan a lo largo del borde de los futuros maxilares, produciendo una invaginación del epitelio bucal llamada brote o yema, la cual se subdivide en dos: la lámina vestibular que dará origen al surco vestibular y la lámina dental; de la cual se originarán los 20 dientes deciduos en la octava semana de vida intrauterina y los 32 gérmenes de los dientes primarios alrededor del quinto mes de gestación.

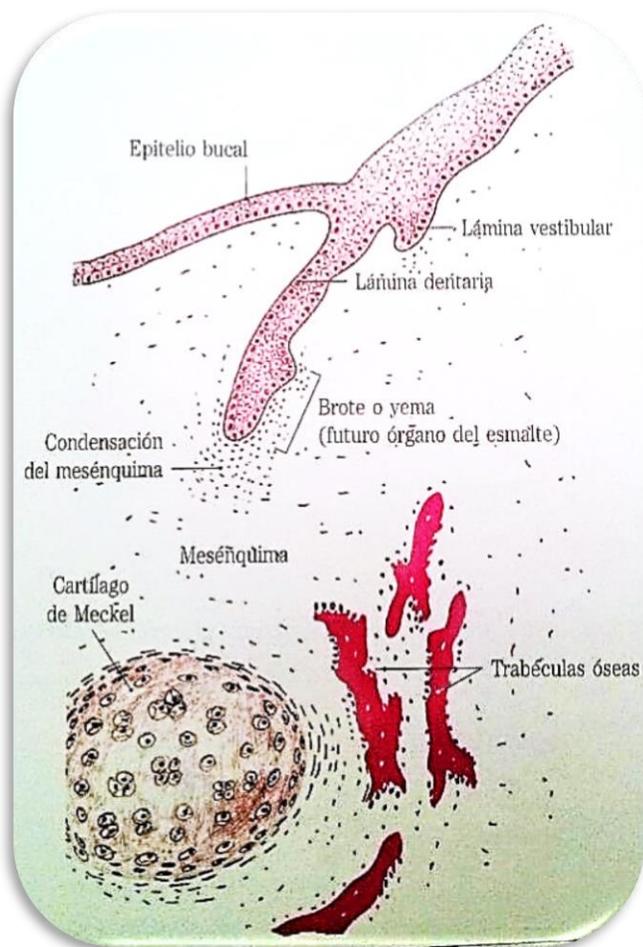


Fig. 6 Estadio de brote o yema¹⁴

3.2 Estadio de casquete

La proliferación desigual del brote aproximadamente en la novena semana, determina una concavidad en su cara profunda, dándole un aspecto de casquete. Su concavidad central encierra una porción del ectomesénquima que será la futura papila dentaria, que dará origen al complejo dentino pulpar.

Se pueden distinguir tres estructuras en el órgano del esmalte:

- 1.- El epitelio externo: se encuentra en la convexidad y está constituido por una sola capa de células cuboideas.
- 2.- El epitelio interno: se encuentra en la concavidad, compuesto por epitelio de células cilíndricas.
- 3.- El retículo estrellado: que está entre ambos epitelios y se forma de células de aspecto estrellado y desmosomas.

A nivel de epitelio externo del esmalte, en su proximidad al epitelio interno, y en el retículo estrellado se han localizado los posibles nichos de células troncales. La papila se encuentra separada del epitelio interno del órgano del esmalte por una membrana basal, que representa la localización de la futura conexión amelodentinaria.¹⁴

El tejido mesenquimático que se encuentra inmediatamente por fuera del casquete, rodeándolo casi en su totalidad, salvo en el pedículo (que une el órgano del esmalte con el epitelio originario o lámina dental), también se condensa volviéndose fibrilar y forma el saco dentinario primitivo o folículo dental. El órgano del esmalte, la papila y el saco constituyen en conjunto el germen dentario.¹⁴

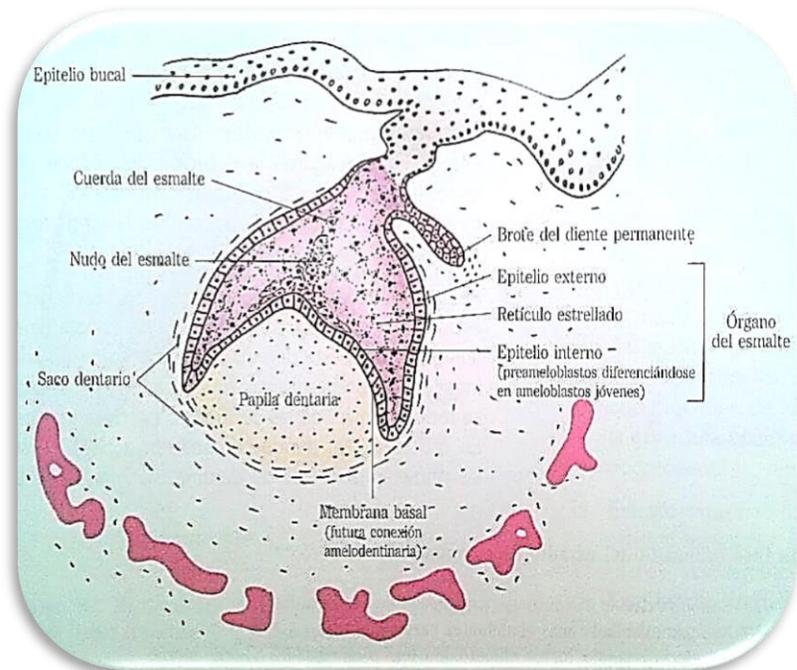


Fig. 7 Estadio de casquete¹⁴

3.3 Estadio de campana

Ocurre sobre los catorce a dieciocho semanas de vida intrauterina acentuándose la invaginación del epitelio dental interno dando una forma de campana.

El órgano del esmalte que presentaba tres capas, en este estadio se conforma por cuatro capas:

- a) Epitelio dental externo: el epitelio presenta pliegues debido a invaginaciones vasculares provenientes del saco dentario, que aseguran la nutrición del órgano del esmalte.
- b) Retículo estrellado: se depositan las primeras laminillas de dentina, el retículo estrellado se adelgaza para permitir el paso de elementos

nutricionales desde los vasos sanguíneos del saco dentario hacia los ameloblastos que sintetizarán la matriz del esmalte.

- c) Estrato intermedio: formado por cuatro o cinco hileras de células planas, éste participa en la mineralización del esmalte durante la amelogénesis.
- d) Epitelio dental interno: después de la diferenciación de los odontoblastos de la papila dentaria, las células del epitelio dental interno se diferenciarán en ameloblastos.

Separando el epitelio dental interno y la papila dental existe una membrana basal, que está compuesta en mayor parte por colágeno tipo IV y la cual será la futura unión amelo-cementaria. En este periodo se determina la morfología de la corona por acción del ectomesénquima sobre el epitelio interno del órgano del esmalte, el epitelio dental interno induce a la papila dentaria para que las células se diferencien en odontoblastos que comienzan a sintetizar dentina en las cúspides, una vez que se han formado las primeras capas de dentina calcificada, los ameloblastos sintetizan la matriz del esmalte. Cuando se forma la dentina, la porción central de la papila se transforma en pulpa dentaria con su posterior inervación y vascularización.

El saco dentario se encuentra formado por dos capas:

1. La externa: con abundantes fibras colágenas
2. La interna: que es célulo-vascular; constituida por células mesenquimáticas indiferenciadas las que derivaran los componentes del periodonto: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar.

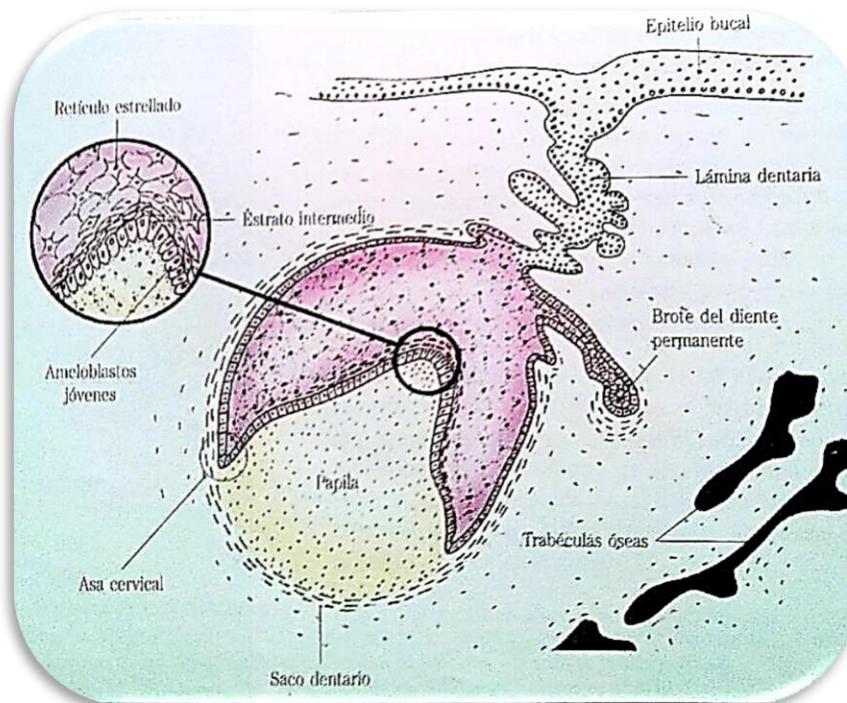


Fig. 8 Estadio de campana¹⁴

3.4 Estadio terminal o de folículo dentario

Comienza con la presencia del depósito de la matriz del esmalte sobre las capas de dentina en desarrollo. Primero se depositan unas laminillas de dentina seguida de una de esmalte, de manera que va dando estructura a la corona, para posteriormente empezar el desarrollo y formación del patrón radicular.

En la formación de la raíz la vaina epitelial de Hertwig tiene un papel inductor y modelador; esta vaina resulta por la fusión del epitelio interno y el epitelio externo del órgano del esmalte. Al completarse la formación radicular, la vaina epitelial se curva hacia adentro en cada lado, para formar el agujero apical primario.

Las células mesenquimatosas situadas en la superficie de la raíz dental en contacto con la dentina, se diferencian en cementoblastos que darán origen al cemento. Por fuera de la capa de cemento, el mesénquima origina el ligamento periodontal.

Con el crecimiento de la raíz, la corona es llevada poco a poco a través de los tejidos suprayacentes hasta llegar a la cavidad bucal.

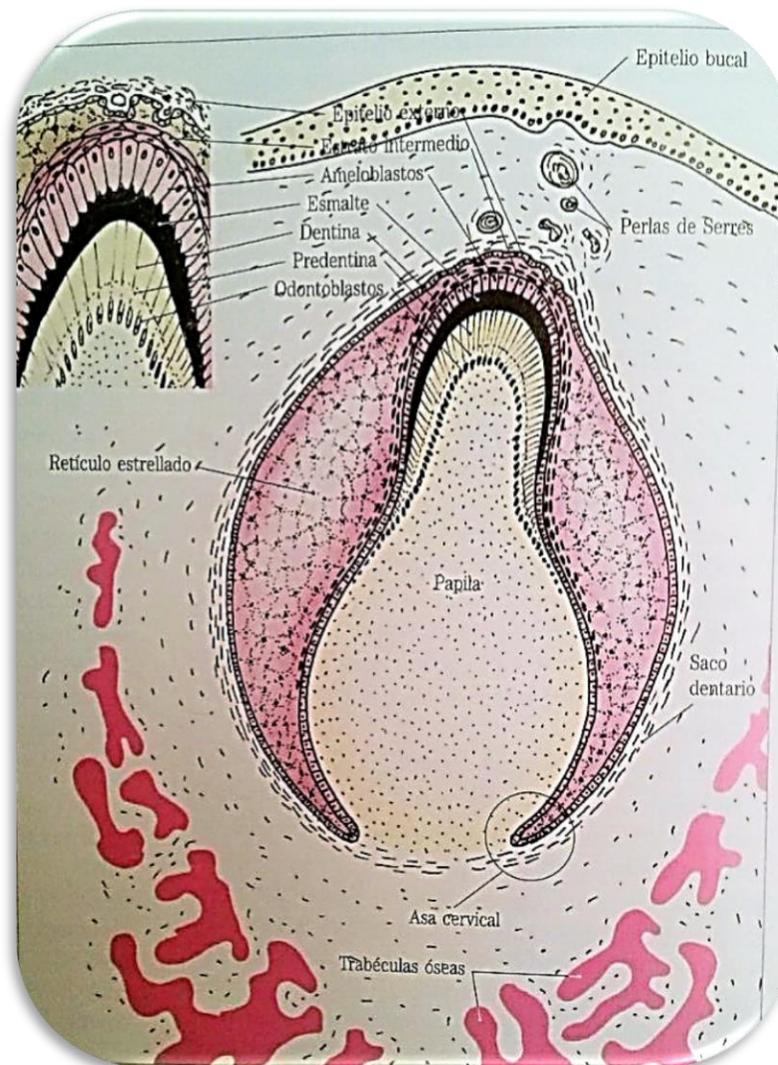


Fig. 9 Estadio de folículo dental¹⁴

4. CÉLULAS TRONCALES DE LA CAVIDAD ORAL

Son células troncales adultas pluripotenciales/multipotenciales que tienen la capacidad de formar células con carácter odontogénico. Éstas residen en un lugar específico llamado nicho, existen varios nichos en el complejo bucal que albergan a estas células. Se han localizado las siguientes células troncales en la cavidad oral.³

