



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

REGENERACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS
PERIODONTALES UTILIZANDO CÉLULAS MADRE
DERIVADAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.

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:

ALINE PAULA RIVERA AZOCAR

TUTORA: C.D. ERÉNDIRA RUIZ GONZÁLEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi mamá que me apoyo incondicionalmente desde el primer día de mi carrera, siempre confió en mí y me impulso a seguir mis sueños. Te agradezco cada sacrificio, para mí nunca va a existir una mejor mamá que la que me tocó. Eres y siempre serás el mejor ejemplo a seguir.

A mi papá por heredarme ese carácter de nunca rendirme, de ayudarme a seguir mi meta y apoyarme para alcanzarla. Te agradezco cada esfuerzo que has hecho por mí y espero demostrarte que todo valió la pena al ser la mejor en mi profesión, nunca te cambiaría.

A la mejor compañera y hermana de viaje te agradezco tu paciencia y el amor que me has dado toda mi vida, gracias por ser quien eres. Gracias por tu nobleza y por enseñarme tantas cosas valiosas que me han ayudado a ser quien soy hoy.

A mi hermano que fue el primero que confió en mí, mi primer paciente nunca lo olvidare, que agradezco cada favor que me has hecho sin ti no sé qué haría, gracias al mejor viajero del mundo.

A Eugini que siempre me ha llenado de cariño, te agradezco la paciencia que siempre me has tenido, y haber sido la mejor paciente que he tenido. Gracias por enseñarme que en la vida hay que luchar por lo que uno quiere, te amo.

A mi abuela Margarita por permitirme atenderla y poner su salud bucal en mis manos, gracias por tu cariño.

Al mejor compañero y novio que, aunque estés lejos no cambia lo que siento por ti, eres el amor de mi vida, te agradezco tanto que has hecho por mí. Gracias por estos 3 años que han sido los mejores de mi vida.

A mis amigos que sin ellos la vida no sería igual, gracias por cada risa, por cada recuerdo que me ha llenado de alegría mi vida. Gracias a Marcela por ser mi mejor amiga agradezco tantos cafés a tu lado, a Salmeron por ser mi hermano y por nunca dejar de confiar en mí, te debo mucho. A María por ser mi amiga de la infancia y por escucharme siempre. A Enrique por las mejores llamadas por teléfono en el aeropuerto, los quiero mucho.

A mi tío Fernando que me apoyo no solo en mi carrera sino en mis muchas tareas de matemáticas y computación que sin él no hubiera podido.

A mi tío Alejandro y familia que siempre me han recibido con las puertas abiertas, gracias por las lecciones de vida que me han dado, su aprecio es algo muy valioso para mí.

A la Mtra. Amalia Cruz Chávez por ayudarme en esta última etapa de mi carrera.

A mi tutora la C.D. Eréndira Ruiz González, que sin su apoyo no hubiera podido, gracias por darme un poco de su tiempo y su conocimiento para realizar esta tesina.

A la U.N.A.M. por darme la oportunidad de estudiar en ella, por brindarme todas las herramientas para ser profesional, y poder decir que soy de esta universidad me llena de orgullo.

CAPÍTULO 3. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL	
LIGAMENTO PERIODONTAL.....	30
3.1 Función.....	31
3.2 Clasificación de origen de las células madre del ligamento	
periodontal.....	33
3.2.1Autólogo.....	33
3.2.2 Alogénico.....	34
3.3 Características.....	34
3.3.1 Diferenciación.....	34
3.3.2 Autorrenovación.....	35
3.3.3 Proliferación.....	35
3.4 Propiedades inmunomoduladoras.....	35
3.5 Marcadores.....	37
3.6 Localización.....	38

CAPÍTULO 4. OBTENCIÓN Y APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS	
MADRE DEL LIGAMENTO PERIODONTAL EN	
ODONTOLOGÍA.....	40
4.1 Métodos de obtención de las células madre del ligamento	
periodontal.....	40
4.1.1 In vivo	41
4.1.2 In vitro.....	41
4.2 Conservación.....	46
4.3 Andamios.....	47
4.4 Técnica quirúrgica.....	50
4.5 Indicaciones y limitaciones clínicas.....	54
4.6 Éxito del tratamiento y resultados a largo plazo.....	55

CONCLUSIONES.....58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....60



INTRODUCCIÓN

La regeneración tisular implica el reemplazo de tejidos afectados ya sea por enfermedad periodontal o por trauma, sustituyendolos con estructuras similares a partir de la estimulación específica de las células madre, es un campo que sigue en constante investigación. No hay una forma única de realización ya que se han efectuado múltiples estudios experimentales con técnicas quirúrgicas variables, distinto mecanismo de andamiaje, la mayoría de la investigación que se lleva a cabo en animales tales como ratas o cerdos.

Los ensayos clínicos de la regeneración a nivel bucal iniciaron obteniendo las células madre de la médula ósea aplicadas en los defectos óseos periodontales. Posteriormente se ubicaron las células madre de origen dental tales como derivadas de: la pulpa de dientes deciduos o permanentes, del folículo dental, de la papila apical y del ligamento periodontal, se han logrado identificar sus características celulares aunado con su fácil accesibilidad obteniendo grandes alcances.

