



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS EN CAVIDAD  
BUCAL (REVISIÓN SISTEMÁTICA).**

**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:

MIRIAM RODRÍGUEZ AGUILAR

TUTORA: Dra. LAURA ESTHER VARGAS ULLOA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

<b>ÍNDICE.</b>	
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1 GENERALIDADES.....</b>	<b>8</b>
1.1 Marco teórico .....	8
1.2 Teoría celular.....	10
1.3 La célula .....	10
1.4 Ciclo celular .....	11
1.5 Antecedentes.....	16
1.5.1 TERM .....	16
1.5.2 La Medicina Regenerativa.....	17
1.5.3 Ingeniería de tejidos .....	18
<b>CAPÍTULO 2 LAS CÉLULAS TRONCALES .....</b>	<b>20</b>
2.1 Cronología de las células madre .....	20
2.3 Clasificación de células de acuerdo a su potencial .....	21
2.3.1 Células troncales totipotenciales .....	21
2.3.2 Células troncales pluripotentes .....	21
2.3.3 Células troncales multipotentes.....	22
2.3.4 Células troncales oligopotentes.....	22
2.3.5 Células troncales unipotentes .....	22
2.4 Clasificación de células troncales según su origen.....	22
2.4.1. Células troncales embrionarias. ....	22
2.4.2 Células troncales somáticas o adultas .....	23
2.4.3 Células troncales clonadas.....	24
2.4.4 Células pluripotencialmente inducidas .....	24
<b>CAPÍTULO 3 CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPS).....</b>	<b>25</b>
3.1 Reprogramación celular.....	25
3.2 Premio Nobel de Medicina 2012.....	26
3.2.1 Dr. Shinya Yamanaka.....	26
3.2.2 Sir John B. Gurdon .....	26
3.3 Células pluripotentes inducidas (iPS) .....	27

3.3.1 Células inducidas pluripotentes (iPS) en ratones .....	28
3.3.2 Células pluripotentes inducidas humanas .....	30
3.3 Autorrenovación y pluripotencialidad .....	31
3.3.1 Oct4 (POU5F1) .....	32
3.3.2 Sox2 .....	32
3.3.3 Nanog.....	32
3.3.4 Lin-28 .....	33
3.3.5 c-Myc.....	33
3.3.6 Klf4 .....	33
3.7 Etapas de la reprogramación.....	35
3.7.1 Etapa I.....	35
3.7.2 Etapa II. Comienzo del cambio irreversible .....	35
3.7.3 Etapa III. iPS Inmaduras.....	36
3.7.4 Etapa IV. Consolidación de la reprogramación .....	37
3.8 Mecanismos epigenéticos .....	37
3.9 Deficiencias de la metodología para la reprogramación .....	38
3.10 Ventajas de las células iPS .....	38
3.11 Desventajas .....	39
3.12 Potencial de las células troncales pluripotenciales inducidas.....	40
3.12.1 Neuronas.....	40
3.12.2 Cardiomiocitos.....	40
3.12.3 Células dendríticas .....	40
3.12.4 Fibroblastos .....	41
3.12.5 Células hematopoyéticas .....	41
3.12.6 Melanocitos .....	41
<b>CAPÍTULO 4 iPS DENTALES.....</b>	<b>42</b>
4.1 Fuentes de células iPS en cavidad bucal .....	43
4.1.1 Stem cells in apical papillae / Células Madre en Papila Apical (SCAP) .....	43
4.1.2 Dental Pulp Stem Cells / Células Madre de Pulpa Dental (DPSC) 43	
4.1.3 Células madre de dientes primarios humanos .....	44

4.1.4 Células madre de terceros molares .....	44
4.1.5 Mucosa oral .....	45
4.1.6 Células de fibroblastos gingivales .....	45
4.1.7 Fibroblastos del ligamento periodontal .....	45
4.2 Células iPS en aplicaciones de Odontología .....	46
4.3 Desafíos y soluciones .....	51
4.3.1 Memoria epigenética .....	51
4.3.2 Tumorigénesis y formación de teratomas .....	52
4.3.3 Uso de retrovirus .....	52
4.3.4 Problema de células indiferenciadas .....	52
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>

## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre se ha cuestionado acerca del origen de las enfermedades que han azotado a la humanidad, llevándolo a lograr avances científicos de gran importancia en el área biomédica, con la finalidad de erradicar dichos padecimientos, o bien, ofrecer una mejor calidad de vida a las personas quienes los padecen.

Uno de los descubrimientos actuales más importantes e increíbles del siglo, fue realizado por el doctor y científico Shinya Yamanaka, quien después de trabajar con células madre por más de 10 años realizó la investigación que cambiaría la forma de entender la biología humana. Especializado en traumatología, y con la finalidad de tratar y ayudar a los pacientes con padecimientos incurables en la medula espinal, Yamanaka se interesó en la investigación básica, llevando los conocimientos al límite, logrando la desdiferenciación de células.

Es conocido que la célula es la unidad fundamental de todo ser vivo, se ha estudiado su origen, estructura y potencialidad con la finalidad de entender el desarrollo y la función de los procesos dentro del cuerpo humano. Las células troncales son una fuente importante para el desarrollo de nuevos conocimientos en el área médico biológica, éstas se clasifican de acuerdo a su origen en adultas y embrionarias, siendo las segundas la mejor fuente de obtención de células con un amplio uso médico, no obstante, al ser obtenidas de la destrucción de embriones humanos, su obtención y uso científico entró en conflicto, siendo finalmente prohibidas éticamente.

Anteriormente, el científico John B. Gurdon llevó a cabo experimentos sobre la reprogramación celular, consiguiendo la primera clonación de un animal, utilizando la técnica de “transferencia nuclear”, la cual consistió en implantar el núcleo de una célula adulta a una célula sin núcleo.

Lo que demostró que una célula adulta contiene la información genética necesaria para crear un nuevo organismo.

Basado en estos estudios, Yamanaka fue consciente que el proceso de especialización de una célula podría revertirse con la ayuda de ciertos factores o genes.

Luego de años de investigación, se descubrieron los factores necesarios para la reprogramación celular, lo que dio como resultado, células pluripotentes inducidas (iPS), desarrolladas con el propósito de convertir una célula especializada a una célula embrionaria, la cual será inducida para desarrollar características específicas seleccionadas del tejido que se desee programar.

## **OBJETIVO**

Realizar una revisión de la literatura, acerca de la obtención y el uso de las células pluripotentes inducidas en cavidad bucal.



# CAPÍTULO 1 GENERALIDADES

## 1.1 Marco teórico



Figura 1 Retrato de Paracelso.<sup>2</sup>

Paracelso (1493-1541) afirmó haber creado un “homúnculo” el cual se refiere a la antigua creencia de que en la cabeza del espermatozoide había un pequeño “hombrecito”, creando así un feto que nacería nueve meses después.<sup>1</sup> Figura 1

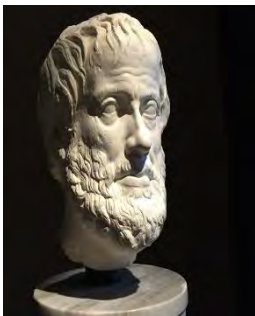


Figura 2 Escultura de Aristóteles.<sup>3</sup>

Aristóteles (384-322 a.C.) planteó las primeras interrogantes del desarrollo embrionario.<sup>1</sup> Figura 2



Figura 3 Retrato de Leonardo Da Vinci.<sup>4</sup>

Leonardo Da Vinci (1452-1519) explicó con sus dibujos, la formación de un nuevo ser gracias a una célula única.<sup>1</sup> Figura 3



Figura 4 Animalúnculo, dibujo de Hartzoeker.<sup>5</sup>

Nicolás Hartsoeker (1694) describió “el animalúnculo”.<sup>1</sup> Figura 4



**Figura 5** Retrato de William Harvey.<sup>6</sup>

William Harvey (1578-1657) autor de “*Ex ovo omnia*” Donde afirmó que “todo ser vivo procede de otro”, anulando así la teoría de la generación espontánea.<sup>1</sup> Figura 5



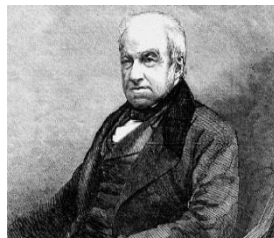
**Figura 6** Retrato de Robert Hooke.<sup>7</sup>

Robert Hooke (1655) escribió las observaciones que realizó al ver finos cortes de corcho a través de un microscopio, en los que vio pequeños compartimientos a los cuales llamó *cellulae* de donde deriva el término célula.<sup>1</sup> Figura 6



**Figura 7** Retrato de Caspar F. Wolff.<sup>8</sup>

Caspar F.Wolff (1759) concluyó la existencia de una unidad fundamental, de forma globular en todos los seres vivos.<sup>1</sup> Figura 7



**Figura 8** Pintura de Robert Brown.<sup>9</sup>

Robert Brown (1831) observó la estructura interna de las células, llamándola núcleo.<sup>1</sup> Figura 8



**Figura 9** Fotografía de Rudolf Virchow.<sup>10</sup>

Rudolf Virchow (1858) señaló que todas las células provienen de otras células “*omni cellula e cellula*”.<sup>1</sup> Figura 9

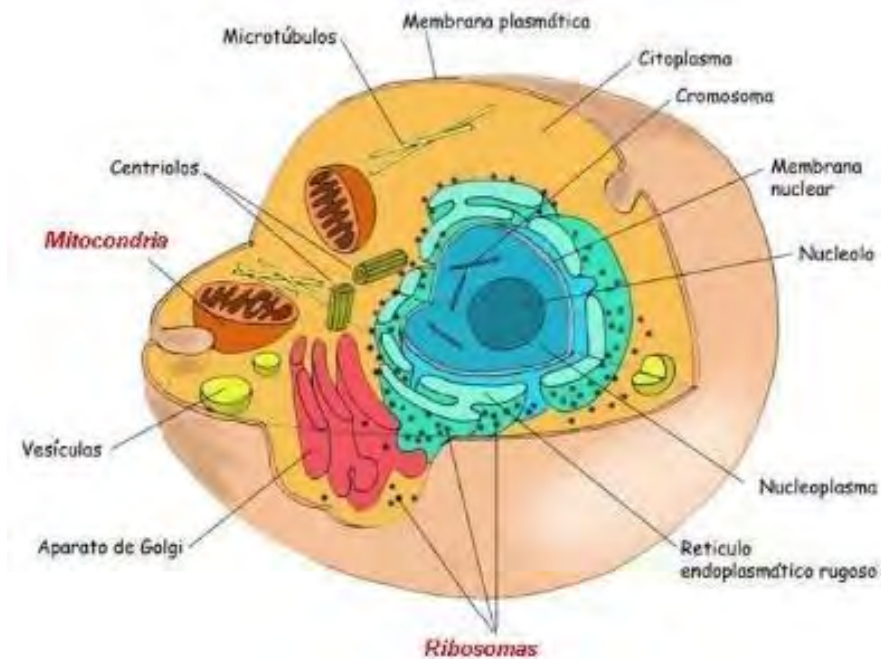
## 1.2 Teoría celular

Fue creada con el apoyo de varios investigadores, de entre los cuales destacan Schwann, Schleiden y Virchow. Esta teoría tiene cuatro postulados principales:

- Todos los seres vivos están constituidos por una o más células.
- Toda célula es la unidad anatómica y fisiológica de los seres vivos. Es la unidad de vida más pequeña.
- Toda célula proviene de la división de una célula anterior.
- Toda célula contiene material hereditario donde se encuentran las características del ser vivo y que serán transmitidas desde una célula madre a sus hijas.<sup>11</sup>

## 1.3 La célula

La célula es la unidad básica anatómica y funcional, que constituye los tejidos, órganos y sistemas de todos los seres vivos. Figura 10



**Figura 10** Estructura de la célula.<sup>12</sup>

## 1.4 Ciclo celular

Para que un ser humano pueda desarrollarse, debe formar tejidos, órganos y sistemas los cuales son creados a partir de un cigoto por un proceso de división de las células, el cual se denomina ciclo celular.<sup>13</sup>

El ciclo celular se divide principalmente en dos fases: La interfase y la Fase M.