- Células troncales de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSCs)
- Células troncales presentes en espacios periodontales (PDLSC)
- Células troncales de dientes temporales recientemente exfoliados (SHED)
- Células troncales de la papila apical (SCAP)
- Células troncales del folículo dental (DFPC)
- Células troncales de la mucosa bucal y encía (GSCs)
- Células troncales del paladar (PaldSCs)
- Células troncales de tejido adiposo (Ad-MSCs)

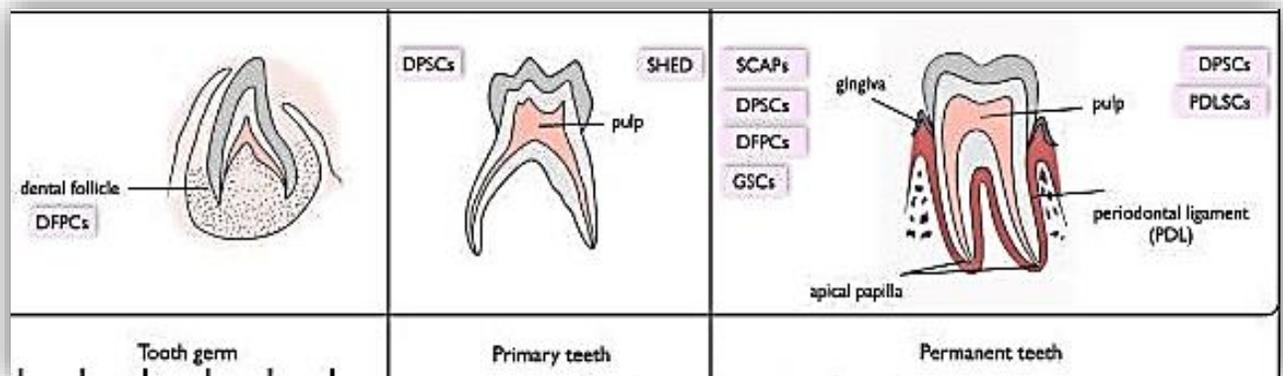


Fig. 10 Nichos orales de células troncales¹⁵

Las poblaciones de células difieren en algunos aspectos por su tasa de crecimiento en cultivo, la expresión del gen marcador y su potencial de diferenciación. Lo más importante es que estas células no son obtenidas de embriones humanos por lo que no presentan los habituales problemas éticos y legales a los que se enfrentan este tipo de investigaciones.

4.1 Células troncales de pulpa dental (DPSCs)

La posibilidad de que la pulpa dental podía contener células precursoras surgió durante la observación del proceso de reparación mediante el cual se forman nuevos odontoblastos cuando existe un daño que penetra en esmalte y dentina. Las células troncales de la pulpa dental son probablemente las precursoras de los odontoblastos que forma la dentina reparativa.⁴¹

Fueron las primeras células troncales de origen dental que se aislaron en el año 2000 (Gronthos). Estas células mostraron una mayor tasa de proliferación que las células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea en las mismas condiciones de cultivo (Yu y cols. 2007), atribuible a la expresión fuerte de la quinasa un activador del ciclo celular.^{16, 17}

La producción de DPSC es pequeña (1% de todas las células) y según aumenta la edad del individuo, la disponibilidad de estas células se ve reducida.

Tienen el potencial de diferenciarse en odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales y células neurales.^{3, 18, 19} Se ha encontrado también que las células troncales de la pulpa dental son capaces al igual que los osteoblastos, de expresar marcadores óseos, tales como: sialoproteínas óseas, fosfatasa alcalina y osteocalcina. Se han identificado los marcadores STRO-1, CD90, VCAM-1, MUC-18, CD 105, Nestina y CD146, lo

que indica que DPSCs es una población heterogénea de células troncales y su nicho se encuentra perivascular en la pulpa.^{8, 16,17}

Las principales fuentes de DPSC son extraídas de los terceros molares, supernumerarios y premolares extraídos para fines de tratamiento ortodóntico.¹⁶ Su obtención no requiere una intervención quirúrgica adicional y puede obtenerse en varios momentos de la vida. Si son aisladas durante la formación de la corona son más proliferativas que en etapas posteriores.¹⁹

Al ser autólogas tienen las ventajas de: no tener riesgo de ser rechazadas por el organismo, mayor capacidad proliferativa que otras células; lo que permite cultivarse más rápidamente, por periodos más largos y son capaces de adherirse y proliferar en andamios, por lo tanto tienen mayor capacidad regenerativa; generar hueso, médula ósea, cemento, dentina, ligamento periodontal y pulpa.^{1, 3}

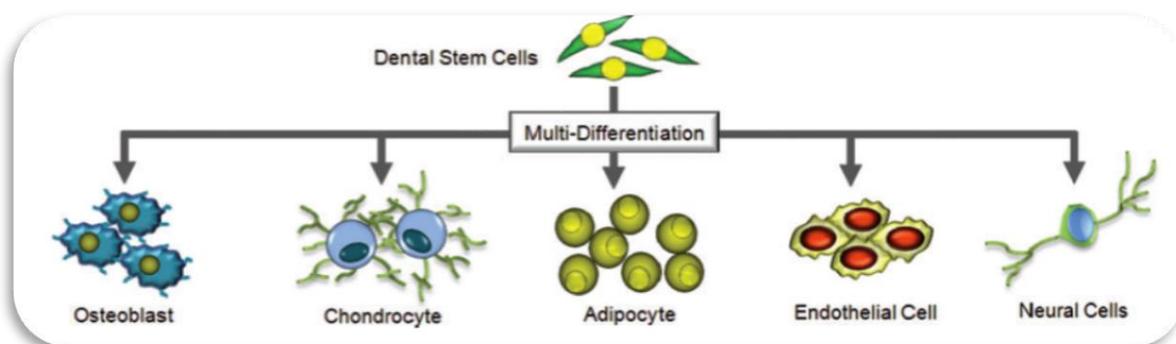


Fig. 11 Potencial de diferenciación DPSC²⁰

4.2 Células troncales de ligamento periodontal (PDLSC)

El ligamento periodontal es un tejido conjuntivo denso irregular y colagenoso, que conecta la superficie radicular con el hueso alveolar. Los principales tipos de células del ligamento periodontal incluyen: fibroblastos, leucocitos, macrófagos, cementoblastos, cementoclastos, osteoblastos, osteoclastos,

restos epiteliales de Malassez, así como elementos vasculares y elementos neurales.²¹ Las fibras del ligamento periodontal se componen principalmente por colágena tipo I, dispuestas en patrones específicos y predeterminados para absorber y contrarrestar las fuerzas de la masticación.

Los primeros estudios en diferentes modelos animales demostraron que los tejidos periodontales poseen alguna actividad de regeneración, sugiriendo la existencia de una población de células troncales en el periodonto.³³

Estudios recientes *in vivo* e *in vitro*, identificaron una población de células troncales en el ligamento periodontal humano capaces de diferenciarse para producir células similares a osteoblastos, cementoblastos, adipocitos y tejido conectivo rico en colágeno I.^{1,8} Estas células mantienen la homeostasis y regeneración del tejido periodontal, encontrándose en la vecindad de los vasos sanguíneos periodontales. Los marcadores de superficie celular que se han identificado en estas células son STRO-1, CD105, CD166 y CD146/MUC 18.¹⁶ Los estudios realizados *in vivo* en ratones inmunocomprometidos, demostraron la participación de estas células en la regeneración de hueso alveolar al propiciar la formación de una fina capa de tejido muy similar al cemento que, además de contar entre sus componentes con fibras colágenas, se asociaron íntimamente al hueso alveolar próximo al periodonto regenerado.^{1,16}

Las fibras colágenas generadas *in vivo* en humanos, fueron capaces de unirse con la nueva estructura formada de cemento, imitando así la unión fisiológica de las fibras de Sharpey.⁴² De estos estudios y análisis se podría decir que las PDLSC podrían contener un subgrupo de células capaces de diferenciarse hacia cementoblastos y cementocitos así como células formadoras de colágeno.¹⁶

Las células troncales del ligamento periodontal inflamado mantienen la auto-renovación y sus capacidades de diferenciación.



4.3 Células troncales de dientes temporales exfoliados (SHED)

Es una población más inmadura de células troncales y pueden diferenciarse en neuronas, adipocitos, osteoblastos y odontoblastos. *In vivo* pueden inducir la formación de hueso o dentina.

En contraste con DPSC, las SHED muestran mayor velocidad de proliferación, altos índices de replicación y especialización, y mayor capacidad osteoinductiva. Los marcadores encontrados en estas células son STRO-1 y CD 146.¹⁶

Se ha comprobado en ratones que las SHED pueden reparar defectos de formación ósea.⁸

También se ha probado el potencial de las SHED para diferenciarse en células angiogénicas, cuya capacidad de inducción se considera fundamental para cualquier tipo de regeneración. Es necesario el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) para que las SHED se diferencien en células endoteliales.

Debido a su capacidad de producir y secretar factores neurotróficos, estos tipos de células se encuentran en investigación para el tratamiento terapéutico de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica y enfermedades cardíacas como insuficiencia cardíaca y cardiopatía isquémica crónica.

4.4 Células troncales de papila apical (SCAP)

Es el tejido blando que rodea los ápices de los dientes en desarrollo cerca de la vaina epitelial de Hertwig y que toma parte en la formación de la raíz del diente. Solo está presente durante el desarrollo de la raíz antes de que el

diente entre en proceso de erupción en la cavidad oral. Tienen la capacidad de diferenciarse en odontoblastos, osteoblastos, adipocitos y células neurales, y muestran mayores tasas de proliferación *in vitro* y menor componente vascular en comparación con DPSC.

Los terceros molares impactados y los dientes con ápices abiertos en desarrollo son una fuente importante de SCAP. Muestran marcadores celulares tales como STRO-1, ALP, CD24, y CD29. Se ha observado en estudios *in vitro* que estas células pueden ser estimuladas para formar tejido mineralizado y expresan la sialoproteína de la dentina; la cual participa en la dentinogénesis. Semejantemente en vivo el trasplante de SCAP humano en ratones inmunodeprimidos dió lugar a la regeneración de odontoblastos capaces de depositar nueva dentina. Parece que las SCAP son precursoras de los odontoblastos responsables de la formación de la dentina radicular.^{1, 12,}

22

4.5 Células troncales de folículo dental (DFPC)

El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación.²¹ Este tejido contiene células troncales que son las que acabaran formando el periodonto. Las células del folículo dental cerca de la formación de la raíz se diferencian del cemento formando cementoblastos y las células hacia el hueso alveolar se diferencian a osteoblastos secretando matriz ósea. Las células del folículo dental encontradas entre los cementoblastos y células precursoras de osteoblastos se desarrollan en fibroblastos que producen la matriz extracelular del ligamento periodontal.

Estas células son extraídas de terceros molares impactados y son semejantes al resto de células troncales de origen dental pero constituyen colonias

clonogénicas en menor número que los demás tipos. Los marcadores encontrados son STRO-1, Nestina y Notch-1.

El trasplante de estas células genera una estructura constituida de tejido fibroso rígido. *In vivo* no se ha observado formación ósea, ni de dentina; debido al reducido recuento celular en los cultivos, aunque la expresión de genes *in vitro* osteogénicos como sialoproteína de hueso (SBP) y osteocalcina (OC) fue elevada.⁸

El inconveniente de la obtención de las células troncales del folículo dental es la manipulación que éstas necesitan, durante la extracción, envío y preservación, la cual puede fracasar ya que la contaminación es muy fácil.

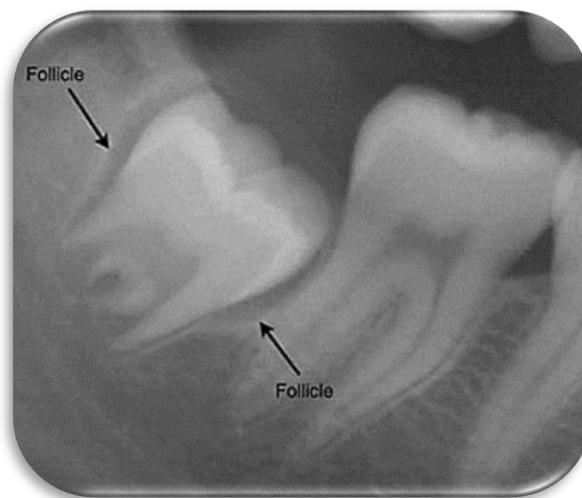


Fig. 12 Folículo dental²³

4.6 Células troncales de mucosa bucal y encía oral (GSCs)

La mucosa bucal está integrada por un epitelio escamoso estratificado (no queratinizado, paraqueratinizado u ortoqueratinizado) y tejido conjuntivo subyacente.

La mucosa oral humana es muy activa en términos de regeneración reduciendo la formación de cicatrices, lo que sugiere la existencia de células troncales. Recientemente se identificó una población de células troncales agrupada en la lámina propia de la mucosa oral humana. Esta población muestra señales positivas a los marcadores relacionados con pluripotencia STRO-1 y Oct-4. Además se ha observado una población de células positivas a la neurotrofina; un marcador de las células troncales neuronales.²⁴

Estas células son altamente proliferativas y pueden diferenciarse *in vitro* en odontoblastos, condrocitos, adipocitos, endotelio y células neuronales bajo condiciones específicas y poseen propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras.³³

Recientemente se ha demostrado que las células troncales de la mucosa bucal tienen características similares a las células límbicas de la córnea, pues expresan marcadores corneales *in vitro* y pueden ser usadas para su regeneración.