Es una técnica prometedora para solucionar problemáticas de las terapias convencionales, con la implementación de células madre adquiridas tanto del mismo individuo de forma autóloga, previniendo una respuesta inmune o mediante la extracción de un donante de forma alogénica, esta adquisición puede ser de terceros molares, premolares indicados por ortodoncia o dientes con mal pronóstico por enfermedad periodontal. En cuanto a la aplicación estas células al ser extraídas se pueden cultivar en un medio específico de manera in vitro logrando su diferenciación y posteriormente colocación o utilizar las células de manera in vivo de manera directa, en ambas formas se han obtenido resultados satisfactorios.



OBJETIVO

- Conocer las características y técnicas de implementación de las células madre del ligamento periodontal utilizadas para la regeneración de defectos óseos periodontales.

CAPÍTULO 1. REGENERACIÓN PERIODONTAL

Las consecuencias de la enfermedad periodontal se manifiestan con la destrucción del periodonto, sistema que se compone de la encía, cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar, lo que puede ocasionar la pérdida parcial o total de los dientes (Figura 1).¹

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que inicialmente afecta los tejidos de soporte, que tiene como principal característica clínica la pérdida progresiva de la inserción colágena con la formación progresiva de defectos óseos y gingivales.²

El tratamiento periodontal tiene como objetivo final preservar los dientes con una salud tanto funcional y clínica, buscando mantener las expectativas estéticas del paciente, una opción sería la regeneración periodontal.³

Se han podido utilizar biomateriales para reparar, reemplazar o incluso regenerar hueso y tejidos dentales perdidos por caries o enfermedad periodontal.⁴

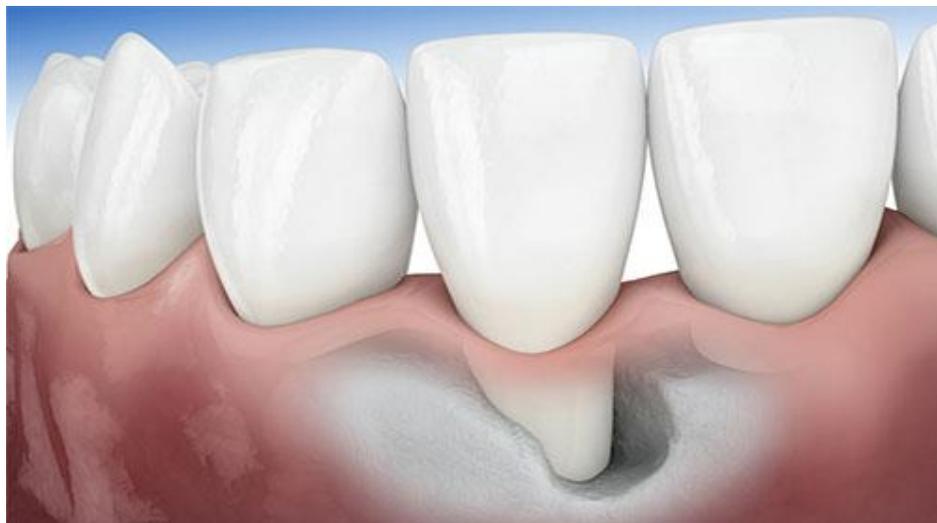


Figura 1. Defecto óseo periodontal⁵



Hay técnicas para la regeneración de hueso, con base a la combinación de tres factores; osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción, el organismo es capaz de regenerar el hueso que previamente estaba perdido.

- La osteogénesis es el proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo mediante células diferenciadas osteoprogenitoras, como el caso de la aplicación de células madre.
- La osteoinducción es el proceso de estimulación de la osteogénesis, que puede ocurrir mediante materiales osteoinductivos tales como proteínas morfogenéticas (BMPs).
- La osteoconducción son guías para el crecimiento óseo que permiten el depósito de hueso nuevo, como pueden ser hueso autólogo o heterólogo, fibrina autóloga rica en factores de crecimiento (PRGF) o hidroxiapatita reabsorbible, entre otros.⁴

1 Biomateriales utilizados para la regeneración periodontal

1.1.1 Células madre

Las células madre también conocidas células troncales, son células con amplio potencial de autorrenovación, son clonogénicas y tienen potencial de diferenciación osteogénica, adipogénica y neurogénica (Figura 2). Pueden llegar a ser una herramienta funcional la regeneración tisular.^{6,7}

Diversas investigaciones han proporcionan conocimientos sobre cómo un organismo se forma a partir de una sola célula fecundada, y también sobre los mecanismos mediante los cuales los individuos adultos sanos reparan las células dañadas y mantienen la homeostasis de sus órganos y tejidos.⁸

En todos los tejidos encontramos células madre que poseen la capacidad de compensar los daños que pueden ocurrir y mantener la reparación, aunque después de un daño tisular puede que haya una activación y reparación menor o tardía como es el caso del sistema nerviosos central o del corazón.⁹

También el factor de la edad y con el posible padecimiento de alguna enfermedad crónica puede llegar a afectar la función de las células madre, esto debido a la disminución del número y función de reparación/regeneración, por lo que pierden la capacidad de hacer frente a las mayores demandas de reparación existentes.⁹