### Interfase

Durante la interfase ocurren todos los procesos celulares y bioquímicos necesarios para que la mitosis se pueda llevar a cabo de manera exitosa y se encuentra dividida en tres fases ordenadas y subsecuentes conocidos como G1, S y G2.<sup>13</sup> Figura 11

- G1 (término Gap1 o primer intervalo).  
Es el primer momento en la vida de una nueva célula hija recién formada. En esta etapa la célula adquiere o sintetiza materiales necesarios para su crecimiento y su posterior reproducción. La célula se queda en esta fase hasta que recibe señales internas o externas de reproducirse. Al recibir dicha señal, pasa a la siguiente etapa.<sup>14</sup>
- S (El nombre de S proviene de la palabra síntesis).  
Durante esta fase la célula realiza la duplicación, replicación o síntesis del ADN nuclear.<sup>14</sup>
- G2 (viene del término Gap2 o segundo intervalo.)  
Durante esta fase se verifica que la duplicación del material genético haya concluido y que el ADN nuclear no presenta daño.<sup>13</sup> El crecimiento celular está completo y se prepara para entrar en la fase de reproducción.<sup>14</sup>

# Interfase

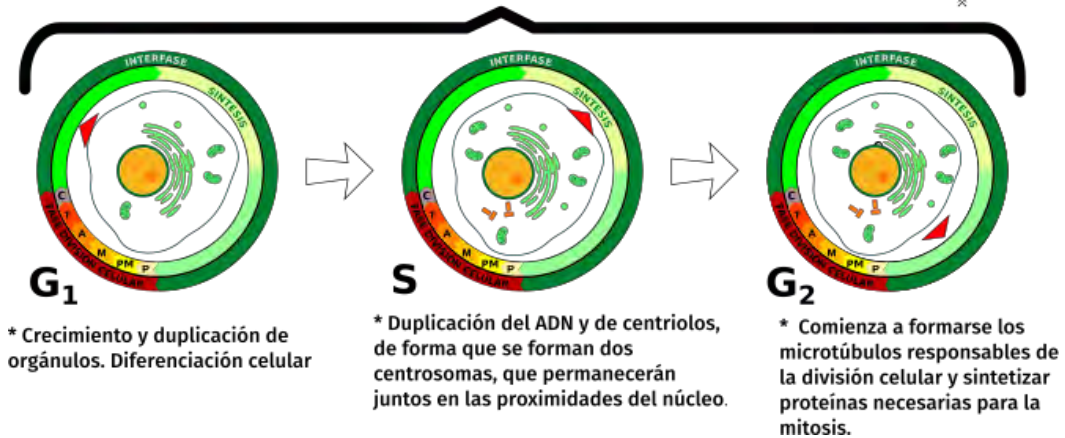


Figura 11 Fases de la interfase.<sup>15</sup>

## Fase M

La fase M (división celular) comprende la mitosis y la citocinesis.

## Mitosis

(Proviene de la palabra griega mitos que significa "hilo"). Consiste en la división celular.<sup>14</sup> Figura 12

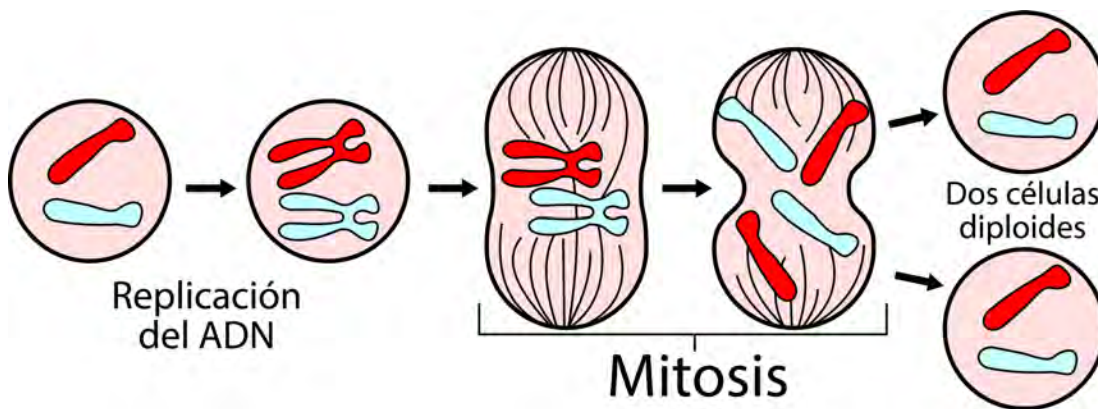


Figura 12 Mitosis.<sup>16</sup>

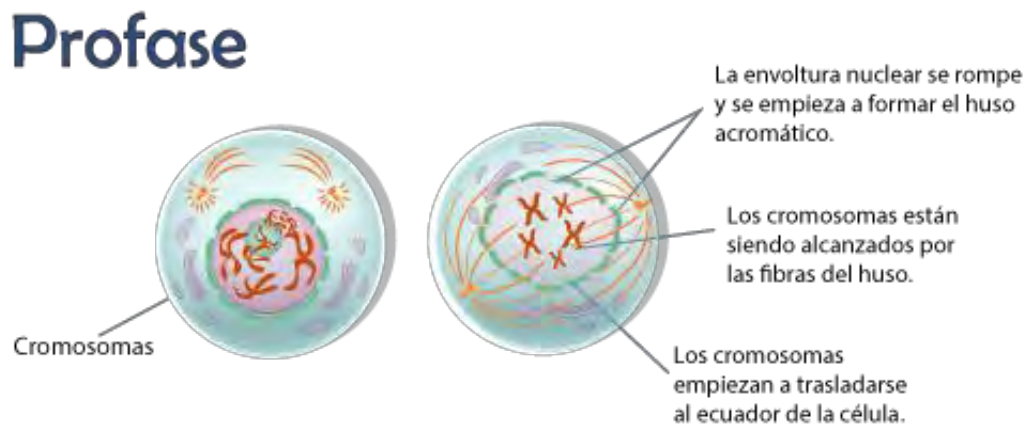
La Mitosis se divide en cuatro fases:

- Profase
- Metafase
- Anafase
- Telofase.

### Profase

Los cromosomas duplicados, cada uno formado por dos cromátides hermanas, se condensan y se empaquetan estrechamente de tal manera que son visibles dentro del núcleo.<sup>13</sup> Figura 13

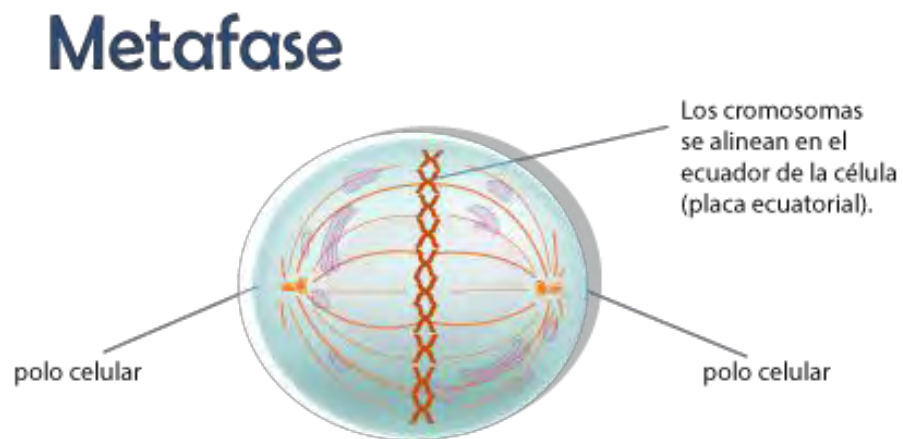
En el citosol el huso mitótico se comienza a ensamblar entre los dos centrosomas, que se han duplicado en fase G1, estos organelos comienzan a migrar hacia los polos de la célula.<sup>13</sup>



**Figura 13** Profase.<sup>14</sup>

## Metafase

En esta fase los cromosomas se desplazan al plano ecuatorial de la célula y cada uno de ellos se fija por el centrómero a las fibras del huso. En la metafase tardía los centrómeros y la cromátides hermanas comienzan a separarse para emigrar hacia los polos celulares (fig. 14).<sup>14</sup>

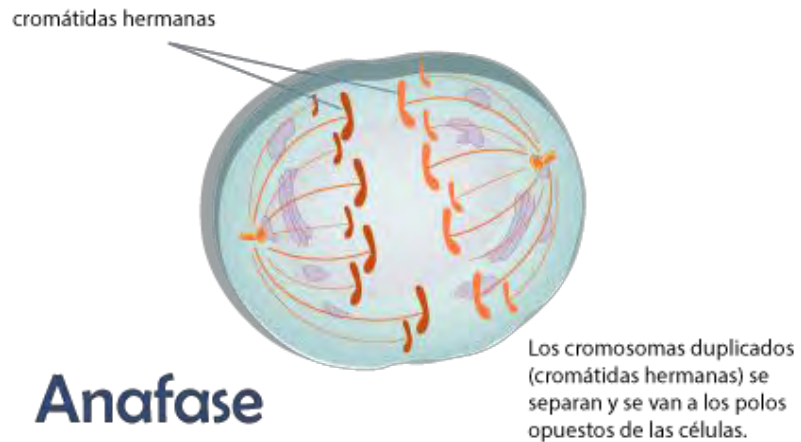


**Figura 14** Metafase

## Anafase

Las cromátides hermanas de cada uno de los cromosomas se separan de forma sincrónica, cada uno de ellos es lentamente arrastrado hacia el polo del huso al que está adherido (fig. 15).<sup>14</sup>