Sus propiedades inmunomoduladoras y anti-inflamatorias las coloca como una fuente de células con potencial para la reparación de heridas; reduciendo el tiempo de curación y minimizando la formación de cicatrices.^{24, 33}

4.7 Células troncales de paladar (PaldSCs)

La mucosa masticatoria de la superficie bucal del paladar duro se conforma por un epitelio escamoso estratificado y queratinizado sustentado por tejido conjuntivo denso irregular y colagenoso.²¹

Las células troncales del paladar pueden tolerar bajas concentraciones de oxígeno y tienen el potencial de diferenciación osteogénico, condrogénico,

neuronal y adipogénico, dependiendo de los estímulos externos por citoquinas. Utilizando citometría de flujo se reveló la expresión de los marcadores: STRO-1, CD146 y Nestina.²⁵

Estudios *in vivo* demostraron claramente que PaldSCs de adultos humanos al ser trasplantados a un modelo de rata, fueron capaces de regenerar elementos del tejido periodontal en diferentes niveles.²⁵

4.8 Células troncales de tejido adiposo (Ad-MSCs)

El tejido adiposo se deriva del mesodermo embrionario y consiste en un sistema altamente complejo que contiene diferentes poblaciones de células, incluyendo adipocitos maduros, pre adipocitos, fibroblastos, células del músculo liso vascular, células endoteliales y células troncales derivadas de tejido adiposo. En tiempos de abundancia calórica estas células almacenan el exceso de calorías en forma de triglicéridos y en tiempos de necesidad calórica, liberan combustible como los ácidos grasos y glicerol para su uso por otros órganos.

Recientemente se ha demostrado que su fracción estromal contiene células troncales multipotentes. Un gramo de tejido adiposo contiene aproximadamente 5000 células troncales, y su potencial de diferenciación es amplio ya que pueden especializarse en osteoblastos, adipocitos, condrocitos, células neuronales, células epiteliales, hepatocitos y cardiomiocitos.²⁶

En la cavidad bucal el tejido adiposo se puede localizar en las bolsas de Bichat, las cuales contribuyen a hacer uniformes y redondeadas las mejillas. El inconveniente es que no todas las personas están dispuestas a eliminarse las bolsas de Bichat, debido a que hay estudios que argumentan que envejecen a las personas, aunque el procedimiento para su extracción es sencillo.

Tabla 1. Características *in vitro* e *in vivo* de las células troncales de la cavidad oral.^{12, 22, 27}

| TIPO CELULAR | DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> | FORMACIÓN <i>IN VIVO</i> |
|---|--|--|
| DPSC Dental Pulp Stem Cell | Odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células neurales. | Dentina, pulpa, hueso alveolar |
| PDLSC Periodontal Ligament Stem Cell | Cementoblastos, adipocitos, tejido conectivo rico en colágeno tipo I, condrocitos | Matriz de Cemento Fibras colágenas |
| SHED Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth | Tejido nervioso, miocitos esqueléticos y lisos, células endoteliales, odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos | Formación ósea Dentina |
| SCAP Stem Cells from Apical Papilla | Odontoblastos, osteoblastos, adipocitos y células neurales. | Dentina, pulpa, hueso alveolar |
| DFPCs Dental Follicle Periapical Stem Cells | Cementoblastos, células neurales. | Ligamento periodontal, matriz de cemento |
| GSCs Gingiva Stem Cells | Adipocitos, condrocitos, células límbicas corneales, células neuronales, endotelio y odontoblastos. | Córnea |
| PalD SCs Palate Stem Cells | Osteocitos, condrocitos, adipocitos y células neuronales | Tejido periodontal |
| Ad-MSCs Adipose Mesenchymal Stem Cells | Condrocitos, hepatocitos, cardiomiocitos, adipocitos, odontoblastos, osteocitos, células neuronales y células epiteliales. | Ligamento periodontal, hueso alveolar. |

5. TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES

5.1 Recolección

El método se basará, en primer lugar en obtener la fuente de células troncales del sitio anatómico dental que se desea cultivar. Se recomienda que la obtención de células troncales se realice en pacientes sistemáticamente sanos y en un rango de edad de los 7 a los 30 años, ya que se obtiene un número mayor de estas células de mejor calidad.

Para la obtención de DPSC se puede recurrir a la extracción de terceros molares erupcionados e incluidos, supernumerarios, premolares y dientes temporales en exfoliación. Es preferible la recolección de células troncales de dientes deciduos después de su extracción y no cuando éste ya tiene alta movilidad, ya que indica un suministro de sangre limitado. Los dientes a extraer deben tener pulpa y ligamento periodontal sanos. Dientes que presenten caries de tercer grado, pulpitis irreversible, traumatismo, abscesos apicales, fractura o algún factor que comprometa la vitalidad de los tejidos de importancia, no serán viables para su obtención.

Después de la extracción del órgano dental, éste se colocará en solución salina de fosfato hipotónico frío, para garantizar el estado celular del tejido pulpar y prevenir que el tejido se seque durante su transporte al laboratorio. El tiempo entre la recolección de las células y su llegada al laboratorio no debe exceder las 40 horas.



Fig.13 Diente en solución buffer²⁸

5.2 Aislamiento de células troncales

Una vez en el laboratorio se sigue el siguiente procedimiento para la extracción de células troncales:

- El órgano dental se lava 3 veces con solución salina fosfatada sin calcio ni magnesio (PBS).
- Se desinfecta la superficie dental con etanol al 70% y se lava nuevamente con PBS.
- Dentro de una cámara de flujo laminar que deja el aire estéril por medio de luz ultra violeta, el diente se disecciona cuidadosamente por la unión amelocementaria utilizando pieza de alta velocidad irrigando con solución salina para exponer la cámara pulpar, a esto se le denomina cultivo primario o aislamiento.



Fig. 14 Cámara de flujo laminar²⁹

- Una vez obtenida la muestra pulpar dentro de la cámara de flujo laminar, la pulpa se corta en varios fragmentos que se colocan en un tubo de ensayo con 2 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa con agua a 37° C durante 60 minutos. Estas enzimas van a romper los puentes de unión entre las células y su matriz que en este caso, es la colágena y permitiendo que las células se aislen como tal.

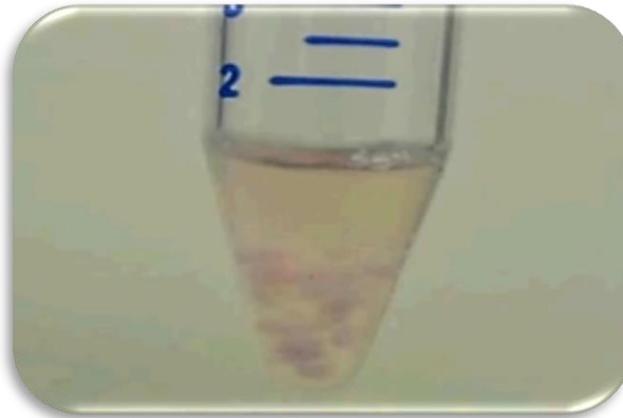


Fig. 15 Fragmentos pulpares y enzimas³⁰

- Pasado el tiempo de digestión se lavan con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero fetal bovino al 10% por 3 minutos.
- Obtenido el número de células necesarias, se centrifuga y se quita el sobrenadante.

5.3 Cultivo celular

Para que las células troncales de la pulpa dental crezcan es necesario que tengan nutrientes y estén en condiciones óptimas. Los extractos digeridos de las pulpas dentales se dejan crecer en cajas de cultivo en presencia de:

(DMEM) frío estéril. Este medio consiste en glucosa, glutamina, 100 mM de aminoácidos no esenciales, 100 mM de piruvato de sodio, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una solución de antibióticos (penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y fungisona/anfotericina B 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$).^{2, 31}

Se dejan crecer por aproximadamente 2 a 5 semanas hasta obtener colonias clonogénicas, en una atmosfera rica en oxígeno en un 95%, con 5% de bióxido de carbono a una temperatura de 37° C. Las colonias aisladas son visibles desde las primeras 24 horas. El medio de cultivo se renueva cada tercer día, para garantizar el crecimiento celular.²



Fig. 16 Cultivo celular ³²

5.4 Análisis de colonias

Durante su crecimiento las células son observadas y analizadas para verificar su viabilidad.

Se observa que se encuentren libres de virus, bacterias y hongos. El color del medio de cultivo es de un rosa pálido, si éste cambia a un color verde, rojo o anaranjado indica la contaminación de éste.



Se realizan análisis genéticos observando su estabilidad genética, descartando la mutación en sus cromosomas de modo que puedan tener una reproducción sana. Se ha observado que las DPSC pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo y tener hasta 80 pases de placa sin signos de senectud.

Las células troncales deben tener buena adherencia al plástico y crecimiento celular. Se comprueba su potencial de diferenciación para los cuatro tipos celulares: odontoblastos, condrocitos, adipocitos y células neurales. Algunos métodos para analizar la diferenciación celular incluyen inmunohistoquímica y la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR).³

Para que realmente sean consideradas como células troncales requieren de ser positivas a ciertos marcadores moleculares específicos. Estos marcadores, codifican para proteínas especializadas que actúan como receptores y tienen la capacidad de señalización o adhesión. Existen varios tipos de receptores que difieren en estructura y afinidad. Para identificar los marcadores de las células troncales se usan nombres cortos basados en moléculas que están unidas a los receptores de superficie de la célula y para identificar un tipo de célula troncal se utiliza la combinación de varios marcadores celulares que pueden ser positivos o negativos.¹⁸

Utilizando la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) por sus siglas en inglés, se detecta el marcador por medio de un componente fluorescente que es activado en presencia de un haz de luz ultravioleta. Se busca detectar positivamente los marcadores STRO-1 y CD 146, y negativamente el marcador CD34.¹⁸

Tabla 2. Principales marcadores para el análisis por citometría de flujo de las células troncales de origen dental³⁴

| Marcador | Tipo celular |
|-----------------|--|
| STRO-1 | Precursor mesenquimal |
| CD 34 | Marcador hematopoyético |
| Nestina | Sistema Nervioso Central |
| CD 105 | Vascular endotelial |
| CD 146/MUC 18 | Células troncales mesenquimales y endoteliales |

Después de realizados los análisis se vuelven a meter a la cámara de cultivo hasta la obtención de al menos 10 colonias sanas lo que equivale a 200 mil millones de células.

Todas las condiciones de laboratorio deben estar certificadas por las autoridades competentes de manera que estos lugares tengan las condiciones de asepsia, antisepsia y seguridad. Ya que cualquier tipo de variable puede alterar el crecimiento celular, diferenciación y producir riesgos en la persona que las manipula.³

5.5 Criopreservación

La criopreservación es el proceso mediante el cual se preservan las células en un estado indiferenciado por congelamiento, para su utilización futura.

Debido a que las células contienen agua, el proceso de enfriamiento debe ser regulado para evitar la formación de cristales. Se comienza a descender la temperatura por medio de refrigeradores, con la temperatura inicial de 37°C se descende a 4°C y a -4°C en un lapso de 12 a 24 horas. Posteriormente se usan refrigeradores especiales que van a ir descendiendo la temperatura

gradualmente de 1° C cada minuto de modo que se llegue a la temperatura de -80°C. La muestra se divide en cuatro crio tubos y se almacenan en tanques de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C. Cada una se almacena por separado, de modo que si existiera un problema con las unidades de almacenamiento, habrá otra muestra disponible para su uso.

Para su descongelamiento el proceso es inversamente gradual para aumentar su temperatura.



Fig. 17 Tanque de nitrógeno líquido³⁶

Un estudio realizado con células troncales de los dientes deciduos (SHED), demostró la viabilidad de las células después de su criopreservación. Se realizaron pruebas de regeneración ósea en calota craneal de ratones con SHED frescas y la misma prueba con SHED criopreservadas durante 2 años. Ambos grupos de SHED (tanto frescas como criopreservadas), mezcladas con hidroxiapatita, consiguieron regenerar los defectos craneales con resultados similares y claramente superiores a los controles en los que únicamente se empleó una matriz.³⁵



Los estudios indican que las células troncales de origen dental siguen siendo viables si son criopreservadas durante 3 años. Aunque se ha observado que después de su criopreservación por largos periodos de tiempo, el número de células troncales viables disminuye ya que van perdiendo sus capacidades proliferativas.^{31, 41}

6. INGENIERÍA TISULAR

La Ingeniería Tisular es el área científica que se encarga de la construcción de tejidos biológicos artificiales funcionalmente activos y su utilización terapéutica, para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos.^{1, 37}

6.1 Componentes fundamentales

1.- Células troncales: las células troncales son utilizadas por sus propiedades de auto-renovación, diferenciación y plasticidad. Se requiere contar con una adecuada fuente de células a partir de la cual se obtendrán las células para su cultivo y proliferación celular.^{37, 41} Se ha comprobado que las DPSC son capaces de adherirse y proliferar en andamios.

2.- Andamios: es una matriz extracelular en 3D que funciona como sustrato de adhesión y permite un adecuado crecimiento de células en su interior y/o superficie.³⁷ Estos permiten a las células subsistir hasta su incorporación con el huésped. Pueden ser de materiales metálicos, cerámicos, poliméricos, naturales o sintéticos.^{1, 33}

Este material debe tener:

- ✓ Biocompatibilidad o aceptación por el organismo receptor.
- ✓ Ausencia de toxicidad o efectos secundarios indeseables.
- ✓ No carcinogénicos
- ✓ Con posibilidad de esterilización para su manipulación
- ✓ Químicamente estable e inerte.
- ✓ Adecuada resistencia mecánica, elasticidad y cierta capacidad de reabsorción.