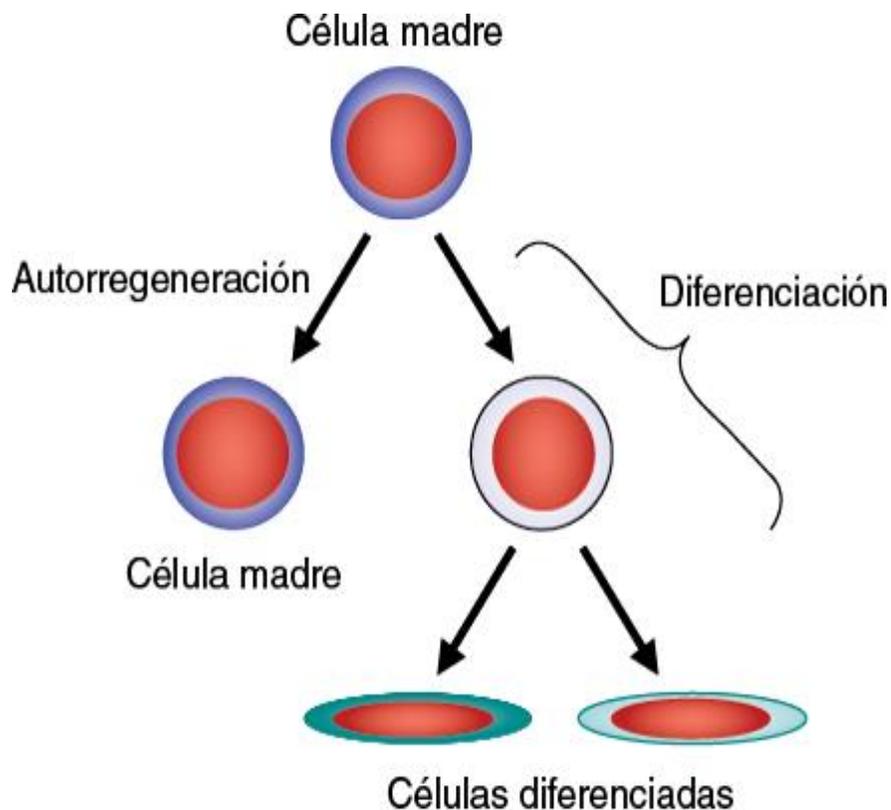


Figura 2 Características de las células madre. ¹⁰

1.1.1.1 Clasificación

Existen diferentes tipos de células madre, que van a depender del tipo de células que puedan crear o desarrollar y de la ubicación en el cuerpo. Hay

múltiples estudios que han demostrado que los tejidos orales son una fuente de células madre.¹¹

1.1.1.1 Según su origen

- Origen embrionario.

Las células de origen embrionario se producen a partir de las células de cultivo, que preceden del blastocisto, son capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula (totipotentes), teniendo un gran potencial para la regeneración tisular (Figura 3). Esta tecnología de células madre de origen embrionario, pueden revolucionar la medicina y crear una medicina biocompatible, pero entra en controversia por la cuestión ética.^{7,11}

- Origen adulto.

Son también conocidas como células madre postnatales o somáticas, tienen un potencial de diferenciación multipotente y su característica es que su potencial de diferenciación queda limitado a la capa embrionaria de la cual se originan. Las primeras células madre mesenquimales en ser aisladas fueron de la médula ósea por aspiración. Los marcadores de superficie con la clave en cuanto al aislamiento de células madre, puesto que las células mesenquimales y hematopoyéticas comparten marcadores similares, su identificación específica es importante para su aislamiento, siendo el STRO-1, el antígeno más importante para su identificación.^{7,11}