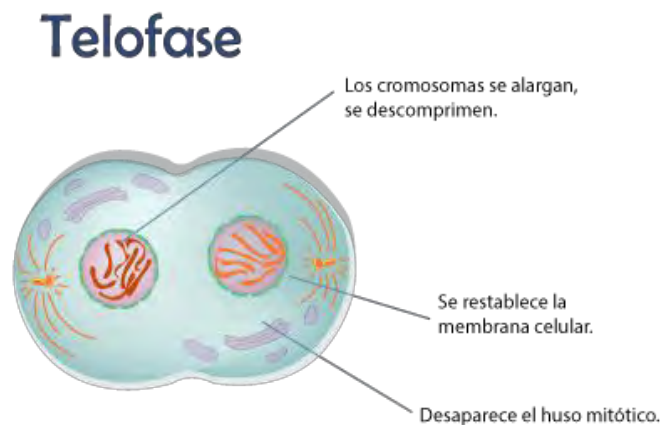




**Figura 15** Anafase.

## Telofase

Da inicio cuando los cromosomas están en los polos celulares. Nuevamente los cromosomas se alargan y se descondensan. Se forma el nucléolo. Desaparece el huso mitótico y alrededor de cada grupo de cromosomas se inicia la formación de una nueva célula hija. A partir del retículo endoplásmico rugoso se restablece la membrana nuclear con lo que se da la reconstrucción de cada nuevo núcleo. Se forma una nueva membrana celular para cada célula hija.<sup>14</sup> Figura 16

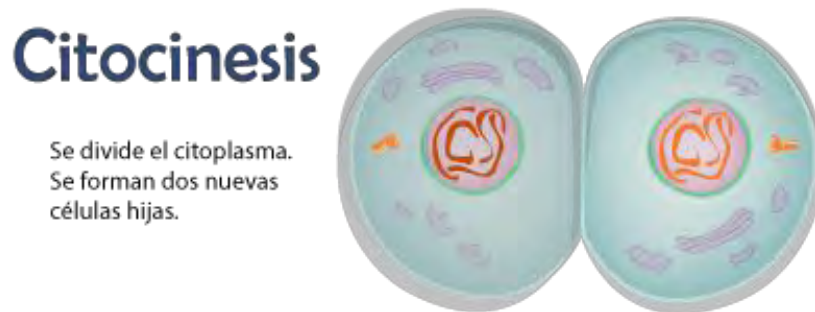


**Figura 16** Telofase.<sup>12</sup>



## Citocinesis

Fase de culminación de la mitosis. Es la división del citoplasma con sus respectivos organelos celulares para formar dos células hijas separadas (fig. 17). Con la citocinesis y la telofase termina el proceso de la mitosis. Ahora cada célula hija, nueva, inicia su ciclo celular en G1.<sup>14</sup>



**Figura 17** Citocinesis.

## 1.5 Antecedentes

### 1.5.1 TERM

La ingeniería tisular y la medicina regenerativa (por sus siglas en inglés: tissue engineering + regenerative medicine: TERM) es un campo que aplica principios de biología e ingeniería para "restaurar, mantener o reparar un tejido después de una lesión". Además del potencial para tratar diversas enfermedades, estos esfuerzos aumentan nuestra comprensión de la biología celular fundamental.<sup>17</sup>

### 1.5.2 La Medicina Regenerativa

Es un campo interdisciplinario emergente de investigación y aplicaciones clínicas centrado en la reparación, remplazo o regeneración de células, tejidos u órganos para restaurar una función dañada por cualquier causa, incluyendo defectos congénitos, trauma y envejecimiento. La medicina regenerativa utiliza una combinación de varios procedimientos tecnológicos que van más allá del trasplante tradicional y terapias sustitutivas. Estos procederes pueden incluir, aunque no están limitados a ellos, el uso de moléculas, terapia génica, trasplante de células madre, ingeniería de tejidos y terapia celular avanzada como la reprogramación celular.

Esto hace de la medicina regenerativa una rama médica multidisciplinaria relacionada con diferentes áreas de la biomedicina con las que mantiene estrechos vínculos (fig. 18).<sup>18</sup>



**Figura 18** Carácter multidisciplinario de la medicina regenerativa.

### 1.5.3 Ingeniería de tejidos

En 1937 el conocido aviador Charles Lindberg publicó junto a Alexis Carroll el trabajo titulado "El cultivo de órganos". Antiguamente se tenía el concepto erróneo de que la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa tenían el mismo concepto, pero con el paso del tiempo se ha demostrado que, si bien no son lo mismo, están directamente relacionadas.<sup>19</sup>

La ingeniería de tejidos puede ser *in vivo* o *in vitro* de acuerdo al lugar donde sea efectuada. La ingeniería de tejidos *in vivo* comprende la regeneración y reconstrucción de tejidos u órganos dentro del propio organismo. Y ha sido desarrollada en tres etapas.

- En la primera se empleaban biomateriales "inertes" con la única finalidad de usarlos como estructuras que sustituyan partes del cuerpo dañadas.
- En la segunda se inició la aplicación de una matriz biodegradable o "andamio biológico" con una estructura porosa, trabecular o reticular, que se coloca en el tejido dañado para promover, en el microambiente apropiado, el crecimiento y propagación *in situ* de las células residentes sanas circundantes o bien de células madre que pueden implantarse en ese tejido o estar incorporadas al biomaterial que integra el "andamio biológico", con la finalidad de acelerar la regeneración hística.
- La tercera etapa ha sugerido que la combinación de la terapia celular con la nanotecnología permitiría usar predominantemente la capacidad regenerativa del propio organismo con un empleo mínimo de materiales artificiales.

La ingeniería de tejidos *in vitro* se refiere a crear tejidos en laboratorios, para posteriormente colocarlos en los tejidos afectados.<sup>19</sup>

La ingeniería de tejidos busca fomentar el restablecimiento de la forma tridimensional y la función con el uso de andamios, células, factores biológicos y estimulación tanto biomecánica como biofísica para ayudar en la regeneración de los tejidos a través de la manipulación del entorno.<sup>19</sup>

## **CAPÍTULO 2 LAS CÉLULAS TRONCALES**

### **2.1 Cronología de las células madre**

- 1910 Carrel y Burrows cultivan tejidos humanos.<sup>1</sup>
- 1963 McCulloch descubre la presencia de autorreplicación de células madre en la médula ósea de ratones.<sup>1</sup>
- 1968 Primer Trasplante de Médula Ósea (TMO).<sup>1</sup>
- 1978 Las células madre hematopoyéticas (CMH) son descubiertas en la sangre del cordón umbilical.<sup>1</sup>
- 1981 Células madre embrionicas son obtenidas de la masa celular interna.<sup>1</sup>
- 1992 Células madre neurales son cultivadas *in vitro*.<sup>1</sup>
- 1995 Se aprueba la enmienda Dickey para el uso del Dinero Federal Médico en las investigaciones sobre las células madre derivadas de la destrucción del embrión.<sup>1</sup>
- 1998 James Thompson establece las primeras líneas celulares humanas embrionarias.<sup>1</sup>
- 2003 El descubrimiento de nuevos orígenes de células madre encontrados en dientes primarios.<sup>1</sup>
- 2006 Son creadas nuevas líneas de células madre sin destruir embriones.<sup>1</sup>

### **2.2 Definición de células troncales**

El primer registro del término “célula troncal” fue dado por Ernst Haeckel en 1868, quien la definió como “stammzelle”.<sup>20</sup>

Las células troncales han sido denominadas con diferentes términos entre los que se encuentran *stem cells*, células troncales, células precursoras, células progenitoras, etc. aunque el término células madre (CM) parece ser el más utilizado.<sup>21</sup>

Se definen como células no especializadas con la capacidad de dividirse durante periodos indefinidos por medio del proceso llamado autorrenovación y su potencial para distinguirse en más de un tipo de célula diferenciada. Las CM son células indiferenciadas que potencialmente pueden transformarse en células especializadas y cumplen con las características y funciones de diferentes tejidos.<sup>22</sup>

### **2.3 Clasificación de células de acuerdo a su potencial**

De acuerdo a su potencial de diferenciación las células pueden clasificarse como: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales, oligopotenciales y unipotenciales.

#### **2.3.1 Células troncales totipotenciales**

Estas células son capaces de originar un embrión y un individuo completo, diferenciándose hacia cualquier estirpe celular. Ejemplo de ello son el huevo fertilizado, capaz de dar lugar a todos los tejidos embrionarios y extra embrionarios.<sup>20</sup>

#### **2.3.2 Células troncales pluripotentes**

Estas células 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). Pero no origina el tejido extra embrionario. Un ejemplo son las células pluripotenciales de la pulpa dental.<sup>20</sup>

### **2.3.3 Células troncales multipotentes**

Son células que pueden originar un subconjunto de tipos celulares, de su misma capa o linaje de origen embrionario.<sup>20</sup>

### **2.3.4 Células troncales oligopotentes**

Este tipo de células dan lugar a dos o más tipos celulares en un tejido. Por ejemplo: célula madre neuronal que puede crear un subgrupo de neuronas en el cerebro.<sup>20</sup>

### **2.3.5 Células troncales unipotentes**

Estas células tienen la capacidad para diferenciarse en un único tipo celular; ejemplo de ello son las células germinales que solamente pueden dar origen a los gametos.<sup>20</sup>

## **2.4 Clasificación de células troncales según su origen**

Dependiendo de su origen y forma de obtención, las células troncales pueden clasificarse en células madre embrionarias, adultas, clonadas y pluripotenciales inducidas.

### **2.4.1. Células troncales embrionarias.**

Las células madre embrionarias (ESC, del inglés, *Embryonic stem cells*) son células pluripotenciales, es decir, cada una de ellas es capaz de generar todos los tipos celulares del organismo.

Las células madres embrionarias procedentes del embrión en fase de blastocito, se caracterizan por su capacidad de permanecer en estado proliferativo no diferenciado durante un periodo prolongado de tiempo.

Son las células más polivalentes y tienen la capacidad de dar origen a todos los tipos celulares de las tres láminas germinales del individuo: endodermo, mesodermo, y ectodermo.<sup>23</sup>

Debido a las consideraciones éticas legales o religiosas del uso de embriones y la incertidumbre que presentan en cuanto a su seguridad, o potencial teratogénico, su aplicación clínica en seres humanos es cuestionada.

#### **2.4.2 Células troncales somáticas o adultas**

Las células troncales adultas (ASC, del inglés, *Adult Stem Cells*) engloban una gran variedad de células indiferenciadas localizadas en tejidos adultos, independientemente de la edad del individuo, se caracterizan por su alto potencial proliferativo, y por su capacidad de autorrenovación y diferenciación en al menos una estirpe celular.<sup>23</sup>

El primer tipo de células troncales descubiertas fueron las células hematopoyéticas, capaces de autorrenovarse y diferenciarse en células hematopoyéticas multipotenciales.