- ✓ Alto índice de porosidad. En un andamio, el diámetro de poros apropiado oscila entre 100 y 350 micras para hacer regeneraciones. Los poros más grandes son los más adecuados para regenerar tejidos mineralizados, mientras que los pequeños son mejores para estructuras más organizadas
- ✓ Facilidad de producción y procesamiento.

Algunos ejemplos de materiales usados como andamios son:

Hidroxiapatita cerámica porosa (HA), fosfato tricálcico (TCP), colágeno, derivados del ácido hialurónico, citosan, fibrina, hidrogeles como el alginato y polímeros artificiales como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), poli-caprilactona (PCL) y polimetil metacrilato (PMMA).¹⁹

3.- Biomoléculas inductoras: son complementos en el medio de cultivo que se encargan de desencadenar respuestas mediante mecanismos moleculares y biológicos que conducen a la migración, proliferación, división celular, diferenciación, mantenimiento del fenotipo o apoptosis. Los principales son las citoquinas y los factores de crecimiento.^{1, 37}

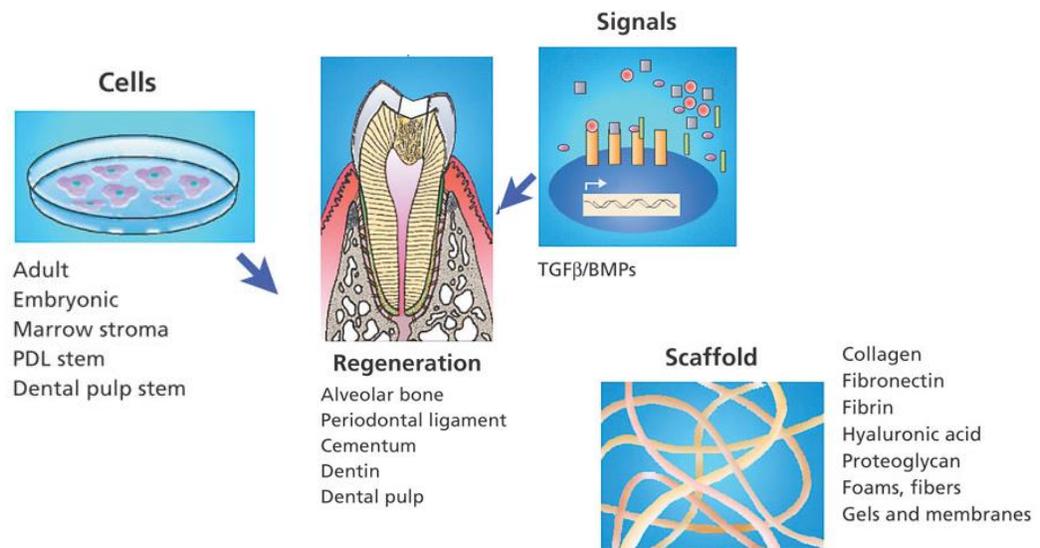


Fig. 18 Componentes de Ingeniería Tisular³⁸

6.2 Técnicas de Ingeniería Tisular

En la actualidad, la Ingeniería Tisular se puede llevar a cabo utilizando tres tipos de estrategias diferentes, las cuales dependen del uso de uno o más componentes fundamentales para guiar la regeneración de tejidos.

1.- Terapia celular o transferencia celular: las células son extraídas, aisladas y cultivadas, utilizando diferentes medios específicos que permiten el crecimiento y la proliferación de dichas células para posteriormente inyectarse en la circulación sanguínea o implantarse en determinadas zonas del organismo para poder, de ese modo, suplir la deficiencia estructural o funcional. El desafío está en la capacidad de mantener el fenotipo de las células inyectadas y su adecuada liberación. Esta estrategia parece ser prometedora en la regeneración de hueso y cartílago.^{14, 39}

2.- Inducción celular: la construcción de un nuevo tejido puede llevarse a cabo fomentando la inducción del mismo, en el propio organismo. Utilizando factores de crecimiento, que son capaces de estimular a las células troncales existentes en la región en la que se desea crear el nuevo tejido, con el objeto de potenciar su proliferación, su diferenciación y su distribución. Ejemplo de estos factores incluye; factor de crecimiento fibroblástico 2 y 9 (FGFs-2 y 9), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y proteína morfogenética ósea.^{14, 39, 40}

3.- Conducción o elaboración de constructos: un constructo es la estructura que resulta de la asociación de los tres elementos básicos: las células, andamios y factores de crecimiento. Las células aisladas

serán entonces expandidas en cultivo y finalmente sembradas dentro o sobre un andamio que define la forma del tejido y soporta las células durante su crecimiento. El diseño y la elaboración de constructos para uso clínico pueden adaptarse a las necesidades de cada paciente y deben conseguir: la naturaleza estructural y funcional de los tejidos naturales, el tamaño y forma deseada, la posibilidad de continuar su desarrollo una vez implantado en el cuerpo, exposición y liberación prolongada de dichas moléculas y la posibilidad de integrarse completamente al huésped.^{14, 37, 39, 40}

Idealmente, las células se adhieren al andamio, proliferan, se diferencian y forman el tejido requerido. Entonces el recién formado "organoide" puede ser trasplantado a continuación en el paciente. Otra opción para esta estrategia se basa en la implantación de los andamios acelulares en el defecto, mientras que las células del cuerpo pueden poblar el andamio para formar el nuevo tejido in situ.³⁹

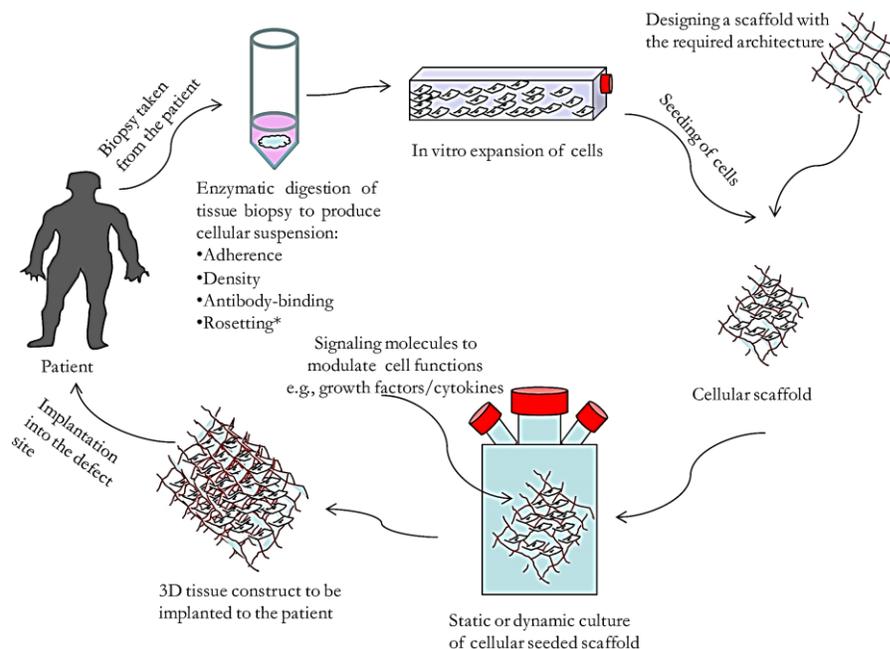


Fig. 19 Estrategia de Ingeniería Tisular³⁹

7. REGENERACIÓN TISULAR DENTOFACIAL

Aunque los tratamientos quirúrgicos convencionales para problemas dentofaciales congénitos y adquiridos siguen progresando, los resultados finales funcionales y estéticos pueden ser impredecibles y a veces insatisfactorios debido a complicaciones, infecciones y cicatrices. La medicina regenerativa da una nueva perspectiva para obtener mejores resultados.³³

7.1 Angiogénesis

Es un proceso clave en la Ingeniería Tisular, ya que para conseguir buenos resultados en este ámbito hace falta aporte de oxígeno y de nutrientes a las células implantadas o trasplantadas. Si no existe una rápida formación vascular hacia el tejido trasplantado éste se necrosará.¹

Estudios recientes evidenciaron que las DPSC eran capaces de producir factores proangiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la proteína quimio atrayente de monocitos (MCP-1), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y la endostatina. Hallaron que las DPSC no tenían influencia en la proliferación de las células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1), pero eran capaces de inducir la migración *in vitro* de estas HMEC-1. Los autores también realizaron un ensayo en membranas de pollo, en que se mostró *in vivo* que las DPSC son capaces de inducir la formación de vasos sanguíneos de modo significativo, siendo la secreción de moléculas angiogénicas, la responsable de esta inducción.⁴²

Otros autores evalúan el trasplante de DPSC en modelo animal, en ratones con isquemia de las extremidades posteriores, observando que en los casos

tratados con DPSC encontraban mayor flujo sanguíneo y una mayor densidad capilar comparadas con las de animales tratados con células troncales de médula ósea y tejido adiposo.⁴³

7.2 Complejo dentino-pulpar

A diferencia del esmalte, la dentina y la pulpa se pueden regenerar, sin embargo la pulpa al estar encerrada por la dentina y tener un limitado suministro de sangre apical, tiene una capacidad limitada para regenerarse.

La terapia con células troncales ha sido intentada para la regeneración del complejo dentino-pulpar. En un estudio aplicado en ratones inmunocomprometidos se observó que tejido similar al de la pulpa y dentina (con fibras colágenas y proteínas de la dentina como la sialoproteína dentinal), se puede regenerar en un espacio del conducto radicular, si es llenado por DPSC junto con un andamio de HA/TCP.^{3, 17, 20}

La Endodoncia Regenerativa se encarga de sustituir el tejido pulpar enfermo o traumatizado por tejido sano a través de la combinación de desinfección y desbridamiento de los sistemas radiculares con ampliación apical para permitir la revascularización con la aplicación de células troncales, andamios inyectables y factores de crecimiento.^{44, 45}



Fig.20 Jeringa diseñada para la inyección de hidrogeles en conductos radiculares⁴⁵

Se reportó un estudio en el que se presentaron tres casos que describen el tratamiento de dientes necróticos o inmaduros con periodontitis peri radicular, que no fue tratada con técnicas convencionales de apexificación. En este estudio, las células troncales dentales fueron obtenidas de la papila apical de terceros molares autólogos y fueron llevadas por andamios de hidrogel para llenar el espacio del canal radicular con el fin de estimular el desarrollo de la morfología del ápice. Todos los casos presentados desarrollaron ápices maduros y curación del hueso después de 3 a 4 meses, después del tratamiento sin complicaciones y más rápido que los tratamientos tradicionales.⁴⁵

Fig. 21 Radiografía preoperatoria de segundo premolar con ápice abierto y presencia de lesión⁴⁵



Fig. 22 Seguimiento a dos años⁴⁵



Caso 1

Paciente Femenino 20 años edad
Antecedentes: trauma
Segundo premolar inferior sin presencia de caries
Descoloración clínica de la corona
Negativo a pruebas de sensibilidad
Negativo a pruebas periodontales
Se diagnosticó necrosis pulpar

Radiografía inicial muestra ápice abierto de 5mm
Zona radiolúcida apical

Tratamiento realizado: acceso, limpieza de conducto, inyección de constructo y curación.

Observación posterior 30 días después: sin alteración, asintomático, cierre apical y engrosamiento de paredes del canal radicular.

Se preparó y obturó el conducto y se mantuvo en observación.

Andamios libres de células como Emdogain gel o combinación de Emdogain y plasma rico en plaquetas estimulan la regeneración del complejo dentino-pulpar. Los factores de crecimiento por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) han sido también incluidos dentro de los andamios para modular la función de las células troncales.

Debido al tamaño y el confinamiento de la pulpa dentro del canal de la raíz, la terapia celular y el uso de hidrogeles inyectables junto con la terapia ex vivo que consiste en el aislamiento de células troncales desde el tejido pulpar, su diferenciación en odontoblastos y finalmente su trasplante autólogo, representan el enfoque estratégico común para la ingeniería del complejo dentina-pulpa.

Sin embargo, la naturaleza altamente organizada y especializada de tal complejo, por ejemplo, la presencia de diferentes capas de células en un orden específico en la pulpa, requiere investigación a fondo para desarrollar una tecnología que permita el diseño de esta estructura jerárquica y hay más aspectos que deben afinarse como los irrigantes más adecuados que favorezcan las condiciones de mantenimiento celular, el tipo de antibiótico más adecuado o el nivel de inserción del constructo.

7.3 Periodonto

La periodontitis es una condición generalizada de la inflamación que causa la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes (encía, hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento radicular) y finalmente, la pérdida de los dientes. Estudios científicos recientes sugieren que la enfermedad periodontal desempeña un papel, en enfermedades sistémicas como diabetes mellitus y

enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, el tratamiento apropiado beneficiará la salud oral y sistémica general.

Regenerar el periodonto es un desafío debido a su compleja estructura, ya que requerirá múltiples poblaciones celulares o una población de células multipotenciales.³³

Potenciales factores de crecimiento para la regeneración periodontal incluyen: proteínas morfogenéticas óseas, factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento fibroblástico. La combinación de estos factores de crecimiento con membranas de colágeno mejoró la actividad celular de los osteoblastos humanos *in vitro*.²² Independientemente de la eficacia clínica de las membranas de colágeno en combinación con factores de crecimiento, la degradación *in vivo* de colágeno podría ser demasiado rápida para permitir la regeneración de tejidos en defectos de gran tamaño.