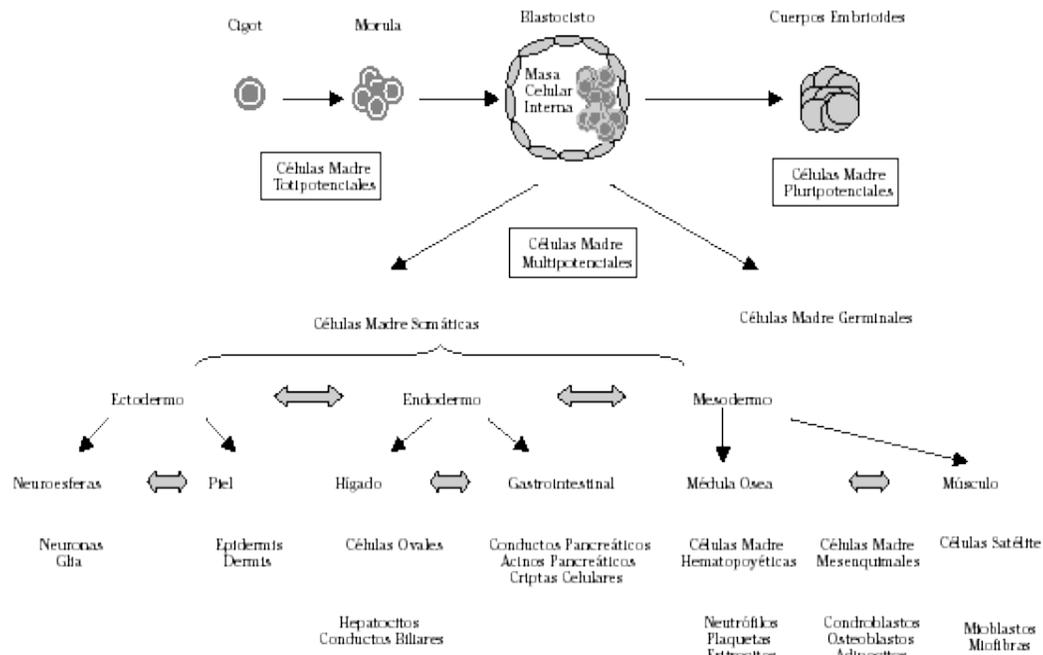


Figura 3 Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial¹²

1.1.1.1.2 Según el tejido sobre el cual se asientan

Es de suma importancia conocer el concepto de nicho, su primera mención fue por Scofield en 1978, son los elementos que rodean a la célula troncal cuando se encuentra en su estado nativo, incluyendo las células no troncales que puedan estar en contacto directo con ella, así como la matriz extracelular y las moléculas solubles que se encuentran localmente.⁷

Se han encontrado nichos en las siguientes localizaciones: médula ósea, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, folículo piloso, intestino, sistema nervioso y diente.⁷

En 1999, a través del retiro en la zona apical del incisivo de un ratón se logró cultivar y se estableció el primer nicho epitelial de células madre (este nicho se concluyó que era particularmente en los roedores ya que es diferente la

dentición humana, ya que tienen una erupción continua a lo largo de la vida del animal).¹¹

1.1.1.1.3 Según el potencial de diferenciación

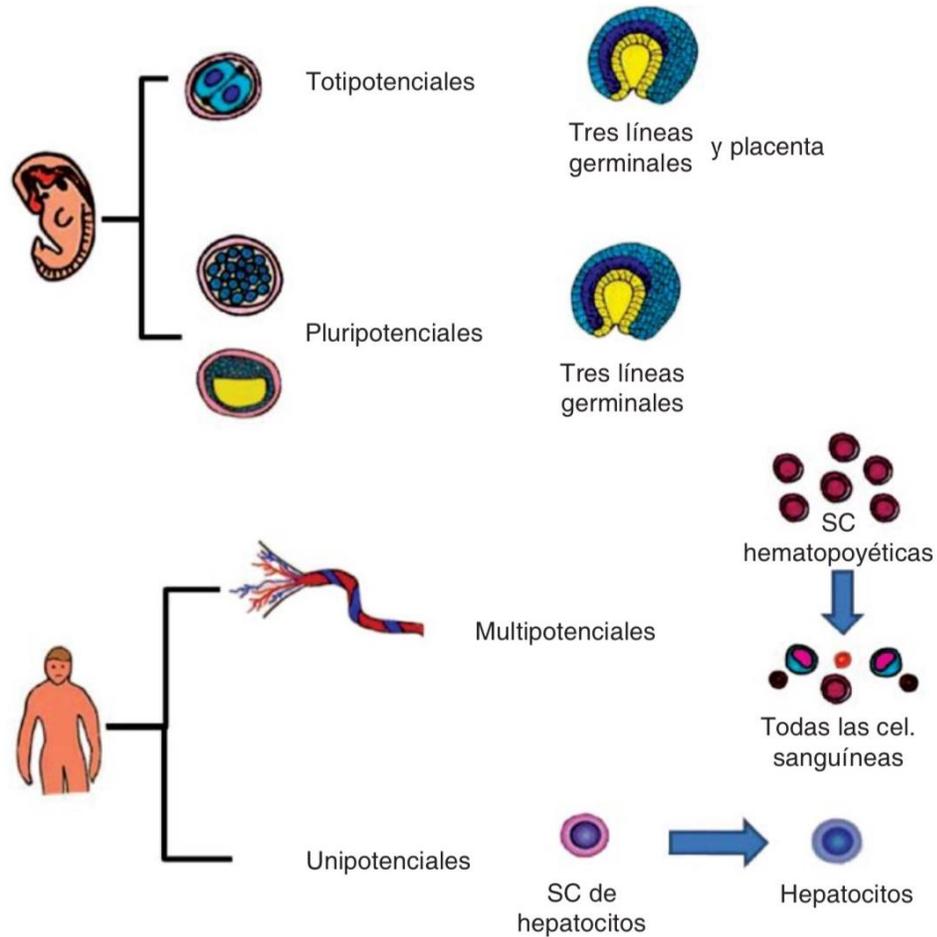


Figura 4 Las células madre se dividen en embrionarias y adultas de acuerdo con su origen, aunque basándose en su potencialidad pueden ser totipotenciales, dando lugar a las tres líneas germinales y a la placenta; pluripotenciales, con la capacidad de diferenciarse en las tres líneas germinales; multipotenciales, limitadas a diferenciarse a un linaje celular específico de acuerdo con su localización y unipotenciales, las cuales generan un tipo celular específico.¹³