Las ASC son las células más utilizadas por su seguridad, eficacia y fácil obtención, aunque su uso presenta varias dificultades como:

- Identificación de las señales moleculares que inician su activación.
- La introducción de protocolos de aislamiento y cultivo más sencillos.
- Conseguir el aumento de su plasticidad, la viabilidad celular del producto y la estabilidad genética de los cultivos.<sup>23</sup>



### 2.4.3 Células troncales clonadas

Estas células se producen manipulando el material genético de una célula receptora y una donadora, en la primera se elimina el núcleo y se le transfiere el núcleo de la segunda, esta práctica en seres humanos tiene gran controversia bioética-legal-religiosa.<sup>20</sup> Figura 19

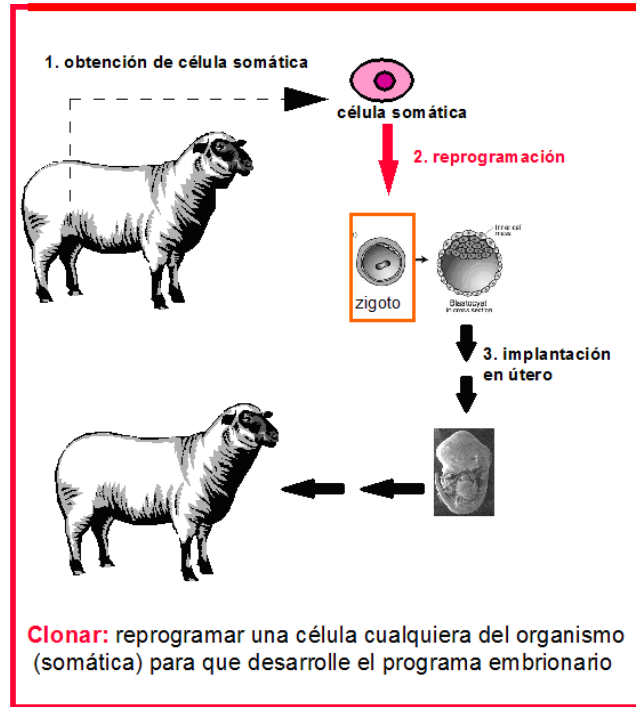


Figura 19 Diagrama que muestra la ruta de la clonación celular.<sup>24</sup>

### 2.4.4 Células pluripotencialmente inducidas

Se trata de células madre pluripotentes, procedentes de una célula madre somática no pluripotente, manipulada por medio de la inserción de factores de transcripción.<sup>23</sup>

## CAPÍTULO 3 CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPS)

### 3.1 Reprogramación celular

En 1952 Briggs y King demostraron que el núcleo de la blástula de *Rana pipiens* transferido a un cigoto enucleado adquiere el potencial de realizar el desarrollo del embrión. Estos trabajos realizados por Gurdon y colaboradores en otra especie anfibia, *Xenopus laevis*, demostraron por primera vez la capacidad del núcleo de una célula animal para ser reprogramado hasta el estado totipotencial, y dar origen a un individuo adulto (en este caso ranas adultas) a partir de la transferencia de núcleos de células intestinales a ovocitos.<sup>27</sup>

Ian Wilmut y Keith Campbell en 1995, mediante transferencia nuclear de una célula de mamífero completamente diferenciada (en este caso de la glándula mamaria), obtuvieron a la oveja “Dolly”, la primera clonación de un mamífero adulto. Este resultado demostró que, tanto en mamíferos como en anfibios, el núcleo de una célula diferenciada, transferido al citoplasma de un cigoto al que se le extrae el núcleo mediante microcirugía, puede ser reprogramado hacia un estado totipotencial por factores de citoplasma desconocidos hasta ese tiempo. Igual que en caso de las ESC, la importancia de la clonación es exclusivamente científica, y un embrión humano clonado no puede ser fuente de células para la Medicina regenerativa, debido a cuestiones éticas y morales acerca del uso de un óvulo humano, para este fin. Además, animales nacidos con esta técnica pueden sufrir de patologías debido a daños en las estructuras de genes. El salto trascendental que se consiguió con la clonación fue el motor para la búsqueda de los factores que participan en la reprogramación al estado embrionario, que después de 10 años dió como resultado el desarrollo de una metodología para la reprogramación del núcleo de una célula diferenciada sin la necesidad de involucrar al óvulo ni la formación de un embrión humano.<sup>25</sup>

## 3.2 Premio Nobel de Medicina 2012

### 3.2.1 Dr. Shinya Yamanaka

Nacido en Osaka Japón, (4 de septiembre de 1962). Licenciatura en Medicina: Universidad de Kobe en 1987. Doctorado: Universidad de la ciudad de Osaka 1993. Comenzó su investigación sobre la inducción de células en el Instituto Nara de Ciencia y Tecnología. En 2006, Shinya Yamanaka identificó algunos genes, que al activarse en células madre adultas, pueden reprogramarse a células madre inmaduras (fig. 20).<sup>26</sup>



Figura 20 Yamanaka Shinya.

### 3.2.2 Sir John B. Gurdon

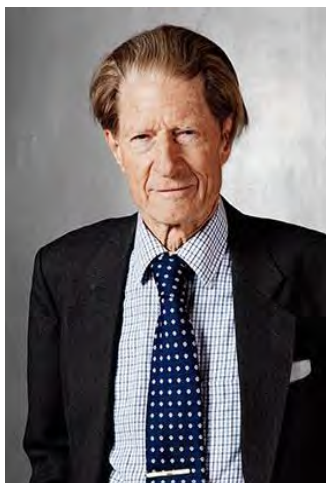


Figura 21 Jhon B Gurdon.

Nacido en Dippenhall, Reino Unido (02 de octubre de 1933). Doctorado en la Universidad de Oxford. Instituto de Tecnología de California en Pasadena. Afiliado a la Universidad de Cambridge desde 1971. En 1962, Gurdon eliminó el núcleo de un óvulo fecundado de una rana y lo reemplazó con el núcleo de una célula tomada del intestino de un renacuajo. Este huevo modificado se convirtió en una nueva rana, que demostró que la célula contenía la información genética necesaria para formar todo tipo de células (fig. 21).<sup>28</sup>

Al inicio de los años sesenta, el Dr. Gurdon, mediante el trasplante de núcleos provenientes de células diferenciadas del adulto a ovocitos del sapo *Xenopus* a los que se les había eliminado su material genético, mostró evidencia de que el proceso de diferenciación celular, hasta alcanzar la madurez presente en las células del adulto, no involucra alteraciones en el contenido y estructura del ADN y por tanto marca el nacimiento de la epigenética, cuyo principio es que la diferencia entre células no se debe a cambios estructurales en el genoma, si no a cambios en la actividad de sus unidades funcionales (fig. 22).<sup>27</sup>



**Figura 22** John B. Gurdon eliminó el núcleo de una célula huevo de la rana y lo reemplazó con el núcleo tomado de una célula especializada de un renacuajo. El huevo modificado se desarrolló como un renacuajo normal. Fuente: The Nobel Committee for physiology or Medicine. Ilustración: Mattias Karlen.

### 3.3 Células pluripotentes inducidas (iPS)

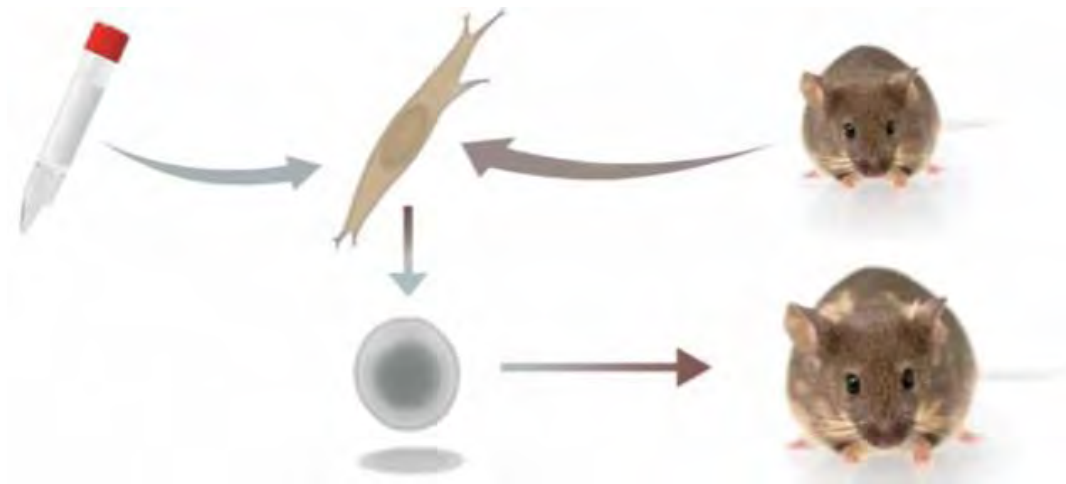
Las células troncales pluripotentes inducidas ó iPS (del inglés *Induced Pluripotent Stem cells*) han revolucionado el campo de la medicina regenerativa. Los experimentos pioneros de Takahashi y Yamanaka, realizados inicialmente con células de ratón, en 2006, y posteriormente refrendados un año más tarde, por el mismo laboratorio y otros, de forma independiente, en células humanas, describieron una tercera vía para obtener células troncales pluripotentes.

Anteriores a éstas, solo se tenía conocimiento de las denominadas células troncales pluripotentes “embrionarias” y las células troncales pluripotentes “adultas.” El artículo de Takahashi y Yamanaka en el año 2006 no fue reconocido con la importancia que se debía, debido a que dicha investigación había sido realizada en ratones, y fue hasta un año más tarde en noviembre de 2007 cuando el equipo de James A. Thompson en EEUU y Yamanaka en Japón, presentaron resultados similares en células humanas. Dando a conocer a la comunidad científica de todo el mundo que era posible convertir células somáticas en células troncales pluripotentes, mediante un proceso de inducción genética, mediante la expresión simultánea de un reducido grupo de genes, y estas células se denominaría *iPS cells*.<sup>29</sup>

### **3.3.1 Células inducidas pluripotentes (iPS) en ratones**

A través de un análisis ordenado de un grupo inicial de 24 genes, cuya expresión se había asociado de forma específica a células troncales embrionarias (ESC), y mediante experimentos de transfección en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fueron descartados uno a uno hasta obtener finalmente solo 4, los cuatro genes *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* que permitían inducir células con características de células troncales pluripotentes a partir de células somáticas.