El uso de plasma rico en plaquetas (PRP) como fuente de factores de crecimiento se ha empleado también para mejorar la cicatrización periodontal y promover la regeneración de hueso. PRP demostró un aumento en la proliferación, diferenciación y la expresión génica de las células troncales del ligamento periodontal y de la pulpa dental. Esta combinación fue eficaz y se ha convertido en parte de la práctica clínica periodontal.²²

Trasplante de células derivadas del ligamento periodontal ha demostrado el potencial para regenerar la inserción periodontal en estructuras *in vivo*.

En un estudio clínico se evaluó el potencial de PDLSC autólogas (PDLAP) para la reconstrucción de defectos intraóseos en tres pacientes masculinos con periodontitis. Paciente A y B de 25 años de edad y paciente C de 45 años de edad, sin enfermedades sistémicas, no fumadores y con defectos óseos de 6 mm a 10 mm en el sondeo de profundidad. Los criterios de inclusión fueron:

dientes vitales, libres de signos radiográficos de abscesos periapicales, presencia de terceros molares para la obtención de PDL. El procedimiento fue: Fase I durante los tres primeros meses y debridación por colgajo con el injerto de un andamio de hidroxiapatita con PDLP sembradas.

Los resultados de este estudio clínico demostraron que paciente A y B, mostraron una recuperación significativa del tejido óseo y re inserción del epitelio. El paciente C, presentó mejoras en la movilidad dental y en la profundidad del sondaje. Los pacientes fueron monitoreados cuidadosamente sobre el curso de 3, 6, 12, 26, 32, 42 y 72 meses, en el que se evaluó la profundidad del sondaje y se observó una disminución constante en los niveles de profundidad. No hubo efectos adversos durante todo el seguimiento en todos los pacientes tratados. Esta investigación concluyó que el tratamiento quirúrgico basado en PDLSC autólogas pueden ser eficaces para la periodontitis.⁴⁶

Fig. 23 Paciente A.⁴⁶

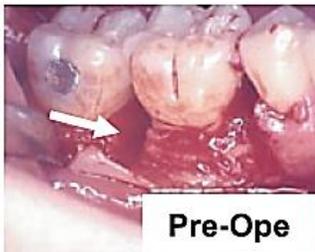
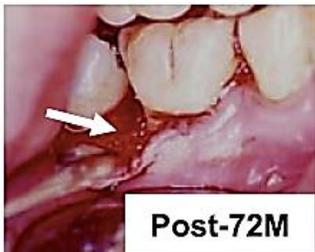
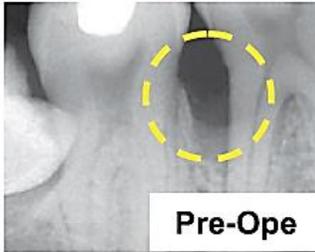
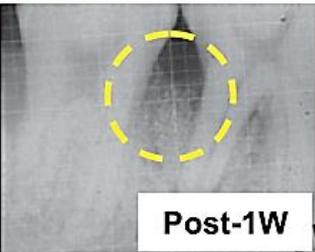
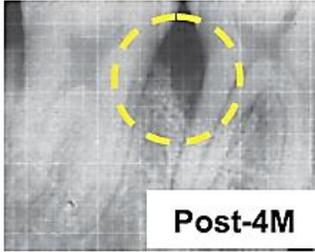
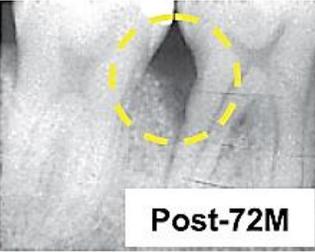
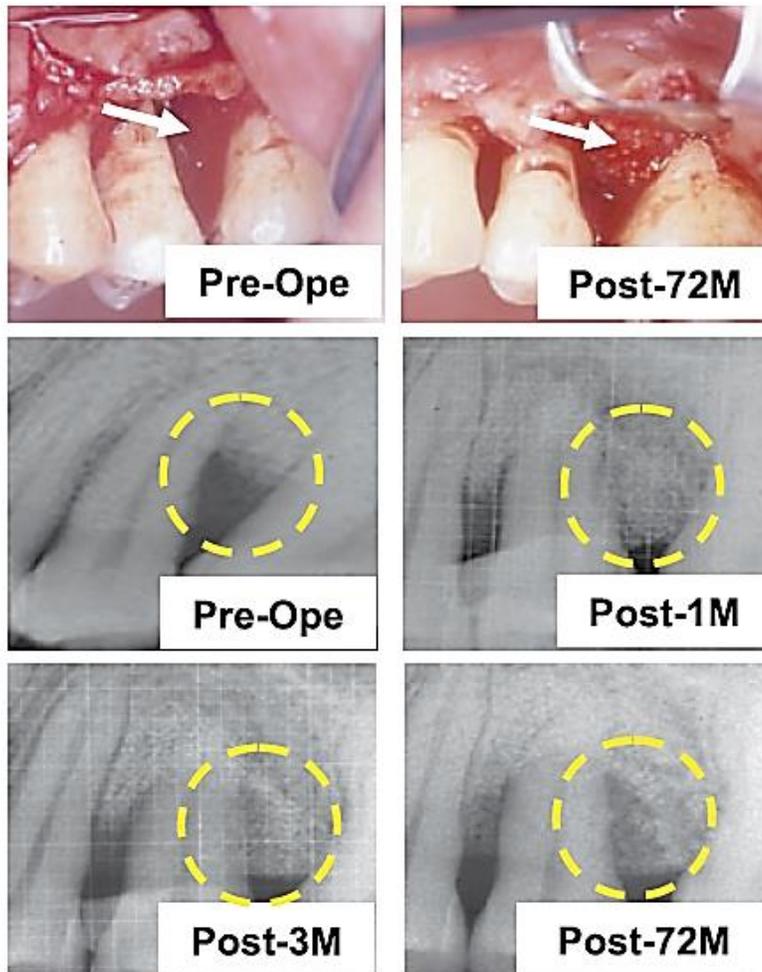
| | | Paciente A |
|---|---|--|
|  |  | Se muestra destrucción del tejido periodontal en preoperatorio causada por periodontitis (flecha en Pre-Ope). |
|  |  | Después de la implantación PDLP a 72 meses autóloga, la zona implantada mostró la regeneración del tejido periodontal (flechas en Post-72M). |
|  |  | El análisis radiográfico mostró reabsorción ósea en el período preoperatorio (círculo amarillo en el Pre-Ope) |
| | | Implantación PDLP a 1 semana después de la operación (círculo amarillo en Post-1W) |
| | | 4 meses de postoperatorio (círculo amarillo en Post-4M) |
| | | 72 meses después de la operación (círculo amarillo en post-72M). |

Fig. 24 Paciente B⁴⁴



La cuestión pendiente con esta terapia, es la medida en que cualquier periodonto reconstruido pueda mantener la integridad y función durante la masticación por largos periodos de tiempo.

PACIENTE B

Se observa destrucción del tejido periodontal en preoperatorio causada por periodontitis (flecha en Pre-Ope).

Después de la implantación PDLP a 72 meses, la reentrada quirúrgica a la zona implantada mostró la regeneración del tejido periodontal (flechas en Post-72M).

Análisis radiográfico mostró reabsorción ósea en el período preoperatorio (círculo amarillo en el Pre-Ope)

La implantación de PDLP en el mes después de la operación 1 (círculo amarillo en Post-1M)

3 meses después de la operación (círculo amarillo en Post-3M)

72 meses después de la operación (círculo amarillo en post-72M)

7.4 Hueso

En Odontología, los defectos óseos son afecciones que oscilan desde recesiones que miden milímetros hasta la resección completa de la mandíbula. Enfoques clínicos actuales para la reconstrucción de defectos óseos craneofaciales incluyen los injertos de hueso autólogo, injertos óseos alogénicos y los injertos prostéticos tales como placas de titanio.^{8, 33, 37}

Estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado que todas las poblaciones de células madre dentales demuestran la posibilidad de sufrir una diferenciación osteogénica *in vitro* y *in vivo*. La capacidad de las células troncales de diferenciarse en una variedad de tipos celulares, como las células endoteliales y nervios, puede aumentar la viabilidad de los injertos de células troncales resultando en una base más sólida de hueso.

Para iniciar el hueso en formación *in vitro*, las células troncales son estimuladas con sustancias químicas tales como ácido ascórbico, dexametasona y β -glicerofosfato que promueven la diferenciación osteogénica y mineralización.²⁰

Los principales factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y la osteogénesis son: BMP₂, TGF-beta y VEGF.³³

Se ha aceptado ampliamente la combinación de hidroxapatita y fosfato tricálcico (HA-TCP), ya que proporciona una buena capacidad de integración ósea y mantiene una tasa de reabsorción apropiada.¹⁹ Actualmente la combinación de colágeno, hidroxapatita, péptidos osteogénicos y células troncales es el biocomplejo idóneo.

Kawai y cols. Obtienen buenos resultados investigando la capacidad osteogénica de las DPSC, implantando DPSC con una matriz de colágeno en fracturas de fémur de ratas, comparando los resultados con un grupo de control en el que colocaban sólo una esponja de colágeno y con otro grupo en el que dejaban cicatrizar la fractura por sí misma. En el análisis histológico encontraron en los casos tratados con DPSC y esponja de colágeno un incremento significativo en el número y tamaño de los osteoblastos, así como en las tasas de mineralización, mientras que la tasa de reabsorción ósea disminuyó. El trasplante de DPSC en estos animales consiguió promover la osteogénesis y la cicatrización de la fractura de forma significativa.⁴⁷

En un estudio realizado por d`Aquino en Italia, se emplearon DPSC junto a una matriz de esponja de colágeno para regeneración ósea en humanos. La investigación se realizó en pacientes con reabsorción de la cresta alveolar distal al segundo molar inferior debido a la impactación del tercer molar, lo que generaba un defecto sin paredes de, al menos 1,5 cm de altura. Se extrajeron los terceros molares superiores, se aislaron y cultivaron sus DPSC. Se rellenaron en el mismo acto quirúrgico los defectos óseos postextracción de los terceros molares inferiores con matrices de esponja de colágeno impregnadas en unas 50 mil DPSC aproximadamente en un lado y esponjas de colágeno sin DPSC en el lado de control. En 7 días se apreciaba cómo en el lado con la matriz de células troncales existía mayor densidad ósea. Esos resultados se mantuvieron en el tiempo. A los 3 meses el lado tratado con el injerto autólogo de DPSC y colágeno mostró reparación vertical óptima (6,2 mm frente a 4,4mm). Las observaciones histológicas mostraron claramente una regeneración ósea completa en la zona tratada con DPSC, con un hueso bien organizado, bien vascularizado y con una estructura lamelar rodeada de canales haversianos frente a un hueso inmaduro, incompleto y con evidencias de reabsorción ósea en el lado de control.⁴⁸

Fig. 25 Lado control: exodoncia y extracción pulpar del diente. Se coloca una esponja de colágeno sin células troncales pulpaes en el lugar de la exodoncia y se sutura.⁴⁸

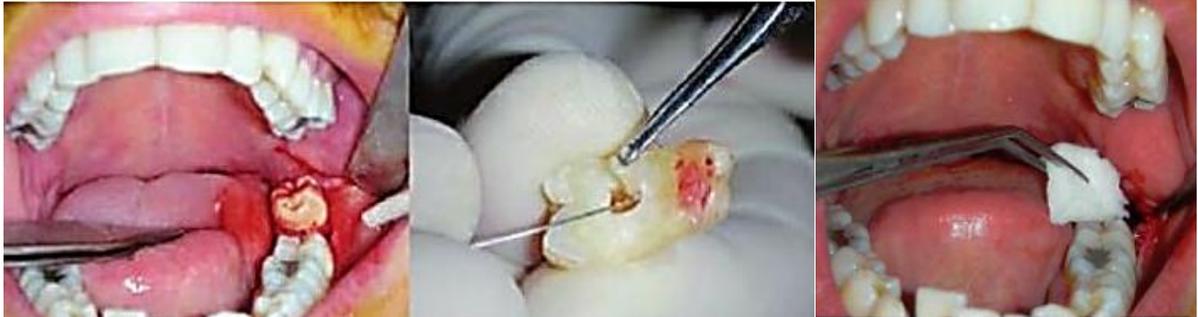


Fig. 26 Lado variable: extracción del tercer molar. Formación de biocomplejo a partir de la unión de la esponja de colágeno y las células troncales⁴⁸

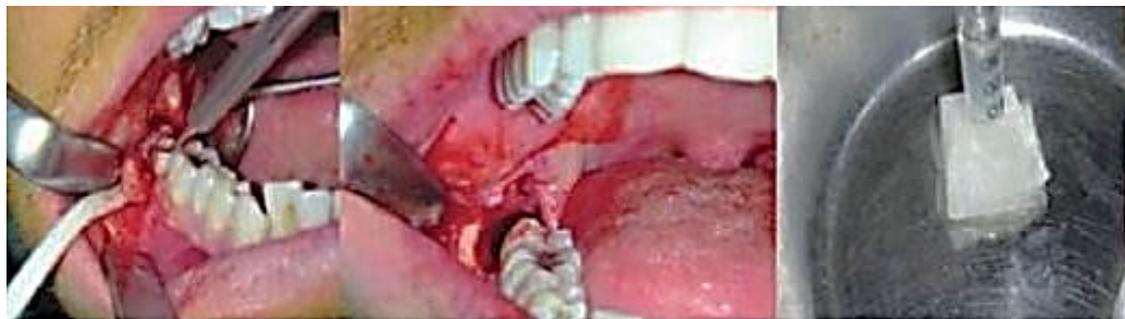


Fig. 27 Injerto del biocomplejo. Se termina la cirugía con los puntos de sutura⁴⁸