- Células madre totipotentes. Tienen la capacidad de originar un embrión, con la característica que se puede diferenciar en cualquier estirpe celular, exclusivamente el cigoto y las descendientes de las dos primeras divisiones son células totipotenciales, como el trofoblasto de la placenta.^{7,9}
- Células madre pluripotentes. Al cuarto días las células totipotenciales comienzan a diferenciarse, desarrollando el blastocisto y la masa celular interna. Las células de la masa celular interna son pluripotenciales y tiene la capacidad de diferenciarse en las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero ya no tienen la capacidad de desarrollar la placenta. Con la capacidad de crear los 200 tejidos del ser humano excepto el tejido extraembrionario.^{7,9}
- Células madre multipotentes. Pueden desarrollar un subconjunto de tipos celulares. Son células que tiene la capacidad de originar un rango limitado de estirpes celulares diferenciadas con base a su localización; por ejemplo, las células madre del sistema nervioso central tienen el potencial de producir tres tipos celulares: neuronas, oligodendrocitos y astrocitos.^{7,9}
- Células madre oligopotentes. Pueden originar un conjunto de tipos de celulares, pero mucho más disminuido. Como, por ejemplo: una célula madre neural que puede crear un subconjunto de neuronas en el cerebro.⁷
- Células madre unipotentes. Son células capaces de desarrollar un solo tipo de célula específica; por ejemplo, las células madre en la



membrana basal de la epidermis interfolicular, que producen exclusivamente escamas queratinizadas.^{7,9} Figura 4

Se logro un importante avance en la reprogramación celular al insertar cuatro genes de pluripotencialidad de las células madre en las células postnatales, dando origen a células madre pluripotentes inducidas este estudio fue realizado en el 2006 por el Dr. Shinya Yamanaka.¹⁴

1.1.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son moléculas reguladoras de origen natural, que se unen a los receptores en la superficie celular, juegan un papel importante en la cicatrización de heridas y tejidos. Estimulan la función celular y tisular al influir en la diferenciación celular, cambian su actividad bioquímica, el crecimiento celular y regulan su tasa de proliferación.¹⁵

Los factores de crecimiento agregados al cultivo o secretados por las células madre y las células del nicho cercanas son de suma importancia ya que rigen el destino celular e influyen en la diferenciación celular.¹⁶

El tejido blando adherente a la superficie de la raíz extraída es una fuente células madre junto con su matriz extracelular (nicho) que contiene factores de crecimiento endógeno para estimular a las células madre quiescentes a desarrollar las células necesarias para ayudar en la regeneración.¹⁷

Estas células madre del ligamento periodontal (PDLSC) poseen una baja actividad mitótica que, cuando se requiere, es decir, durante el fenómeno de renovación fisiológica, deriva las señales de la matriz extracelular y, junto con

los factores de crecimiento, comienza a ejecutar su función de reemplazar in situ las células viejas por las nuevas.¹⁷

De igual manera también se utilizan células madre con factores de crecimiento en los cultivos de células madre para así generar una diferenciación en: cementoblastos, osteoblastos, fibroblastos periodontales, cemento, hueso alveolar e, incluso, para secretar matriz extracelular del ligamento periodontal (Figura 5).⁴

Se han comprobado que los factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) mejoran la diferenciación osteogénica de las PDLSC y promueve la reparación del defecto óseo en modelos animales.

Diversos factores de crecimiento pueden mejorar la capacidad regenerativa de las PDLSC, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) es bueno para modular los efectos de otros factores de crecimiento. El FGF-2 y sus receptores (FGFR1-4), que son proteínas transmembrana de un solo paso con actividad tirosina quinasa, se han implicado en autorrenovación y diferenciación de células madre embrionarias y de las células madre mesenquimales.¹⁸

En un modelo de perro y primate, una sola aplicación tópica de FGF-2 en un soporte de gel regeneró con éxito el cemento, el hueso alveolar y los ligamentos periodontales funcionales con las fibras de Sharpey en los defectos óseos de furca de clase II. FGF-2 aumenta la tasa de crecimiento y la vida útil de las células madre de la médula ósea y mantiene su multipotencia por la inhibición de la diferenciación celular, y este efecto inhibitorio es reversible después de la retirada de FGF-2.

El FGF-2 aplicado tópicamente aumenta eficientemente el número de PDLSC Stro-1 / CD146 sin afectar su tallo, y pueden regenerar los tejidos dañados después de que desaparezca el FGF-2.¹⁸