La transformación celular se hacía a través de vectores virales, retrovirus (lentivirus) portadores, de forma individual o combinada, de las secuencias de los 4 genes.<sup>29</sup> Figura 23



**Figura 23** Shinya Yamanaka estudió los genes que son importantes para la función de las células madre. Cuando transfirió cuatro genes en células tomadas de la piel, estas fueron reprogramadas en células madre pluripotentes que podrían convertirse en todos los tipos celulares de un ratón adulto. Las llamó células pluripotentes inducidas (iPS). Fuente: The Nobel Committee for Physiology or Medicine. Ilustración: Mattias Karlen,<sup>27</sup>

En este primer trabajo, se origina el término células iPS. Desde el punto de vista morfológico y en relación a marcadores específicos, estas células creadas, iPS, eran completamente indistinguibles de las células troncales pluripotentes embrionarias, con la excepción de que las iPS no provenían de embriones, sino de células somáticas.<sup>29</sup>

Posteriormente, se observó que los perfiles de expresión genética de las iPS, eran muy parecidos más no idénticos, a los de las células ESC.

Un segundo trabajo de Yamanaka demostró que las células iPS, eran capaces de contribuir y transferir su genotipo a través de la línea germinal, si se seleccionaban las células iPS, con mayores niveles de expresión del gen *Nanog*.<sup>29</sup>

De las quimeras creadas se observó, por primera vez, la aparición de tumores en los ratones generados, probablemente derivados de la activación ectópica y anómala de *c-Myc*, por su capacidad tumorigénica.<sup>29</sup>

La inclusión del gen *c-Myc* en el grupo de cuatro genes destinados a inducir pluripotencia es problemática, *c-Myc* es un protooncogén implicado en diversas funciones celulares, incluyendo el control del ciclo celular.<sup>29</sup>

La activación anómala y/o fuera de control puede causar tumores por lo que la re-introducción sistémica de *c-Myc* era peligrosa, y se decidió experimentar si era posible obtener células iPS con la inducción genética provocada únicamente por *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, logrando células con menor eficiencia y sin el posterior desarrollo de tumores en los ratones utilizados. La utilización de retrovirales, no estaba exenta de problemas ya que pueden causar mutagénesis.<sup>29</sup>

### **3.3.2 Células pluripotentes inducidas humanas**

A finales del año 2007, Yamanaka y Thompson lograron obtener las primeras células troncales pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos humanos.

Thompson optó por transferir los fibroblastos humanos con cuatro genes (OCT4 también llamado OCT3/4), SOX2, NANOG y LIN28, para obtener las primeras células iPS humanas.<sup>29</sup>

De forma casi simultánea Yamanaka demostró la capacidad de reproducir los resultados obtenidos en ratones, ahora en células humanas, demostrando que la modificación de fibroblastos humanos con los cuatro genes usados en ratones *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* inducían la formación de células pluripotentes inducidas iPS humanas, eliminando tiempo después, el gen *c-Myc*, con lo cual se evitaba la tumorigénesis asociada a este gen.<sup>29</sup>

### 3.3 Autorrenovación y pluripotencialidad

La autorrenovación de las *ESC* se basa en la división celular simétrica e ilimitada, que permite mantener el estado pluripotencial sin diferenciación. Hasta hoy no se sabe por qué las células embrionarias son “inmortales” *in vitro* mientras que *in vivo* su crecimiento y diferenciación es controlado. Este potencial que no se usa en el desarrollo natural se evidencia no solo en cultivo, sino también en la formación de teratomas cuando la célula se desarrolla en algún sitio ectópico (es decir, en un sitio distinto al determinado naturalmente), especialmente cuando se implantan en ratones deficientes en su sistema inmunológico.<sup>25</sup>

Los genes de pluripotencialidad fueron descubiertos, clonados y caracterizados en el periodo entre 1990 y 2003. En total fueron identificados más de 100 genes involucrados en estos procesos. Dos hallazgos notables de estos estudios fueron:

- Un grupo de solo tres genes (Oct4, Nanog, Sox2) controlan el circuito total de los genes de pluripotencialidad en ESC.
- En este circuito transcripcional también juegan un papel importante los genes conocidos por su contribución a la carcinogénesis, tales como c-Myc y Klf4.

A continuación, se da una breve descripción del grupo de genes de mayor relevancia en la autorrenovación y en la pluripotencialidad.<sup>25</sup>



### 3.3.1 Oct4 (POU5F1)

Pertenece a la familia POU de factores de transcripción específicamente expresados en ESC, en el embrión temprano y en células germinales. Fue originalmente designado como Oct3 o como Oct4. Su ausencia en embriones causa la muerte en útero en estadios de preimplantación. Para simplificar la nomenclatura, de aquí en adelante se le denominara Oct4. La función de Oct4 es importante para los primeros eventos de diferenciación del embrión en estadios entre mórula y blastocito. Los niveles de expresión de Oct4 en el embrión temprano dictan si las células permanecen a la ICM (nivel alto) o al trofoectodermo (nivel bajo). El papel de Oct4 (junto con Sox2 y Nanog) en las células de la masa interna y de las células del epiblasto (también denominado ectodermo primitivo) es preservar la pluripotencialidad.<sup>25</sup>

### 3.3.2 Sox2

Es miembro de la familia Sox (*SRY-related HMG-box*), parte de una familia de factores de transcripción expresadas en ESC, en células germinales y algunas células troncales adultas, específicamente del sistema nervioso. La ausencia de Sox2 en embriones causa la muerte debido al desarrollo fallido del epiblasto. Tal como Oct4, Sox2 es indispensable para mantener la pluripotencialidad de ESC, pero con la distinción de que Sox2 además tiene funciones en células que no son pluripotenciales, como la regulación del desarrollo embrionario y la formación de células madre en ganglios nerviosos espinales o sensitivos.<sup>25</sup>

### 3.3.3 Nanog

Se expresa específicamente en ESC manteniendo su autorrenovación y pluripotencialidad. La inhibición de la expresión de Nanog en cultivos de ESC

resulta inmediatamente en su diferenciación. Los blastocitos deficientes en Nanog muestran morfología normal, pero la masa celular interna solo produce células parecidas al endodermo parietal.<sup>25</sup>

### **3.3.4 Lin-28**

Fue descrito como un factor que controla el calendario del desarrollo en el nematodo *C. elegans* debido a que mutaciones en este gen llevan al desarrollo precoz, aunque el mecanismo molecular de este fenómeno no ha sido bien entendido. Se ha sugerido que puede estar actuando como un factor postranscripcional debido a sus dominios de unión a RNA (CSD, *Cold shock domain*). Se ha observado que Lin-28 puede ser prescindible, para la reprogramación celular, pero es de considerable importancia para la autorrenovación y para evitar la diferenciación.<sup>25</sup>

### **3.3.5 c-Myc**

Es un conocido oncogén y regulador de ciclo celular en varios tipos de células tanto normales como tumorales. Actúa en la inhibición de la expresión de genes supresores de tumores que controlan el paso de G1 a la fase S en el ciclo celular.<sup>25</sup>

### **3.3.6 Klf4**

También conocido como *gut-enriched Krüppel-like factor*, pertenece a una familia conservadora de factores de transcripción con dedos de zinc, importante en la regulación de múltiples procesos biológicos tales como la diferenciación, la proliferación y la apoptosis.<sup>25</sup>

Los factores Oct4, Sox2 y Nanog regulan grupos de genes por medio de la unión con los reguladores (promotores y *enhancers* de dichos genes). En el trabajo de Boyer y colaboradores, publicado en 2005 fue propuesto el esquema de regulación en forma de cascada. Junto a cada uno de los genes se observa el número de genes que tienen sitios de unión a promotores y potenciadores para el factor en cuestión. Toda esta información fue obtenida mediante análisis molecular de las regiones reguladoras y por su expresión en ESC. En células diferenciadas, los genes de pluripotencialidad no se expresan, porque son silenciados por factores de regulación epigenética que median la compactación de la cromatina por la modificación de histonas y la metilación de secuencias denominadas CpG presentes en sitios de regulación.<sup>25</sup>

Shinya Yamanaka y su colaborador Takahashi de la universidad de Tokio (Japón) fueron los primeros en lograr reactivar la expresión de los genes de pluripotencialidad y autorrenovación en células diferenciadas. Para este experimento utilizaron fibroblastos extraídos de fetos y colas de ratón.<sup>25</sup>

## **3.7 Etapas de la reprogramación**

### **3.7.1 Etapa I**

La expresión de los genes de reprogramación exógenos, resulta en la síntesis de sus proteínas respectivas a un alto nivel y a su vez dichas proteínas activan los mismos genes dentro de la célula. Para una reprogramación exitosa, la célula necesita un periodo determinado de expresión de los genes exógenos mientras estos inducen la expresión de los genes endógenos. La función de los genes introducidos es arrancar la cadena de eventos dentro de la célula y luego deben apagarse.<sup>25</sup>

### **Reversibilidad durante la etapa I**

Después de la activación del circuito de genes de autorrenovación, algunas células forman colonias de células parecidas a ESC y empiecen a mostrar marcadores superficiales de la pluripotencialidad. Para seguir avanzando, las células comienzan a requerir factores de crecimiento específicos. En esta etapa las colonias pueden regresar a un estado diferenciado o continuar y expandirse.<sup>25</sup>

### **3.7.2 Etapa II. Comienzo del cambio irreversible**

Si la expresión de Nanog no alcanza el umbral requerido, ya no habrá etapa irreversible. En este segundo periodo las células tienen que:

- A) Fortalecer la expresión de todos los miembros del circuito pluripotencial
- B) Alcanzar el ciclo celular embrionario, típico de las ESC
- C) Perder marcadores de diferenciación.

Estos cambios ocurren en forma distinta en las diferentes colonias y resultan en un espectro de diferentes líneas de células que alcanzan la etapa 3 del establecimiento de líneas de iPS.<sup>25</sup>

### **3.7.3 Etapa III. iPS Inmaduras**

La etapa 3 termina el proceso de reprogramación del genoma, basada en la similitud de las siguientes características de las iPS y ESC:

- Morfología tridimensional de colonias con bordes regulares.
- Expresión de todo el conjunto de genes de pluripotencialidad.
- Actividad elevada de TNAP (fosfatasa alcalina de tejido no específico).
- Expresión de marcadores superficiales como SSEA-1 en células de ratón de y de SSEA-4, TRA1-60, TRA2-49, TRA1-81 en células humanas.
- Elevada actividad de telomerasa.
- Ciclo celular corto (10-12 horas).
- No producir proteínas de linaje específico.
- Promotores de genes de pluripotencialidad libres de metilaciones.
- Histonas con metilación preferencialmente de lisina 4 y/o 9.
- Formar cuerpos embrioides con potencialidad para la generación de las tres capas embrionarias.