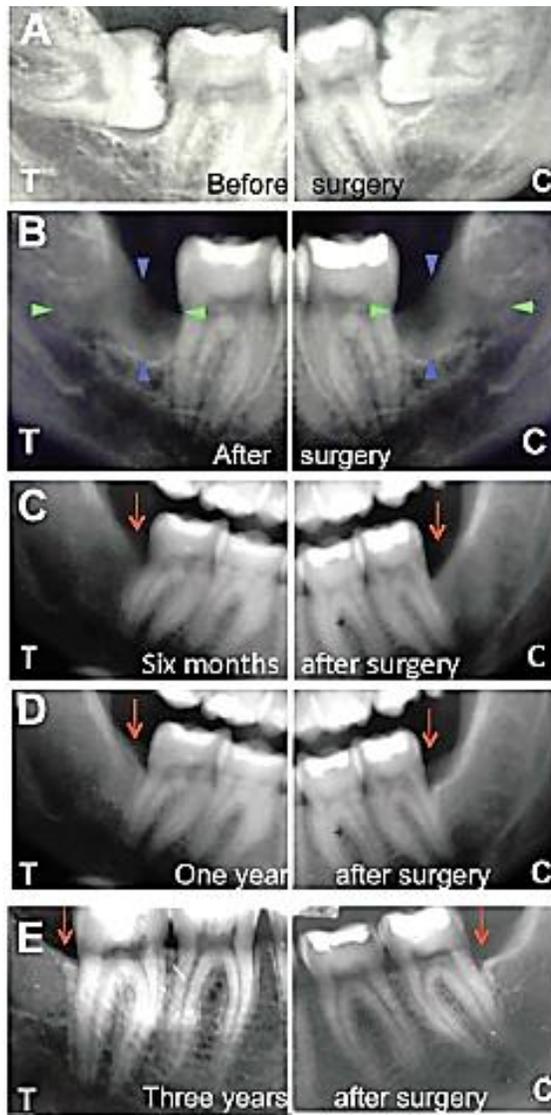


Fig. 28 Radiografía y control clínico 7 días después de la intervención quirúrgica. En el sitio T es posible observar la gran brecha detrás de las raíces distales del segundo molar derecho. La flecha doble amarilla evidencia la brecha vertical y la flecha de dos puntas blanca indica la brecha horizontal. (B) del lugar de ensayo. Sitio (C) de control⁴⁸



Tres años después se observó que el hueso regenerado por DPSC estaba compuesto de hueso compacto con buena vascularización, con mayor densidad en su matriz que los casos control. Observando la cavidad oral en buen estado, con mucosa oral y función dental en condiciones normales, descartando la presencia de inflamación, morbilidad o infección en los sitios de intervención. Según los autores, aunque este hueso regenerado no sea de la calidad habitual de la mandíbula, podría ser muy útil en algunas situaciones clínicas ya que al ser más compacto, podría incrementar la estabilidad de los implantes dentales.⁴⁹

Fig. 29 Radiografías mostrando los sitios T (trasplante de células) y C (lado control) de uno de los pacientes del estudio .⁴⁹



En A (antes de la cirugía), los terceros molares inferiores pueden verse en estrecho contacto con las raíces de los segundos molares.

En B (inmediatamente después de la cirugía) la profundidad del defecto, que es de las mismas dimensiones en ambos lados, es claramente visible. Las puntas de flecha azules indican la brecha vertical, mientras que las puntas de flecha verdes muestran la brecha horizontal.

En C (6 meses después de la cirugía) se observa una regeneración vertical, más evidente en el sitio de T.

En D (un año después de la intervención), la regeneración ósea fue mayor en el sitio T; había menos exposición de la raíz distal del segundo molar que en el sitio C.

En E (tres años después de la cirugía), el sitio T fue completamente regenerado, con una mejor altura ósea vertical con respecto al sitio C.

Las flechas rojas indican las uniones cemento-esmalte.

A pesar de los resultados positivos, este procedimiento sólo se pudo seguir con 7 pacientes, por tanto, se debería repetir en una población más amplia para comprobar si efectivamente funciona.

En 2010 en el Hospital infantil de Cincinnati, Taylor realizó la reconstrucción bilateral del arco cigomático de un paciente con síndrome de Treacher Collins a través de un andamio con células troncales de tejido adiposo y factores de

crecimiento. Las pruebas histológicas revelaron la formación de hueso laminar sano, tras el tratamiento no se presentaron complicaciones a 6 meses de seguimiento.³⁷

7.5 Mucosa oral

La fabricación de mucosa oral mediante la Ingeniería Tisular se realiza a partir de queratinocitos y fibroblastos procedentes de pequeñas biopsias de la cavidad bucal. Los queratinocitos y fibroblastos se aíslan y expanden en cultivos específicos que estimulan el desarrollo de ambas estirpes celulares. El siguiente paso consiste en la fabricación de una lámina propia artificial que aloje a las células y de consistencia a la mucosa. Para ello se han utilizado compuestos como colágeno, gel de fibrina, agarosa o mezclas de ellos.¹⁴

La elaboración *in vitro* de la mucosa oral se realiza sobre soportes porosos de policarbonato, depositando primero el corión artificial, con los fibroblastos en su interior, y colocando posteriormente sobre él los queratinocitos previamente aislados y expandidos, todo ello en un medio de cultivo adecuado que se va renovando progresivamente. En varios días se produce proliferación y diferenciación de la población queratinocítica. En la lámina propia artificial, los fibroblastos comienzan a sintetizar material extracelular, especialmente colágeno.

7.6 Glándulas salivales

El tratamiento de la patología hipofuncional de las glándulas salivales es otro de los campos donde las DPSC están siendo investigadas con buenos resultados, considerándolas una buena alternativa terapéutica.

La xerostomía es debida a una reducción funcional de las glándulas salivales, bien por Síndrome de Sjögren, por radioterapia para tratamiento de cáncer de

cabeza y cuello, por fármacos, diabetes o por la edad, haciendo que los pacientes tengan dificultades al tragar o hablar, a la vez pueden causar enfermedades dentales como caries y periodontales como la gingivitis.

En la Universidad de Washington se han investigado en ratas los efectos de añadir o no DPSC a células troncales de glándulas salivales (HSG) en un hidrogel de ácido hialurónico. En el grupo tratado con DPSC+HSG aproximadamente 1 millón de células de cada tipo, hallaron una mayor expresión de marcadores mesenquimales, endoteliales, neuronales, angiogénicos y de diferenciación a glándula salival madura. Asimismo encontraron estructuras hacinadas y ductales con abundante vascularización, más maduras y también mostraron la producción de α -amilasa salival. Los autores concluyen que las DPSC tienen potencial en terapia celular como inductoras mesenquimales en regeneración, reparación e Ingeniería Tisular glandular.⁵⁹

7.7 Bioingeniería dental

En la última década, los implantes dentales se han convertido en la técnica más practicada y confiable para la restauración de la dentición. Sin embargo, conlleva desventajas como la falta de contorno natural, ausencia de ligamento periodontal y relación estructural con el hueso alveolar. Estas deficiencias han llevado a la búsqueda de otras alternativas.

La meta de la regeneración dental es complicada por la naturaleza del diente mismo. Un diente intacto se compone por cuatro distintos tejidos: pulpa, dentina, esmalte y cemento. La raíz del diente es apoyada por el ligamento periodontal y rodeada por el hueso alveolar. Esta diversidad de tejidos junto con la necesidad de que el diente pueda soportar las fuerzas de masticación hace bastante compleja la Ingeniería Tisular de la dentición.

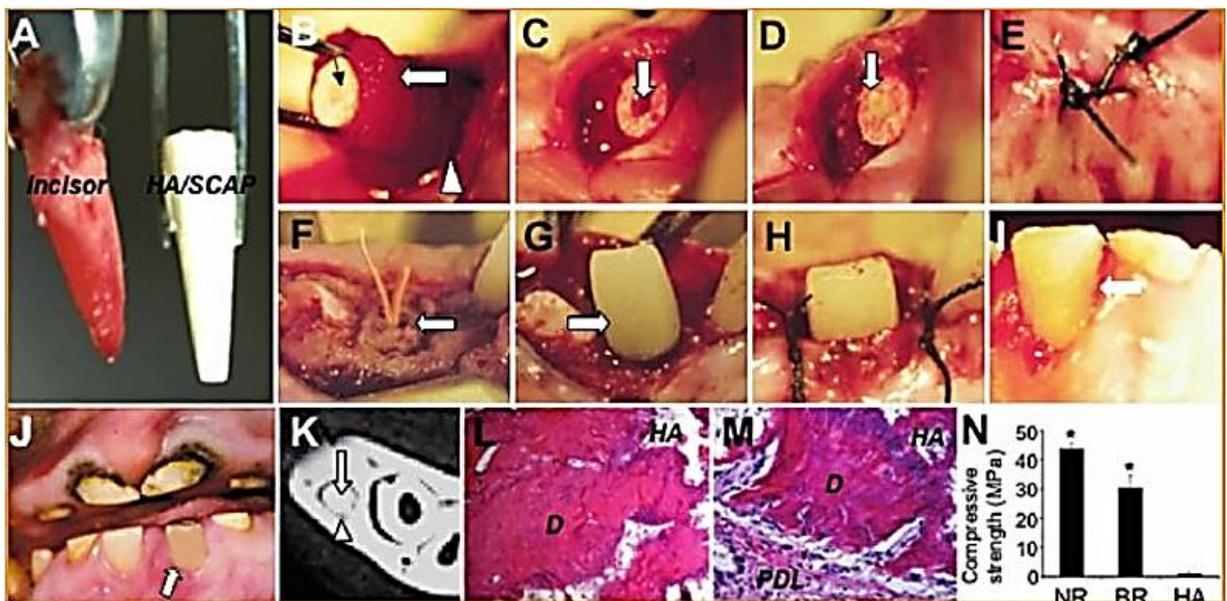
En una investigación realizada por Tzong-Fu et al se decide llevar a cabo la regeneración de tejidos dentinarios y pulpares, con el propósito adicional de saber si estas estructuras, tras ser trasplantadas en mandíbulas de cerdos, tendrían algún tipo de función. Utilizaron un andamiaje a base de un tri-copolímero formado por gelatina, condroitina y ácido hialurónico, con un tamaño de poro uniforme de 180 micras. Las células troncales que fueron utilizadas eran provenientes del folículo dental (porcino) y, como resultado, demostraron la regeneración de un diente con la formación de raíz, dentina, pulpa, cemento y ligamento periodontal. En 36 semanas, se regeneraron dientes en dos de los seis cerdos. El resto de ellos presentó un tejido tipo dentina-hueso sin ningún tipo de organización dental o periodontal.

Se observó que los dientes eran más pequeños de lo normal y sin presencia de esmalte. Proponen que el tamaño de los dientes es proporcional al andamiaje utilizado, ya que las piezas dentarias regeneradas son de las mismas dimensiones del andamiaje. Estos autores pudieron encontrar una estructura dentino-pulpar, con sus túbulos dentinarios, cemento y ligamento periodontal unido al hueso.⁵¹

En Estados Unidos consiguieron generar nuevas raíces dentales en cerdos gracias a células troncales procedentes de dientes humanos. En lugar de intentar formar un diente entero, Sonoyama y su equipo se propusieron generar una “bio-raíz” mediante la utilización de SCAP y PDLSC, para una posterior colocación de una corona de porcelana en cerdos. Una vez identificadas las células troncales apropiadas para crear una nueva raíz dental, estos investigadores reemplazaron un incisivo de un cerdo enano por una estructura en forma de raíz, hecha de material cerámico de hidroxiapatita y fosfato tricálcico (HA/TCP) que servía de andamio y vehículo transportador de SCAP y PDLSC procedentes de los terceros molares de jóvenes de entre 18 y 20 años de edad. Tres meses después de implantar estas células se

incorporó una corona sintética de porcelana sobre la nueva raíz remineralizada que contaba con nuevos ligamentos desarrollados ahí mismo y un tejido mineralizado parecido a la raíz. Se demostró que los nuevos tejidos formados eran humanos, después de 6 meses de la implantación se comprobó que, aunque el nuevo diente no era tan resistente (aproximadamente dos tercios de un diente natural), tenía la suficiente calidad como para cumplir su función.^{3, 22}

Fig. 30 Raíz y estructura periodontal con corona en cerdos. ^{3, 22}



(A) Incisivo porcino extraído y estructura en forma de raíz, sembrada con células troncales de la papila apical. (B) Andamio sembrado con células troncales del ligamento periodontal, cubriendo el andamio cargado con SCAP. Éstas se implantan en el alveolo del incisivo inferior. (C) Implantación en el alveolo tras la extracción del incisivo inferior. Se observa un canal creado previamente en el centro del andamio (flecha). (D) Se sella el canal con un relleno temporal para cementar la corona de porcelana en el próximo paso. (E) Se sutura el implante para 3 meses. (F) Se expone el implante y se remueve el relleno temporal, descubriendo de nuevo el canal del andamio. (G) Una corona prefabricada se cementa en la estructura. (H) Sutura de la porción expuesta. (I, J) Tras cuatro semanas, se pudo observar cómo la corona se retuvo, tras el funcionamiento

normal de esa pieza. (K) Después de 3 meses, el implante formó una estructura dura a nivel radicular en el área incisal, demostrada con TAC. Se observa un espacio de ligamento periodontal entre el implante y el tejido óseo (flecha). (L, M) Se aprecia que el implante contiene dentina nuevamente regenerada dentro del implante y tejido periodontal en la parte externa. (N) Análisis de las fuerzas compresivas. Las bio-raíces nuevamente formadas tienen una mayor fuerza que el andamio original, pero menor que una raíz natural.