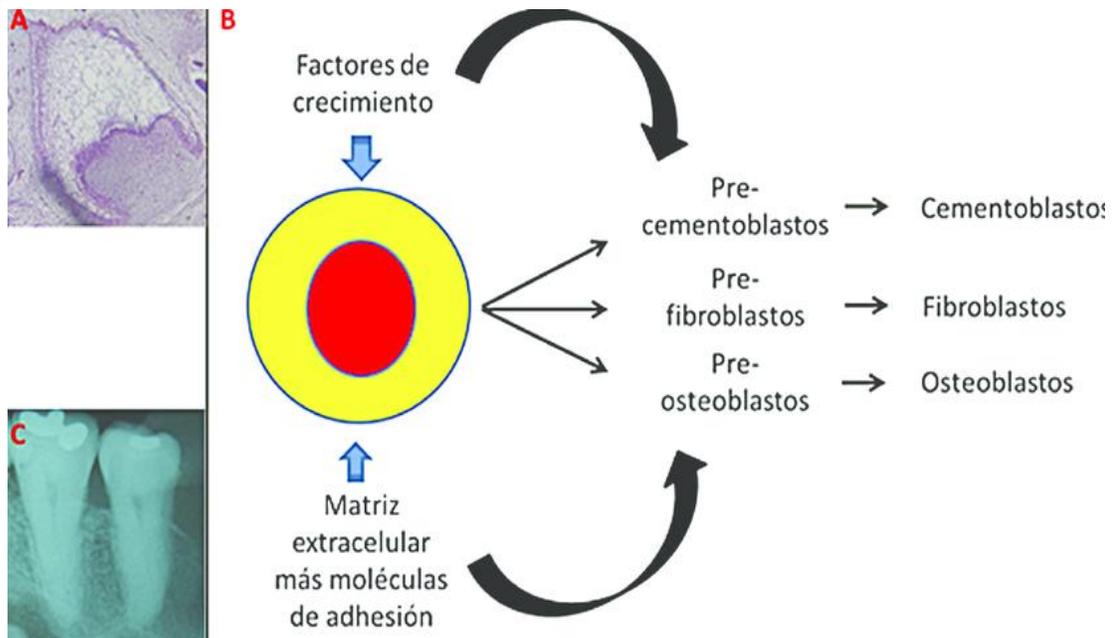


Figura 5 Rol de las células madre en el desarrollo y regeneración periodontal. A. El periodonto se origina del saco dentario que rodea al órgano del esmalte y la papila dentaria. B. La asociación de factores de crecimiento y una matriz extracelular induce a la diferenciación de células madre en los tres tipos de linajes presentes en el ligamento periodontal. C. La capacidad regenerativa del ligamento periodontal persiste aun en piezas permanentes.¹⁹

1.1.3 Proteínas óseas morfogenéticas

Proteínas morfogenéticas óseas (BMP), que pertenecen a la transformación a la superfamilia del factor de crecimiento β (TGF- β) muestra un gran potencial para promover la agregación celular en el sitio osteogénico y la inducción de la diferenciación en osteoblastos. BMP9, también conocido como el factor de crecimiento y diferenciación 2 (GDF-2), se determinó recientemente que es



capaz de induciendo diferenciación osteogénica y formación ósea tanto in vitro como in vivo.²⁰

Entre los 14 tipos de BMP investigados in vivo, BMP9 fue el inductor más potente en la diferenciación osteogénica, aunque BMP-2, -6 y -7 podrían inducir genes asociados al tejido óseo, en este estudio realizado por Wang y col. en ratones con exposición ósea del muslo como resultado de la implantación de PDLSC y con ayuda de BMP-2, se obtuvieron osteoblastos inducidos diferenciación y maduración in vivo, radiográficamente se observaron nódulos de calcio mineralizados.²⁰

Ishikawa et al realizo un estudio donde se combinan las capacidades osteoinductivas de las BMP con células madre mesenquimales provenientes de la médula ósea. Se realizo una comparación in vitro de la diferencia entre un cultivo de células madre con BMP-2 recombinante, y un cultivo de células sin BMP-2 recombinante. El primer grupo produjo mayores números de expresiones osteogénicas. Posteriormente, las células que se diferenciaron con BMP-2 recombinante fueron implantadas en ratas y formaron tejidos óseos y cartilagosos. Esto demuestra que las células madre mesenquimales pueden diferenciarse mediante BMP-2 recombinante, potenciando la inducción y formación ósea.⁴

Hakki y col. determinó si BMP-2, -6 y -7 regulan diferencialmente la proliferación, mineralización y expresión de ARNm de hueso / mineralizados genes asociados a tejidos del ligamento periodontal humano, las PDLSC se obtuvieron de terceros molares impactados en humanos. Los datos sugieren que BMP-2 -6 y -7 son potentes reguladores de expresión génica de PDLSC y biomineralización, empleando BMP con PDLSC aisladas de tejidos de ligamentos periodontales proporciona una estrategia satisfactoria en la ingeniería del tejido óseo.²¹



Sin embargo, Correa y col mencionan que estas proteínas morfogenéticas en el caso las más comunes que son BMP-2 y BMP7, no son una buena opción para el tratamiento de la pérdida de hueso alveolar en la enfermedad periodontal puesto que generan anquilosis alrededor del diente.²²



CAPÍTULO 2. CÉLULAS MADRE DE ORIGEN DENTAL

2.1 Células madre de origen dental

La regeneración periodontal es una opción para el tratamiento de defectos periodontales, que tiene como objetivo la reconstrucción de los tejidos perdidos por la enfermedad. Pero es importante tomar en cuenta que se tiene que eliminar la causa, el proceso de patogenia, para que el tratamiento sea favorable y no se pierda la capacidad de regeneración.³

Crear condiciones basadas en los principios de la biología celular y molecular la bioingeniería y los biomateriales para regenerar los tejidos es el objetivo principal de la ingeniería de tejidos. Es un campo emergente, cuyo fin es guiar la formación, reparación y vascularización de los órganos mediante el uso de principios biológicos y físicos. Los componentes que tienen interacción incluyen: andamios, moléculas de señalización y células.^{2, 23}

Se han cultivado exitosamente las células troncales postnatales multipotenciales a través de diferentes métodos de extracción, entre estas existen 5 tipos de células madre de origen dental: de la pulpa, del ligamento periodontal, de dientes primarios exfoliados, de la papila dental y del folículo dental.^{7, 24}