Las iPS de la etapa 3 usualmente manifiestan todas estas propiedades con la diferencia de que para alcanzar esta etapa, diferentes tipos de células se reprograman con diferente eficiencia.<sup>25</sup>

### 3.7.4 Etapa IV. Consolidación de la reprogramación

Las iPS de etapa 3, a pesar de mostrar todos los marcadores de pluripotencialidad, pueden presentar reprogramación incompleta. Ciertos aspectos deben ser estudiados con mayor profundidad en el fin de saber si las células derivadas de las iPS son completamente normales y funcionales. En el año 2010 y 2011 se publicaron los resultados de estudios comparativos del estado global epigenético y de expresión del genoma de iPS y ESC, con el uso de microarreglos de DNA. Con estos se pudo determinar con las iPS son más similares entre ellas mismas en comparación con las ESC y las iPS con un mayor número de fases en cultivo tienen un perfil más cercano a las ESC. Además, algunos genes relacionados con la diferenciación son expresados en iPS y no en ESC. Los datos sugieren que las iPS tempranas no han silenciado de manera eficiente los genes específicos del linaje del cual se originaron, y fallan en inducir a los genes importantes para producir un estado completamente indiferenciado. Cuando se comparan ESC con iPS de fases tempranas y fases avanzadas las diferencias comienzan a disminuir.<sup>25</sup>

### 3.8 Mecanismos epigenéticos

Una vez que las ESC pasan a un estadio de epiblasto los genes de pluripotencialidad se apagan y los genes necesarios para la formación de las tres capas embrionarias que definen los linajes celulares específicos se activan uno tras otro, determinando los marcadores de diferenciación. Aunque el mecanismo que induce esta transición aun no es claro, se sabe que esto ocurre como consecuencia de cambios a nivel *epigenético* (modificaciones en los sitios de regulación y en la estructura de la cromatina: metilación, acetilación y fosforilación de histonas permitiendo que los genes se transcriban o no). La reprogramación debe finalizar con un estado epigenético muy similar al de las ESC.<sup>25</sup>

### **3.9 Deficiencias de la metodología para la reprogramación**

Las iPS presentan tres problemas importantes, el problema de la bioética, el problema de la disponibilidad ilimitada de células y el uso de vectores retrovirales potencialmente mutagénicos. La inserción de genes a través de retrovirus puede resultar en tumorigénesis por inactivación de genes supresores de tumores. La integración de varias copias de genes de reprogramación reduce la probabilidad de silenciamiento aleatorio y aumentan el riesgo de una expresión estable de dichos transgenes, lo cual es totalmente indeseable para transgenes oncogénicos como c-Myc.<sup>25</sup>

### **3.10 Ventajas de las células iPS**

- Las células iPS son universalmente accesibles y relativamente fáciles de obtener y procesar.<sup>30</sup>
- Tienen el potencial de proliferar y diferenciarse en las células de las 3 capas germinales primarias, es decir, ectodermo, endodermo y mesodermo.<sup>30</sup>
- Pueden producir células específicas de pacientes o de cada linaje para uso terapéutico.<sup>30</sup>
- Proporcionan un depósito ilimitado de células madre y la controversia ética de los materiales embrionarios se anula.<sup>30</sup>
- Son de acceso autogénico, evitando así las preocupaciones éticas relacionadas con las células madre embrionarias.<sup>30</sup>

- Las células iPS autólogas tienen menos posibilidades de rechazo inmunológico y son altamente biocompatibles.<sup>30</sup>
- La producción de células iPS se puede ampliar fácilmente, para proporcionar una fuente ilimitada de células para aplicaciones clínicas.<sup>30</sup>

### 3.11 Desventajas

- Se ha observado que las células iPS pueden retener una memoria epigenética de su fenotipo, la cual limita su potencial de diferenciación. Se ha demostrado que las células iPS retienen la memoria de su tejido de origen durante pasajes sucesivos tempranos en cultivo. Por lo tanto, las líneas celulares de IPS dan como resultado una capacidad regenerativa diferente de las células mesenquimales, derivadas de diferentes líneas iPS.<sup>30</sup>
- Las células iPS indiferenciadas residuales en los sitios objetivo pueden proliferar de manera incontrolable para formar teratomas.<sup>30</sup>
- Se han expresado preocupaciones con respecto a la naturaleza artificial de la pluripotencia inducida en células iPS.<sup>30</sup>
- Los Virus que se integran en la célula huésped son riesgos intrínsecos en vista de la transformación celular. Por lo tanto, existe el riesgo de que los virus (como los retrovirus) puedan producir efectos oncogénicos en las células.<sup>30</sup>



## **3.12 Potencial de las células troncales pluripotenciales inducidas.**

### **3.12.1 Neuronas**

Las iPS tienen la capacidad de derivar células del sistema nervioso. Hargusa y colaboradores en el año 2010 generaron células dopaminérgicas de ESC e iPS humanas. Se observó la coexpresión de tirosina hidroxilasa y el canal de potasio Girk2 que son marcadores propios de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad neurodegenerativa de Parkinson. Se encontraron trasplantes viables sin evidencia de degeneración celular, ni formación de tumores.<sup>25</sup>

### **3.12.2 Cardiomiocitos**

Para la obtención de Cardiomiocitos las iPS fueron propagadas en medios especiales para la preservación de la pluripotencialidad con suero fetal bovino en soportes no adherentes. Las células formaron cuerpos embrioides. El análisis con anticuerpos e inmunofluorescencia muestra que las células contráctiles diferenciadas expresan marcadores específicos para células cardíacas.<sup>25</sup>

### **3.12.3 Células dendríticas**

Son células especializadas en la presentación de antígenos, utilizadas como portadores de vacunas en inmunoterapias anti-cancerosas. Las iPS son capaces de desarrollar células dendríticas *in vitro* en cantidades necesarias para fines terapéuticos.<sup>25</sup>

### **3.12.4 Fibroblastos**

Hewitt y colaboradores en 2011, generaron fibroblastos a partir de iPS y no detectaron diferencias entre sus propiedades fenotípicas y patrones de metilación de promotores génicos comparado con fibroblastos naturales.<sup>25</sup>

### **3.12.5 Células hematopoyéticas**

Las iPS son capaces de formar los elementos hematopoyéticos, incluyendo los linfocitos B.<sup>25</sup>

### **3.12.6 Melanocitos**

Los melanocitos epidermales juegan un papel importante en la protección de la piel frente a los rayos UV. Ohta y colaboradores en 2011, generaron líneas de células iPS a partir de fibroblastos dermales humanos, formaron cuerpos embrioides y los diferenciaron a melanocitos al cultivarlos en un medio suplementado. Siete semanas después formaron células que expresaban los marcadores de melanocitos.<sup>25</sup>

## CAPÍTULO 4 iPS DENTALES

En el campo de la odontología las células iPS con alta eficacia de reprogramación y proliferaciones se han derivado de células madre de papilas apicales (SCAP), células madres de la pulpa dental (DPSCs) y células madre de dientes primarios humanos (SHED), células madre de terceros molares, fibroblastos de mucosa oral, fibroblastos del ligamento gingival y periodontal (fig. 24).<sup>30</sup>

Las células iPS generadas a partir de tejidos desechados orales pueden usarse para la regeneración de tejido oral autólogo celular (regeneración periodontal), modulación personalizada de enfermedades orales para pacientes individuales y herramientas de diagnóstico hechas a medida.<sup>30</sup>

También pueden ayudar a comprender y especificar el complejo proceso de desarrollo de los tejidos orales.

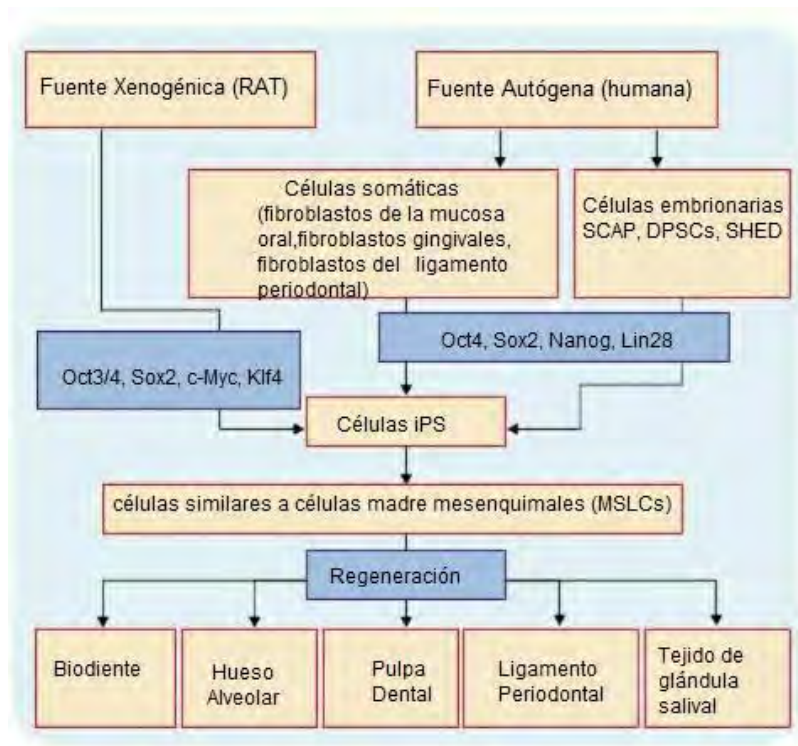


Figura 24 Ilustración que muestra fuentes, generación y aplicación de células iPS en odontología.

## **4.1 Fuentes de células iPS en cavidad bucal**

### **4.1.1 Stem cells in apical papillae / Células Madre en Papila Apical (SCAP)**

Las SCAP se derivan del tejido en desarrollo en el ápice de la raíz del diente llamada papila apical. Yan y colaboradores en 2010, estudiaron la accesibilidad y la viabilidad de generar células iPS de células SHED, SCAP y DPS. Se observó que estos tres tipos de células pueden ser reprogramadas en células iPS a un ritmo mayor que los fibroblastos que tienen características morfológicas similares a las células madre embrionarias en cultivo. Forman cuerpos embrioides y teratomas *in vitro* e *in vivo*, que contienen tejidos de las 3 capas germinales y, por lo tanto, se pueden utilizar como una fuente alternativa de células iPS.<sup>30</sup>

### **4.1.2 Dental Pulp Stem Cells / Células Madre de Pulpa Dental (DPSC)**

La pulpa dental se ha utilizado para generar células iPS, que pueden diferenciarse fácilmente en tejidos orales. Las DPSC tienen una mayor eficiencia de reprogramación que los fibroblastos dérmicos usados convencionalmente.<sup>30</sup>

### **4.1.3 Células madre de dientes primarios humanos**

SHED (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth / células madre de dientes primarios humanos) y las células madre de pulpa dental inmadura (Human immature dental pulp stem cells (hIDPSCs) poseen una mayor eficacia de reprogramación de iPS que las células fibroblásticas de la piel. Toriumi y colaboradores en 2015, compararon la eficiencia de reprogramación de las células de la raíz y de las coronas derivadas de los dientes primarios para inducir células iPS.