Independientemente de estos logros, varios desafíos deben ser enfrentados. Por ejemplo, alcanzar la continuidad del diente diseñado, con el hueso de la mandíbula por periodonto completamente funcional y pulpa altamente vascularizado, la comprensión de los acontecimientos que están involucrados en la ingeniería de un tipo específico de dientes (incisivos, caninos, premolares o molares), una vez recibiendo el tipo requerido de diente, el control de la anatomía y el color de los dientes es otra área que requiere investigación.

Tabla 3. Descripción general de formación *in vivo* de tejido duro utilizando células troncales de origen dental^{20, 50}

| Tipo celular | Andamio | Área del implante y tipo animal | Resultados reportados |
|---------------------|-----------------|--|--|
| DPSC | PLGA | Implante subcutáneo en conejos | Estructura de dentina blancos |
| DPSC | Gel de colágeno | Hueso alveolar de diente perdido de ratón adulto | Formación de diente funcional en 3D |
| DPSC | BMP2 | En región pulpar amputada de perros adultos | Formación de dentina |
| DPSC | PRP | Defecto óseo mandibular de perros adultos | Formación ósea alrededor del implante dental |

7.8 Córnea

La cornea es la capa externa transparente ubicada sobre el iris y su función es transmitir y refractar la luz que ingresa al ojo hacia la retina.

Células troncales epiteliales corneales se encuentran en la capa basal del limbo; la zona de transición entre la córnea y la conjuntiva bulbar. Estas células son importantes porque regeneran la córnea y su deficiencia produce opacidad, erosiones, dolor, lagrimeo, fotofobia y pérdida de la visión.⁵²

Insuficiencia límbica puede ser causada por una variedad de condiciones, tales como trastornos genéticos, lesiones químicas o térmicas, radiación, enfermedades inflamatorias y cirugías previas.⁵²

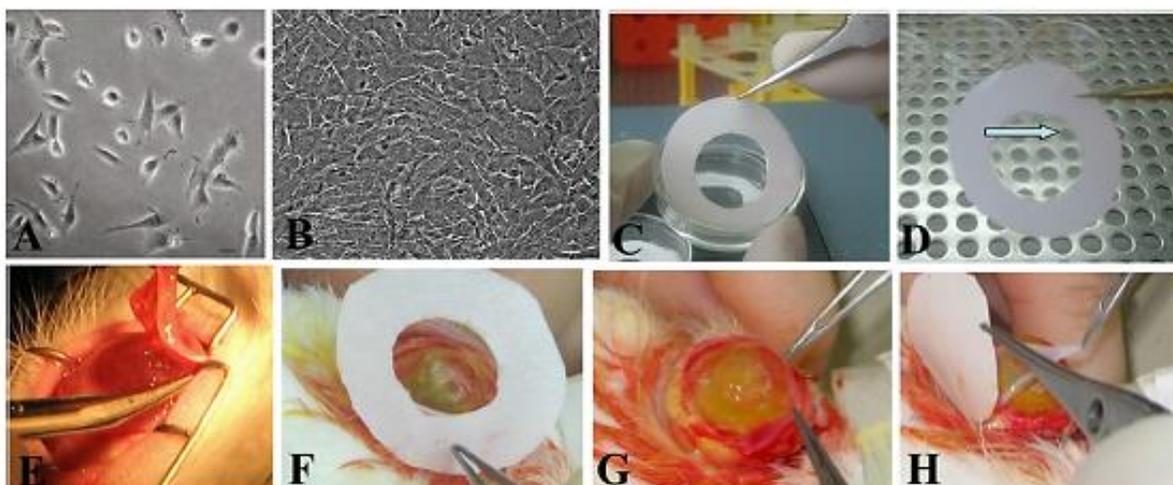
En los pacientes con deficiencia de células troncales limbares unilateral, el trasplante de limbo corneal del ojo contralateral es un método aplicable, sin embargo, causa una deficiencia de células troncales limbares del ojo sano. Este procedimiento requiere la inmunosupresión a largo plazo que implica altos riesgos oculares y complicaciones sistémicas serias. Para resolver estos problemas, la reconstrucción de la superficie ocular con células troncales de la mucosa oral se ha aplicado con éxito en los pacientes.^{52, 53}

Existen varios grupos de investigación realizados con éxito en animales para la reconstrucción de córnea, ya que las SHED y las células troncales de la mucosa oral expresan marcadores corneales *in vitro*.⁵⁴

Pereira y cols. Evaluaron en conejos el tratamiento del déficit total de células troncales del limbo con una matriz celular generada *in vitro* compuesta por SHED. A los 3 meses evidenciaron una mejora en la transparencia corneal de

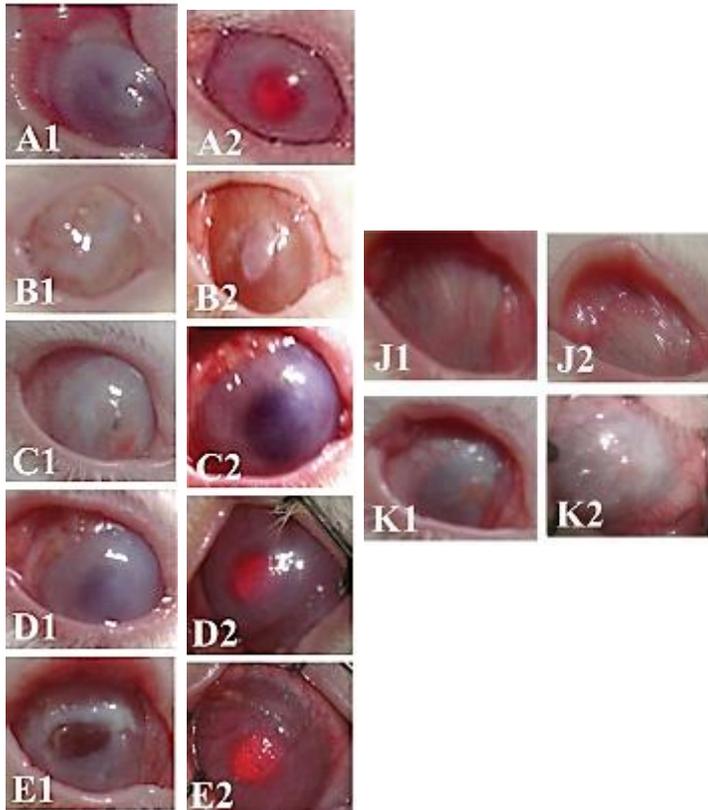
los casos tratados con SHED frente a una total conjuntivalización y opacificación de las córneas de los controles. Estos datos fueron confirmados mediante estudio histológico en el que se observó un epitelio corneal sano y uniforme con menor neo-vascularización, en los casos tratados con SHED.⁵⁵

Fig. 31 Trasplante de lámina de células de tejido de ingeniería hecha de SHED indiferenciadas⁵⁴



(A) Morfología de SHED. (B) Tres días después de alcanzar confluencia, las células forman una lámina de células. (C) La lámina de células viables se cosecha mediante la reducción de la temperatura a 20 ° C durante 30 minutos. (D) Hoja de SHED (flecha) se cosecha con el uso de un partidario en forma de rosquilla (blanco). Tejido (E) la conjuntiva sobre la córnea se extirpa quirúrgicamente para exponer el estroma corneal transparente. (F) Hoja de SHED se coloca en el lecho estromal. (G) La hoja se adhiere al estroma de la córnea y se retira el apoyo. (H) Membrana amniótica se coloca sobre la hoja de células y se sutura.

Fig. 32 Ojos de conejos antes y después de la cirugía⁵⁴



(A1-E1) muestran los ojos de los conejos después de un mes de quemadura química (A2-E2) muestran los ojos de los conejos 3 meses después del trasplante de lámina de células (J1-K1) y (J2-K2) muestran los ojos de los conejos después de quemadura química y trasplante de membrana

Un estudio clínico en Japón, demostró la capacidad de las células troncales de la mucosa oral para regenerar córnea. Los pacientes tratados tenían deficiencia limbar en ambos ojos. En cada paciente se realizó una biopsia excisional de 3mm por 3mm de tejido de la mucosa oral. Células troncales de la mucosa oral fueron aisladas y cultivadas, reduciendo la temperatura del cultivo de 37° C a 20° C, se pudo separar las células cultivadas de la superficie como una lámina de células trasplantables, excluyendo así la utilización de un andamio. Posteriormente la lámina cosechada se colocó sobre el lecho estromal, cubriéndose con un lente de contacto blando para su protección durante su curación. Dentro de una semana se observó la reepitelización

completa de la superficie de la córnea. Durante un periodo de seguimiento de 14 meses, la transparencia corneal se mantuvo, mejorando la agudeza visual paulatinamente y no se observaron complicaciones.^{52, 56}

Los autores indican que esta terapia tiene una tasa de éxito superior al 70% a tres años de seguimiento.

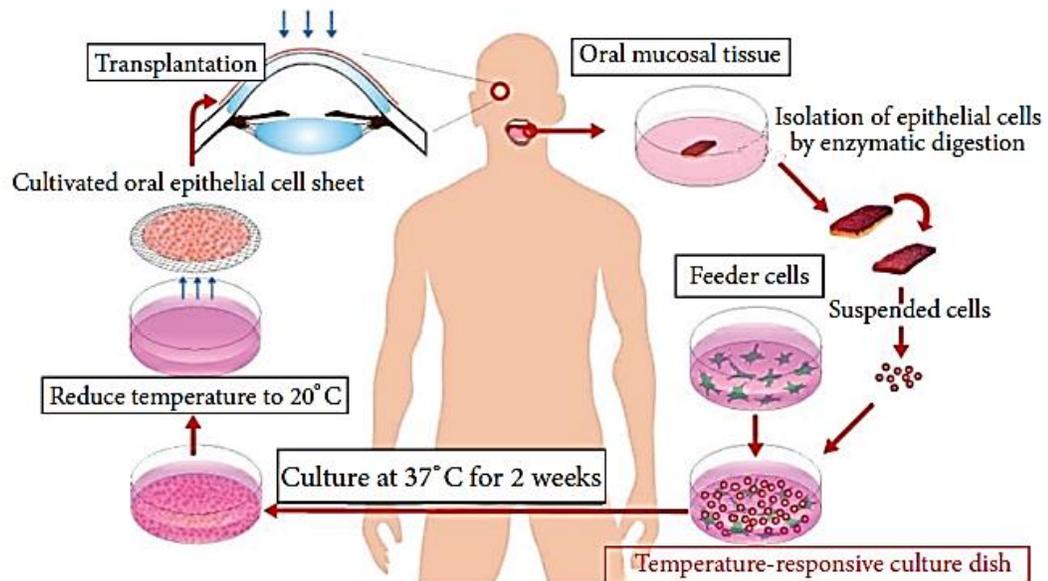


Fig. 33 Reconstrucción de la superficie ocular mediante el trasplante autólogo de láminas de células fabricados a partir de células epiteliales de la mucosa oral⁵²

8. ASPECTOS LEGALES

8.1 Normas legales

Los avances en el campo relacionado con las células troncales, han llevado a los investigadores a plantear interrogantes que sobrepasan el ámbito médico e incurren en el campo de su regulación jurídica.

Hasta ahora no existe una Norma Oficial Mexicana por parte de las autoridades de la Secretaría de Salud que determine con detalle el uso, resguardo, reglamentación, manipulación, propiedad y aplicación terapéutica de las células troncales de cualquier tipo, creando un vacío legal en nuestro país, lo cual favorece la desinformación.

La Ley General de Salud se encarga de regular este tipo de material biológico, sin embargo, no se refiere específicamente a la clonación o manipulación de células troncales. En relación con la investigación con seres humanos y el proceso de clonación, La Ley General de Salud establece las siguientes bases en su artículo 100:⁵⁷

- I. Debe adaptarse a los principios científicos y éticos que justifican la investigación médica, especialmente a la posible contribución a la solución de problemas de salud y al desarrollo de nuevos campos de la ciencia médica.
- II. Podrá realizarse sólo cuando el conocimiento que se pretenda producir no pueda obtenerse por otro método idóneo.
- III. Podrá efectuarse sólo cuando exista razonable seguridad de no exponer a riesgos ni daños innecesarios al sujeto en experimentación.



- IV. Se deberá contar con el consentimiento informado por escrito del sujeto en quien se realizará la investigación, o de su representante en caso de incapacidad legal.
- V. Sólo podrá realizarse por profesionales de la salud e instituciones médicas que actúen bajo la vigilancia de las autoridades sanitarias competentes.
- VI. El profesional responsable suspenderá la investigación en cualquier momento, si sobreviene el riesgo de lesiones graves, invalidez o muerte del sujeto en quien se realice la investigación.