Se ha podido afirmar que, en comparación con las células madre de la médula ósea, las células madre de origen dental tienen predilección por el desarrollo odontogénico.⁷

El objetivo de la reparación/regeneración periodontal consiste en una nueva cementogenesis, osteogénesis y formación de fibras de ligamento periodontal.¹

2.1.1 Células madre de la pulpa

Las primeras células madre dentales que se aislaron por Gronthos en el 2000, poseen una gran similitud con las características de las células madre de la médula ósea, se consideró que había una comunidad de células multipotenciales en el tejido pulpar de dientes maduros.⁷

Posteriormente se realizaron estudios que empezaron a relacionarlas con características endoteliales y vasculares, pero más adelante se lograron aislar de manera ex vivo y determinaron las características a nivel in vivo e in vitro.

La producción de células madre es muy reducida (1 por 100 de todas las células) y según el incremento de la edad del individuo, la disponibilidad de estas células se ve disminuida. Se han extraído las células que provienen de terceros molares y dientes supernumerarios, si son aisladas durante la formación de la corona, las células madre son más proliferativas que si se aíslan más adelante (Figura 6). Como ventaja tenemos la fácil accesibilidad y escasa morbilidad, su extracción es eficiente, posee la capacidad de diferenciación y se ha comprobado que la interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular.⁷

Se comprobó la capacidad de diferenciación con un experimento con ratas donde se observó su potencial terapéutico y regenerativo para la reparación de un infarto de miocardio tras ligaduras de las arterias coronarias, 7 días después de la implantación de células madre de la pulpa dental de forma inyectada intramiocárdicamente en los animales, 4 semanas mostraron mejora en la función cardíaca.²⁵



Figura 6 Dientes primarios exfoliados con pulpa dental expuesta.⁷

2.1.2 Células del ligamento periodontal

Se ha logrado implementar la utilización de células madre del ligamento periodontal (PDLSC) en la ingeniería tisular para desarrollar una nueva estrategia en terapia de regeneración periodontal.²

Son una población celular heterogénea con origen de la cresta neural, estudios han confirmado la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, cementoblastos, adipocitos, condrocitos y endotelial como las células. Los experimentos in vivo confirmaron la capacidad de formar ligamento periodontal y similar al cemento tejido. La función principal de las células madre tienen como objetivo principal mantener la homeostasis y la regeneración del tejido periodontal.^{7, 23}

Estudios in vivo con PDLSC realizados en ratones inmunocomprometidos, demostraron la función 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.⁷



Las PDLSC forman colágeno tipo I, y lo más destacado con 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.²⁶

2.1.3 Células madre de dientes temporales exfoliados

Este tipo de células se extraen de la pulpa remanente de dientes deciduos exfoliados, y se pudo concluir sobre la existencia de células multipotenciales diferentes a las aisladas anteriormente de la pulpa dental de dientes permanentes. En cuanto a las diferencias de los dientes deciduos y los dientes permanentes son diferentes en función, proceso de desarrollo y estructura tisular, y en comparación se encontró una mayor velocidad de proliferación y una mayor capacidad de especialización en los dientes deciduos.⁷

En un estudio realizado por Hyun Nam y Gene Lee en el 2009, se estudia la posibilidad de que tengan algo que ver en la composición epitelial para la reparación o regeneración del diente, ya que entre sus principales características morfológicas correspondían con el fenotipo de células madre epiteliales, pudiendo llegar a expresar marcadores epiteliales. Con el estudio se probó el potencial de diferenciarse en células angiogénicas, cuya capacidad de inducción se considera fundamental para cualquier tipo de regeneración con tejido conjuntivo. Se observó que había la necesidad del factor de crecimiento vascular endotelial para que las células madre de la pulpa de dientes deciduos se diferencien hacia células endoteliales. La capacidad osteoinductora, se ha comprobado en ratones, que pueden reparar defectos de formación ósea.^{7, 27}



2.1.4 Células madre de la papila apical

La papila apical está comprendida por el tejido blando situado en los ápices del diente permanente que se está formando, hay una zona muy rica en células entre la papila apical y la pulpa. Las células madre de la papila dental se muestran positivas para varios marcadores neurológicos, pero cuando se someten a estimulación neurológica, el número de marcadores aumenta notablemente.⁷

La papila es el tejido precursor de la pulpa radicular, comparando las células madre de la papila generan o desarrollan los odontoblastos primarios, que tienen como función de la formación de la dentina radicular, mientras que las células madre de la pulpa son, las precursoras de los odontoblastos que forman la dentina reparativa.²⁸

2.1.5 Células madre del folículo dental

El folículo dental tiene origen ectomesenquimal, este tejido se encuentra alrededor del órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación. Contiene células madre que son las que determinan el desarrollar del periodonto, conformado por el cemento, ligamento, hueso alveolar y encía. Estas células madre del folículo dental han sido aisladas de los terceros molares impactados.⁷

Tienen características similares al resto de célula madre de origen dental, pero son las colonias clonogénicas en menor número que los demás tipos. El cultivo in vitro se muestran una morfología típica de fibroblastos, y la capacidad de diferenciarse de manera osteogénica. E in vivo se identificó el antígeno STRO-1 en las células del folículo dentales, el trasplante de estas células desarrolla una estructura de tejido fibroso rígido únicamente.⁷