Las células iPS también pueden derivarse de células madre de pulpa dental inmaduras humanas (hIDPSC) en un lapso corto de tiempo en comparación con fibroblastos humanos, SHED y DPSC. Estas colonias celulares pueden crearse fácilmente bajo las condiciones de congelación de la posibilidad de contaminación en un ambiente xenogénico.<sup>30</sup>

### **4.1.4 Células madre de terceros molares**

Las MSC de terceros molares humanos generan células iPS mediante transducción retroviral sin transcripción responsable para la carcinogénesis (es decir, c-Myc). Las células iPS derivadas fueron similares a las células ES humanas en aspectos como morfología, marcadores de superficie, expresión génica, diferenciación *in vitro* y formación de teratomas. Como generalmente los terceros molares humanos se descartan como desechos clínicos, estas células pueden proporcionar una fuente valiosa, viable y económica para la generación de células iPS.<sup>30</sup>

#### **4.1.5 Mucosa oral**

Las células iPS aisladas a partir de fibroblastos de mucosa oral a través de la transferencia génica retroviral mostraron morfología tipo ESC y son de naturaleza pluripotente. Los fibroblastos de mucosa oral pueden proporcionar una fuente prometedora de células iPS, la recuperación es fácil y segura, sin daño estético o funcional, y curación rápida de heridas.<sup>30</sup>

#### **4.1.6 Células de fibroblastos gingivales**

El tejido gingival es fácil de obtener y las células gingivales se pueden obtener fácilmente de los pacientes. Las células iPS obtenidas a partir de células madre derivadas de tejido gingival tienen mejores propiedades inmunomoduladoras en comparación con otras células madre de tejido derivado de la vía oral. También la reprogramación de la eficacia de los fibroblastos gingivales obtenidos de ratones es más alta que los fibroblastos dérmicos.

Umezaki y colaboradores en 2015, generaron células iPS a partir de fibroblastos gingivales humanos (HGF) utilizando vectores plásmidos episomales, que mostraron características similares a las células ESC.<sup>30</sup>

#### **4.1.7 Fibroblastos del ligamento periodontal**

Células aisladas del ligamento periodontal presentan un fenotipo similar a los osteoblastos y tienen la capacidad de formar estructuras ligamentosas que se asemejan a las fibras de Sharpey y a los tejidos mineralizados similares a los huesos y el cemento radicular. Las células similares a células mesenquimales generadas a partir de células PDL-iPS (células pluripotentes inducidas de ligamento periodontal) tienen una capacidad superior para formar hueso y tejido conectivo fisiológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y se comparan con

células similares a células mesenquimales derivadas de fibroblastos gingivales y pulmonares.<sup>30</sup>

## 4.2 Células iPS en aplicaciones de Odontología

- Las células iPS libres de integración retroviral derivadas de fibroblastos gingivales humanos se pueden usar para producir células similares a células madre mesenquimales (MSC). Estas células exhibieron una mayor capacidad proliferativa que las MSC y, por lo tanto, podrían aplicarse con éxito a la regeneración tisular de tejidos y órganos orales. Lian y colaboradores en 2010, observaron que las células mesenquimales derivadas de células iPS humanas (iPSC-MSC) tienen una mayor capacidad de proliferación que células mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC). También tienen una bioseguridad mejorada y un potencial superior para la expansión celular en comparación con las células iPS directas.<sup>30</sup>
- Se ha demostrado que las células IPS combinadas con mesénquima dental y trasplantadas junto con esponjas de colágeno expresan marcadores de ameloblastos y amelogenina que indican su diferenciación en ameloblastos. Yoshida y colaboradores en 2015, observaron la diferenciación de las células iPS en células similares a ameloblastos en cultivos de células utilizando restos de células epiteliales de mediano tamaño de células Malassez (ERM) y cajas *in vitro* con material de gel.<sup>30</sup>
- Células similares a la cresta neural (NCLC) derivadas de células iPS cultivadas en medio condicionado por células epiteliales dentales, expresan el marcador de odontoblastos para la sialoproteína de dentina

(DSP) y demuestran la formación de estructuras dentales calcificadas con hueso al trasplantarse debajo de la cápsula renal en ratones inmunodeficientes. Por lo tanto, las NCLC derivadas de células iPS puede diferenciarse en odontoblastos por interacción recíproca con el epitelio dental. Alternativamente, las células IPS pueden inducirse para formar células de tipo odontoblástico, sin interacción epitelio-mesenquimal, con el uso de un andamiaje de tipo colágeno combinado con BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein-4 / proteína morfogenética ósea-4) y ácido retinoico. Las células diferenciadas eran fisiológicamente funcionales y no teratogénicas.<sup>30</sup>

- La BMP-4 ha demostrado inducir a las células iPS a formar células similares a ameloblastos y odontoblastos cuando se usan con ameloblastos en un medio acondicionado sin suero.<sup>30</sup>
- La combinación de células iPS con derivados de la matriz del esmalte pueden ayudar en la regeneración del ligamento periodontal a través de la formación de cemento, hueso alveolar y ligamentos periodontales. Las células iPS en combinación con un andamio de seda y una matriz de esmalte han demostrado la formación de hueso alveolar, cemento radicular y la regeneración de ligamento periodontal en los defectos de fenestración periodontal (en ratones). Las iPSC-MSc implantadas en los defectos de fenestración junto con fibrinógeno y coágulo de trombina conducen a la formación de tejido mineralizado y tejido similar a PDL presente en los defectos. Las células iPS también han mostrado en medios *in vitro*, la expresión de marcadores de tejido periodontal asociados con hueso, ligamento periodontal y cemento radicular bajo la influencia del derivado de la matriz del esmalte (EMD) y el factor de crecimiento/diferenciación 5 (GDF-5). El tratamiento de la periodontitis con iPSC-MSc con tranfección del gen 6 del factor de necrosis tumoral



(TSG-6) ha demostrado una reducción significativa de la inflamación periodontal, con niveles reducidos de infiltrados inflamatorios, citosinas pro-inflamatorias y también inhibió el nivel de pérdida ósea alveolar.<sup>30</sup>

- Se ha propuesto reprogramar las células de un paciente y producir células iPS específicas del mismo, que se induzcan para formar células epiteliales ectodérmicas y células mesenquimatosas derivadas de la cresta neural. La interacción entre estas células (imitando las condiciones *in vivo*) puede conducir a la formación de un germen dental que puede trasplantarse a la cavidad oral y puede ser completamente desarrollado y funcional.<sup>30</sup>
- Las células iPS, derivadas de células de orina, diferenciadas en células epiteliales derivadas de iPS cuando se combinan con mesénquima dental han mostrado la capacidad de formar estructuras similares a dientes que contienen pulpa dental, dentina, espacio de esmalte y órgano de esmalte.<sup>30</sup>
- Otra alternativa propuesta para formar un *biodiente* es la combinación de células epiteliales dentales derivadas de células iPS (iPSC-DEC) y células mesenquimales (endógenas y autogénicas). Las iPSC-DEC producirá ameloblastos productores de esmalte y las células mesenquimales generarán dentina pulpa y periodonto. Esta recombinación *in vitro* generará gérmenes dentales que se podrán trasplantar al hueso maxilar o mandibular de un huésped receptor del *biodiente* completamente funcional. Después del desarrollo dental normal, las células epiteliales derivadas de iPS desaparecerán después de la erupción de los dientes, lo que reducirá el riesgo de tumorigénesis

inducida por iPS en gran medida en el sistema dental con menores posibilidades de rechazo inmune también.<sup>30</sup>

Las células iPS humanas se han diferenciado con éxito en células osteoprogenitoras formadoras de hueso usando 2 enfoques:

- El primer enfoque implica la diferenciación directa de células iPS en células osteoprogenitoras.
  - El segundo enfoque implica la diferenciación de iPSC a iPSC-MSC y luego a células osteoprogenitoras.<sup>30</sup>
- 
- Se ha demostrado que las células iPS con proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) tienen actividad ALP (fosfatasa alcalina) potenciada, diferenciación osteogénica, expresión génica de la osteocalcina y mineralización de la matriz ósea, indicado por el CPC (calcium phosphate cement / cemento de fosfato de calcio) mezclado con células iPS. Liu (et al.) en 2013, demostraron que la transducción de BMP-2 de iPSC-MSC humanas sembradas en andamios RGD-CPC (tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico con cemento de fosfato de calcio) aumentó la unión y la osteogénesis de las células MS, la diferenciación osteogénica y el aumento de la producción mineral ósea.<sup>30</sup>
  - TheinHan en 2013, generó células madre mesenquimales derivadas de iPSC (iPSC-MSC) e investigó su proliferación y diferenciación osteogénica en el cemento de fosfato de calcio (CPC). Observó que las construcciones iPSC-MSC-CPC tienen una proliferación celular y una mineralización mejoradas y una eficacia de regeneración ósea. Las MSC generadas a partir de iPS mostraron una excelente proliferación celular y diferenciación en CPC. Tang y colaboradores (2014) observaron que las MSC derivadas de células iPS y respaldadas por andamios de CPC han mejorado la unión de

iPSC-MSC, la viabilidad celular y la proliferación junto con elevadas expresiones de marcadores osteogénicos y síntesis mineral ósea. Por lo tanto, iPSC-MSC junto con la construcción de CPC puede mejorar la regeneración ósea.<sup>30</sup>

- En el modelo de ratones, el análisis histológico del teratoma producido, después del trasplante de células iPS mostró la presencia de tejidos glandulares similares a la glándula salival submandibular (SMG) y la glándula salival sublingual (SLG). Las células iPS demuestran la capacidad potencial para regenerar células SMG, SLG y su capacidad para secretar saliva. También las glándulas salivales producidas a partir de células iPS tenían un mayor número de pequeñas estructuras acinares, indicando así que las células iPS tienen una capacidad potencial para acelerar la diferenciación del desarrollo y la regeneración de las glándulas salivales.<sup>30</sup>
- Los trastornos del desarrollo como la displasia ectodérmica, la displasia cleidocraneal, la osteogénesis imperfecta, etc., están asociados con las manifestaciones dentales. El uso de células iPS específicas de la enfermedad de la persona enferma podría ayudar a entender el modelo de enfermedad y el tratamiento de tales trastornos buco-dentales genéticos. Las manipulaciones genéticas exitosas *ex vivo* de líneas celulares iPS específicas de la enfermedad pueden proporcionar una herramienta terapéutica eficaz para el tratamiento de patologías dentales y trastornos dentales genéticos. Por lo tanto, la tecnología iPS debe dirigirse a cada aspecto de las enfermedades dentales y sus causas genéticas que aún no se han investigado.<sup>30</sup>

### 4.3 Desafíos y soluciones

Los principales desafíos y limitaciones de la tecnología de células iPS están relacionados con la memoria epigenética del fenotipo, el uso de retrovirus, la formación de teratomas y la aplicación de materiales xenogénicos. Una serie de soluciones estratégicas han sido propuestos y / o investigados para superar estos desafíos.<sup>30</sup>

#### 4.3.1 Memoria epigenética

La memoria epigenética de las células iPS derivadas de su fenotipo limita su potencial de diferenciación. Por ejemplo. Las células iPS derivadas de las células sanguíneas forman colonias hematopoyéticas más fácilmente, mientras que las células iPS de las células cutáneas formaran con mayor facilidad colonias osteogénicas, pero esto no puede ser beneficioso siempre. Como la memoria epigenética puede influir en las características de las células iPS derivadas de diferentes tipos de células y por lo tanto puede afectar el resultado *in vivo*; necesitan ser utilizadas con precaución en los estudios de modelización de la enfermedad, en la medicina regenerativa celular o para el estudio de fenómenos de crecimiento y desarrollo.