Para la obtención de células troncales de origen dental, se deben tomar en cuenta los siguientes requisitos médico-legales³:

- ✓ Reglamento de la Ley General de Salud (RLGS)
- ✓ Reglamento General de Salud en Materia de Control Sanitario
- ✓ Historia Clínica
- ✓ Consentimiento Informado
- ✓ Comisión General para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)
- ✓ Food and Drug Administration (FDA)
- ✓ Human Tissue Authority (HTA)

8.2 Bancos privados de células

Los bancos privados de células troncales han sido promovidos por empresas privadas en todo el mundo.

Estos bancos ofrecen:

- Planes a largo plazo para criopreservar las células troncales, dando como última oportunidad la recolección de dientes deciduos para la obtención de células troncales.
- Información donde afirman que las células troncales dentales pueden curar enfermedades sistémicas y neurodegenerativas, del propio paciente y sus familiares.
- Dar un seguimiento real por internet a los pacientes, del proceso de obtención, de sus células troncales.

La aplicación de las células troncales dentales para el tratamiento de enfermedades sistémicas y neurodegenerativas, sigue en etapa clínica de investigación.

El uso de las células troncales dentales extraídas de un paciente menor de edad, no podrán ser usadas por sus familiares hasta que éste cumpla la mayoría de edad.

Estudios contados han demostrado que las células congeladas mantienen sus propiedades después de su criopreservación por 3 años, pero ni un estudio ha evaluado los efectos del almacenamiento a largo plazo (10 años) y teniendo en cuenta que los niños pierden naturalmente 20 dientes deciduos y con frecuencia los terceros molares son extraídos con fines clínicos o de ortodoncia, los dientes representan una fuente accesible y mínimamente invasiva con múltiples oportunidades para obtener estas células a diferencia

de las de cordón umbilical. Además la probabilidad de uso es de 1 en 600 mil casos si es autólogo y 1 en 20 mil casos si es alogénico, por lo que adquirir un plan de criopreservación a largo plazo, de células troncales de dientes temporales exfoliados no es opción recomendable.

Fig. 34 Slogan y plan de pago para la criopreservación de células del banco privado Bioeden México.⁵⁸



| BioEden  | | Precio (USD) |
|---|--|--------------|
| 1 Hijo | | |
| 1 Año de preservación | | \$865 |
| 6 Años " | | \$1,260 |
| 11 Años " | | \$1,660 |
| 21 Años " | | \$2,365 |

Únete a los miles de padres que ya protegen el futuro de la salud de sus hijos, por medio de la preservación de las Células Madre de los dientes.



CONCLUSIONES

La Ingeniería Tisular en Odontología se visualiza en el futuro como una terapia regenerativa de vanguardia que permitirá mejorar la calidad de vida de los pacientes a través del uso de células autólogas, provenientes de tejidos dentales con mínima invasión para su extracción y con el potencial de reducir complicaciones después de la terapia aplicada.

Numerosos estudios han reportado, que las células troncales mesenquimales de origen dental son viables por sus características, para el tratamiento de lesiones orales y tienen interactividad con biomateriales para su aplicación en la Ingeniería Tisular.

Actualmente estas terapias ya se están utilizando para el tratamiento de patologías en diversos órganos, pero con el sistema estomatognático su aplicación se encuentra en etapas de investigación.

Por el uso de andamios diferentes y la heterogeneidad de los estudios, es necesaria la elaboración de mayor número de ensayos clínicos controlados que corroboren los resultados obtenidos por las investigaciones realizadas en modelos animales de experimentación e *in vitro*, investigando en profundidad los mecanismos de diferenciación, crecimiento, interacción de células troncales con el sistema inmunológico, interacción con los biomateriales aplicados en andamios, así como todas las variables que puedan influir en los resultados, para desarrollar la aplicación clínica óptima y segura de esta terapia.

Los odontólogos están posicionados para convertirse en uno de los principales proveedores de células troncales; pudiendo participar en la extracción, recolección y aplicación de las células troncales de los dientes de



sus pacientes. Es por esto que los que participan en este nuevo rol, deberían ser conscientes de las características, aplicaciones y usos clínicos de células troncales, así como el asesoramiento a pacientes del uso de bancos privados.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Demarco F, Conde MCM, Cavalcanti B, Casagrande L, Sakai V. **Dental Pulp Tissue Engineering**. Journal Braz Dent, 2011; 22:3-13.
2. Magallanes F., Carmona B., Álvarez M., **Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental**. Clínica de Odontopediatría, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM, 2010; 14 (1):15-20.
3. Soto E., Vargas L, Oropeza M, Sánchez P, Moran A, García M. **Células pluripotenciales de la pulpa dental humana/ El futuro de la regeneración en Odontología**. Odontología actual/ año11, núm. 130, 2014.
4. Munevar J., Becerra A., Bermúdez O., **Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucradas en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica odontológica**. Acta Odontológica Venezolana, 2009, vol.46, no. 3.
5. Marawar PP, Mani A, Sachdev S, Sodhi NK, Anju A. **Stem cells in dentistry: An overview**. Pravara Med Rev 2012; 4(2).
6. He, S., Nakada, D., y Morrison, S. J. **Mechanisms of stem cell renewal**. Annu Rev Cell Dev Biol 25, 2009, 377-406.
7. Lukomosa, B. **Stem cells and their outstanding concerns**. Journal of Veterinary Ophthalmology, 2012, 1: 1-9.
8. Sreenivas S. D., Sreenivas Rao A. **Where Will the Stem Cell Lead Us? Prospects for Dentistry in the 21 Century**. Journal of Indian Society of Periodontology, 2011, 199-204.
9. <http://lascelulasmadre.es/tipos> (04/10/14)
10. <http://www.reproduccionasistida.org> (04/10/14)
11. <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/stem-cell3.htm> (04/10/14)



12. Ranganathan K, Lakshminarayanan V. **Stem cells of the dental pulp**
Indian Journal of Dental Research, 2012, volume 23, issue 4: 558.
13. Boj J. Catalá m. García C. Mendoza A. **Odontopediatría**, 1ª ed.
Barcelona, (España). Editorial Masson, 2005. Pág. 56.
14. Gómez de Ferraris. **Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental**, 3ª ed. México: Editorial Mexicana Panamericana, 2009.
15. Razieh K., Mohamadreza E. **Dental-Related Stem Cells and Their Potential in Regenerative Medicine**, 2013. Regenerative Medicine and Tissue Engineering, 978-953-51-1108-5.
16. Mao J.J, Giannobile W., Helms J. A. **Craniofacial Tissue Engineering by Stem Cells**. J Dent Res. 2008; 85: 966-979.
17. Valencia R, Espinoza R, Sadia Marc. **Células madre de la pulpa de dientes primarios y permanentes**. Odontopediatría actual, 2011, año1, núm. 1.
18. Lee S-Y, **Effects of Cryopreservation of Intact Teeth on the Isolated Dental Pulp Stem Cells**, Basic Research Biology, 2010
19. Horst et al. **Stem Cell and Biomaterials Research in Dental Tissue Engineering and Regeneration**. Dent Clin North Am, 2012; 56(3): 495-520
20. Kim B-C, Bae H, Kwon Il-K, Lee E, Park J, Hwang Y. **Osteoblastic/cementoblastic and neural differentiation of Dental Stem Cells and their applications to Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Tissue Engineering, volume 18, number 3, 2012.
21. Gartner L, Hiatt J. **Texto Atlas de Histología**. 3 ed., Mc Graw Hill.
22. Huang J, Gronthos S, Shi S. **Mesenchymal Stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: Their Biology and regenerative medicine**. J Dent Res. 2009, 88 (9).
23. <http://www.stemcellsuniverse.info/differentiation-of-stem-cells-in-dental-follicles/> (05/10/14)



24. Zhang Q, Nguyen A, Yu W. **Human Oral Mucosa and Gingiva: A Unique Reservoir for Mesenchymal Stem Cells**. Journal of Dental Research, 2012; 91 (11)
25. Dieter W, Dannan A, et al., **Translational Research: Palatal- derived Ecto-mesenchymal Stem Cells from Human Palate: A new Hope for Alveolar Bone and Cranio-Facial Bone Reconstruction**, International Journal of Stem Cells, 2014, 7: 23-29.
26. Pineda C., Londoño C. **Obtención y diferenciación de células ADAS al linaje osteogénico**, Rev. Ingeniería Biomédica, 2009, vol. 3, no. 5.
27. Estrela C et al. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz. Dent. J.* [online]. 2011, vol.22, n.2.
28. <https://www.youtube.com/watch?v=CrRqBA5nwVE> (12/10/14)
29. <https://www.youtube.com/watch?v=CJT3F7vaRCE&list=FLlyqw3T0SC4KpLSCrMlgsvw&index=2> (12/10/14)
30. <https://www.youtube.com/watch?v=8zArdA29XRQ&list=FLlyqw3T0SC4KpLSCrMlgsvw&index=3> (12/10/14)
31. Ding G, Wang W, Liu Y, et al., **Effect of Cryopreservation on Biological and Immunological Properties of Stem Cells from Apical Papilla**, Journal of Cellular Physiology, 2010, 223:415-422.
32. <https://www.youtube.com/watch?v=CJT3F7vaRCE&index=2&list=FLlyqw3T0SC4KpLSCrMlgsvw> (12/10/14)
33. Sanchez-Lara PA, Zhao H, Bajpai R, Abdehamid AI and Waburton D. **Impact of Stem cells in craniofacial regenerative medicine**. Front. Physio. 2012, 3:188.
34. https://fbcdnphotosfa.akamaihd.net/hphotosakash3/61400_10151023252772854_1996765355_n.jp (05/10/14)
35. Ma L, et al. **Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth, is a feasible stem cell resource for regenerative medicine**. PLoS ONE 2012; 7 (12): e51777.



36. https://fbcdnphotosfa.akamaihd.net/hphotosakash3/61400_10151023252772854_1996765355_n.jpg (12/10/14)
37. Rosales R, Alvarado K, Ojeda F. **Tissue Engineering in Dentistry**, Journal ADM, 2012/ Vol. 59 No. 4, Pp. 164-167.
38. <http://www.nature.com/nbt/journal/v21/n9/full/nbt864.html>
39. Abou E, Chrzanowski W, Salih V, Kim H-W, Knowles J. **Tissue engineering in dentistry**. Journal of Dentistry, 2014; 42:915-928.
40. Scheller E, Backhaus P and Kohn D. **Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation**. J Oral Eg, 2009; 36 (5):368-389.
41. Verma K, Bains R, Bains V, et al. **Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview**. Dent Res Journal, 2014; 3 11: 302-308
42. Bronckaers A, et al. **Angiogenesis properties of human dental pulp stem cells**. PloS ONE, 2013; 8 (8): e71104.
43. Ishizaka R, et al. **Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp**. Biomaterials, 2013; 34: 1888-1897.
44. Kabir R, et al. **Imperative role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapies**. Niger J Surg. 2014; 1 20: 1-8
45. Shiehzadeh V, Aghmasheh F, Shiehzadeh F, Joulae M. **Healing of large periapical lesions following delivery of dental Stem cells with an injectable scaffold: new method and three case reports**. Indian J Dent Res 2014; 25:248-53.
46. Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, et al. **Utility of PDL progenitors for in vivo Tissue regeneration: A report of 3 cases**. Oral Diseases, 2010; 16, 20-28
47. Kawai G, et al. **Human DPSC facilitates bone regeneration in a rat bone defect model**. Bone Tissue Regener Insights 2013; 4: 1-10



48. d' Aquino R, et al. **Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes.** Eur Cell Mater 2009; 18:75-83
49. Giullani A, et al. **Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that Stem cells regenerated a compact rather than spongy bone: Biological a clinical implications.** Stem Cells Translat Med 2013; 2: 316-324
50. Daltoé F, Mendoca P, Mantesso A, Deboni M. **Can SHED or DPSCs be used to repair/regenerate non-dental tissues? A systematic review of in vivo studies.** Systematic Review Oral Pathology Braz Oral Res., 2014; 28 (1):1-7.
51. Tzong-Fu K et al. **Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin hyaluronic tri-copolymer scaffold in swine.** Journal of Biomedical Materials Research. 2008: 86 A: 1062-1068
52. Y. Oie, K. Nishida. **Regenerative Medicine for the Cornea,** Bio Med Research International, 2013, article ID 428247.
53. Fei Li, Shao-Zhen Zhao. **Mesenchymal Stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation,** World Journal of Stem Cells, 2014, 6 (3): 296-304.
54. Monteiro BG, Serafim RC, Melo GB, Silva MC, Lizier NF, Maranduba CM, et al. **Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells.** Cell Prolif. 2009; 42:587–94. [PubMed: 19614680]
55. Pereira J.A., Geraldés B, et al., **Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Human Immature Dental Pulp Stem Cells,** Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2010, Vol.51, No. 3



-
-
56. Kohji Nishida, Yamato M, Hayashida Y, et al., **Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium**, The New England Journal of Medicine, 2009, 351, 96.
57. **Ley General de Salud**. En: Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, 1984:154
58. <http://www.bioeden.mx/> (20/10/14)
59. Janebodin K, et al. **Neural crest-derived dental pulp stem cells function as ectomesenchyme to support salivary gland Tissue formation**. Dentistry 2012; S13: 001.
60. <http://learn.genetics.utah.edu/content/stemcells/quickref/> (20/10/14)