Se han diseñado y sugerido enfoques para superar este fenómeno. Los pases continuos de las células iPS en cultivo permiten que las células iPS pierdan sus características heredadas de las células primarias; disminuyendo las diferencias y permitiendo que las células iPS se parezcan mucho a las ESC. También se observa que las células ES derivadas de la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) poseen menos memoria epigenética derivada de las células parentales en comparación con las células iPS.<sup>30</sup>

### **4.3.2 Tumorigénesis y formación de teratomas**

La presencia de células iPS puede causar teratomas indeseables después del trasplante. Se pueden aplicar varios enfoques para eliminar los teratomas, como la ablación selectiva utilizando genes suicidas y la quimioterapia para eliminar las células formadoras de teratomas usando anticuerpos específicos.

Una de las opciones son los factores antiapoptóticos para inducir selectivamente la muerte celular de células humanas indiferenciadas con potencial de teratoma.<sup>30</sup>

### **4.3.3 Uso de retrovirus**

La integración retroviral como tratamiento es un factor que contribuye a la inestabilidad genómica y aumenta el riesgo de formación de tumores.<sup>30</sup>

### **4.3.4 Problema de células indiferenciadas**

Como el proceso de reprogramación celular no es 100% eficiente; se produce una mezcla heterogénea de células iPS, células parcialmente reprogramadas y células parcialmente diferenciadas después de la reprogramación. Para inhibir la formación de teratomas, es importante eliminar las células indiferenciadas de las células diferenciadas derivadas de iPS antes de su uso en aplicaciones clínicas y/o administración a pacientes.<sup>30</sup>

## CONCLUSIONES

El descubrimiento de las células pluripotentes inducidas es uno de los avances de mayor importancia en el área biomédica de los últimos años.

No obstante, al ser un descubrimiento relativamente nuevo, aún presentan fallas en su reprogramación, las cuales tendrán que ser erradicadas para lograr el éxito total de las células iPS.

- El desarrollo exitoso de las células pluripotentes inducidas significaría un importante recurso no sólo para la medicina regenerativa, sino para toda la medicina en general, ya que podría ayudarnos a entender la etiología de cualquier enfermedad, comprender su patogenia e inclusive evitar el desarrollo de la misma, así como desarrollar mejores medicamentos y tratamientos específicos para cada paciente.
- En el campo odontológico, la utilización de células iPS es reciente, por lo cual, su uso y aplicación aún se encuentra en investigación. Sin embargo, las células pluripotentes inducidas obtenidas de tejidos en cavidad bucal han demostrado tener excelentes resultados, manteniendo amplias expectativas en torno a ellas, pues en un futuro podrían realizarse mejores terapias, procedimientos y tratamientos odontológicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valencia R, Espinosa R, Saadia M. Células madre de la pulpa de dientes primarios o permanentes. Revista de Operatoria Dental y Biomateriales. Editorial RODYB. Volumen II. Número 2. Mayo-Agosto 2013 Disponible en:  
<http://www.rodyb.com/wp-content/uploads/2013/05/Celulas-Madre-de-la-Pulpa-de-Dientes-Primarios-y-Permanentes3.pdf>
2. Paracelso, C.I.A.G. Circulo de Investigación de la Antropología Gnóstica. Imagen disponible en:  
<http://www.ciaqweb.com/images/paracelso.jpg?crc=93523901>
3. Aristóteles. Filósofo y científico griego. Imagen disponible en:  
<https://www.lifeder.com/wp-content/uploads/2017/03/Arist%C3%B3teles-Filosof%C3%ADa.jpg>
4. Leonardo Da Vinci. Reader Choices. 2018. Imagen disponible en:  
<https://readerchoices.com/2018/02/02/leonardo-da-vinci/01-leonardo-da-vinci-book-talk/>
5. Animalúnculo. Debates over generation. Making visible embryos. (2014) Imagen disponible en:  
[http://www.sites.hps.cam.ac.uk/visibleembryos/s1/1\\_4\\_2\\_Hartsoeker-sml.jpg](http://www.sites.hps.cam.ac.uk/visibleembryos/s1/1_4_2_Hartsoeker-sml.jpg)
6. William Harvey. William Harvey Biography. Editors. TheFamousPeople.com. 2017. Imagen disponible en:  
<https://www.thefamouspeople.com/profiles/images/william-harvey-4.jpg>
7. Robert Hooke. Historia de la Microbiología. Timetoast timelines. Imagen disponible en:  
[https://s3.amazonaws.com/s3.timetoast.com/public/uploads/photos/7820671/juuu\\_.jpg?1478186506](https://s3.amazonaws.com/s3.timetoast.com/public/uploads/photos/7820671/juuu_.jpg?1478186506)
8. Caspar F. Wolff. Kulturportal West Ost. 2018. Imagen disponible en:  
<http://kulturportal-west-ost.eu/wp-content/uploads/2012/02/wolfca94-244x300.jpg>

9. Robert Brown. Robert Brown Biography. Editors.  
TheFamousPeople.com. 2017 Imagen disponible en:  
<https://www.thefamouspeople.com/profiles/images/robert-brown-4.jpg>
10. Rudolf Virchow. Biography. 2014. Imagen disponible en:  
[https://www.biography.com/.image/t\\_share/MTlwNjA4NjMzOTk5MzYxNTQ4/rudolf-virchow-9519219-1-402.jpg](https://www.biography.com/.image/t_share/MTlwNjA4NjMzOTk5MzYxNTQ4/rudolf-virchow-9519219-1-402.jpg)
11. La célula, unidad de vida. Recursos. Biología y Geología 5. PDF.  
Disponible en:  
<http://recursostic.educacion.es/secundaria/edad/4esobiologia/4quincena5/pdf/quincena5.pdf>
12. Esquema de la Célula. Blog de Ciencias de la Naturaleza .Arroyo Suárez José Ezequiel. Imagen disponible en:  
[https://cdn.slidesharecdn.com/ss\\_thumbnails/celula2-131123195808-phpapp02-thumbnail-4.jpg?cb=1385236708](https://cdn.slidesharecdn.com/ss_thumbnails/celula2-131123195808-phpapp02-thumbnail-4.jpg?cb=1385236708)
13. De Ita Ley M, Sánchez-Bringas G. Fundamentos de ciclo celular y conceptos básicos sobre de su regulación. Disponible en:  
<http://embriologia.facmed.unam.mx/documentos/ciclocelular.pdf>
14. Biología1. Portal Académico del CCH. (2018). Proceso. [online]  
Disponible en:  
[https://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad2/cicloCelular/proceso \[2018\].](https://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad2/cicloCelular/proceso [2018].)
15. Fases de la interfase. Imagen disponible en:  
<http://cmapspublic2.ihmc.us/rid=1R2FYH7HD-RHN80Y-17D0/Interfase%20celular.png>
16. Esquema de la Mitosis. La división celular. Emaze. Imagen disponible en:  
<https://curiosoando.com/wp-content/uploads/2016/04/mitosis.png>
17. A. Shakouri-Motlagh, et al., The application of decellularized human term fetal membranes in tissue engineering and regenerative medicine (TERM), Placenta (2017). Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.002>



18. Hernandez Ramirez P. Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. Instituto de Hematología e Inmunología. Ciudad de La Habana, Cuba. 2009. Disponible en:  
[http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol25\\_1\\_09/hih02109.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol25_1_09/hih02109.htm)
19. Morales Navarro Denia. Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2014 Sep [citado 2018 Feb 06]; 51(3): 288-304. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072014000300006&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072014000300006&lng=es).
20. Soto Navarrete E, Vargas Ulloa L, Oropeza Murillo M, Cano Sánchez P, Morán Reyes A, García Garduño M. Células pluripotenciales de la pulpa dental humana. El futuro de la regeneración en Odontología. ResearchGate (2014) Disponible en:  
<https://www.researchgate.net/publication/261993666>
21. Betancourt Gamboa Kenia, Barciela Calderón Julio, Guerra Menéndez Julio, Cabrera Carballo Nereyda. Uso de células madre en el complejo bucofacial. AMC [Internet]. 2012 Oct [citado 2018 Feb 05]; 16(5): 651-661. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552012000500015&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552012000500015&lng=es).
22. Amiel-Pérez José, Casado Fanny. Células madre: limitaciones y oportunidades en el Perú. Rev. perú. med. exp. salud pública [Internet]. 2015 Oct [citado 2018 Feb 05]; 32(4): 777-786. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342015000400022&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000400022&lng=es).
23. Gálvez-Martín P, Ruiz A, Clares B. Aplicación clínica de las terapias con células, genes y tejidos en España. Revista Clínica Española. 2017;

24. pib2, El origen y la evolución de la vida. La Oveja Dolly. Publicado el marzo 26, 2012 por pibtrabajo. Disponible en: <https://pib2.files.wordpress.com/2012/03/clonacion3.png>
25. Pelayo R, Santa-olalla J, Velasco I. "Células troncales y medicina regenerativa", Primera edición 2011, Cd. México, Universidad Nacional Autónoma de México, Programa universitario de investigación en salud. Pag.301-314
26. "Shinya Yamanaka - Facts". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 29 Jan 2018. Disponible en: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-facts.html)
27. Covarrubias. L. "El Premio Nobel de fisiología o medicina 2012 reconoce a la reprogramación genómica como la base de la medicina regenerativa". Greenwood, H.L., et al., Regenerative medicine and the developing world. *PLoS Med*, 2006. 3(9): p. e381
28. "Sir John B. Gurdon - Facts". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 5 Feb 2018. Disponible en: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2012/gurdon-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/gurdon-facts.html)
29. Montoliu L. Células pluripotentes inducidas. Resumen (2009). Disponible en: <http://www.bioeticanet.info/genetica/RepCelMontoliu.pdf>
30. Malhotra N. "Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells in Dentistry: A Review." *International Journal of Stem Cells* 9.2 (2016): 176–185. PMC. Web. 29 Mar. 2018. Disponible en <http://doi.org/10.15283/ijsc16029>