Tipo de célula	Características In vitro	Características In vivo
Células madre de la pulpa dental	Multipotencialidad con capacidad: - Osteogénica - Adipo y neurogénica - Condro y miogénica	Formación de tejido ectópico: - Complejo dentino pulpar - Células similares a odontoblastos - Tejido óseo similar al original
Células madre del ligamento periodontal	Multipotencialidad con capacidad: - Osteogénica - Adipo y neurogénica - Condro y miogénica	Formación de tejido ectópico: - Tejido similar al cemento - Células similares a odontoblastos
Células madre de los dientes deciduos exfoliados	Multipotencialidad con capacidad: - Dentinogénica - Adipo y neurogénica - Condro y miogénica - Osteoinducción	Formación de tejido ectópico: - Tejido similar al dentino pulpar - Células similares a los odontoblastos - Formación ósea - No existe formación del complejo dentino- pulpar
	Multipotencialidad con capacidad:	Formación de tejido ectópico:

Células madre de la papila dental	<ul style="list-style-type: none"> - Dentinogénica - Adipo y neurogénica - Condro y miogénica 	<ul style="list-style-type: none"> - Tejido similar al dentino pulpar - Células similares a los odontoblastos
Células del folículo dental	Multipotencialidad con capacidad: <ul style="list-style-type: none"> - Odontogénica - Cementogénica - Adipo y neurogénica - Condro y miogénica 	Formación de tejido ectópico: <ul style="list-style-type: none"> - Tejido similar al ligamento periodontal - Formación de matriz cementaria

Tabla 1. Nombres y características in vitro e in vivo más importantes de las células madre de origen dentario. ⁷

2.2 Aplicaciones

Periodoncia

En periodoncia se están utilizando algunas células madre de origen dental, se involucra el cultivo y trasplante de por ejemplo de las PDLSC en el defecto óseo periodontal ya que tienen la capacidad de diferenciación y regeneración celular, manteniendo las características principales del ligamento periodontal, es decir, la homeostasis y la regeneración del tejido periodontal.⁶

Con base en los estudios realizados anteriormente en animales en los cuales se implementaron tratamientos con células madre derivadas de diferentes localizaciones anatómicas fueron satisfactorios los resultados, dado que se logró la regeneración exitosa de cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal.⁶



Aparte de los realizados en animales, se han llevado a cabo con personas aplicando células madre provenientes de médula ósea, ligamento periodontal y pulpa dental del tercer molar, como resultados los tejidos periodontales se han regenerado de manera correcta. Demostrando que por el séptimo día posterior al tratamiento la encía retomó su coloración normal y al tercer mes radiográficamente se observa la neoformación ósea y regeneración de tejidos periodontales, sin complicaciones postoperatorias.⁶

Cirugía

En el campo de cirugía se realizó un estudio colocando las células madre en un defecto óseo de rama mandibular por quiste dentígero. Se comprobó que poseen la capacidad de generar hueso. Los resultados obtenidos indican que el crecimiento óseo ha sido altamente satisfactorio.²⁹

También se ha demostrado la capacidad de regenerar defectos mandibulares con la aplicación de células derivadas de la pulpa dental de los terceros molares extraídos previamente con andamio de colágeno, se regeneró de manera ósea el defecto después de un año de la aplicación del injerto. Y en otros estudios realizados se pudo reparar un defecto óseo mandibular de manera completa a los 6 meses de reconstrucción postquirúrgica utilizando dientes deciduos exfoliados.³⁰

Endodoncia

En relación con la especialidad de endodoncia, destaca la terapia ex vivo en la cual se ha demostrado mayor capacidad odontogénica. Consiste en el aislamiento de células madre desde el tejido pulpar, su diferenciación en odontoblastos y finalmente su trasplante en andamios colocado de manera autológicamente.^{6, 31}



Estudios realizados con células madre de la pulpa se encontraron en las siguientes capas: zona pobre en células (zona basal de weil), zona rica en células, y pulpa como tal. Para crear pulpa dental se utilizan células madre de la pulpa dental adulta o células madre de dientes deciduos, junto con células endoteliales microvasculares humanas (para diseñar vasos sanguíneos funcionales) que son incorporados en un depósito hecho de colágeno (material reabsorbible) que posteriormente son aplicados en el tejido subcutáneo de ratones inmunodeficientes, después de un período de 14 a 28 días, se observa que el tejido pulpar diseñado se asemeja a la pulpa dental normal.³²

En el caso de dientes con ápices incompletos que sufren algún tipo de trauma, un tratamiento a seguir sería la inducción del cierre apical y su posterior tratamiento endodóntico convencional. Pero otra estrategia podría ser la regeneración celular dando lugar a la creación de nuevo tejido pulpar que permitiría la finalización del desarrollo radicular y prevenir pérdidas prematuras de dientes.³²



CAPÍTULO 3. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

El ligamento periodontal se origina en la región del folículo dental, procedente de las células de la cresta neural craneal. Puede definirse como un tejido conectivo especializado encontrado entre el cemento que se ubica alrededor de la raíz del diente y el hueso alveolar.³³

Posee múltiples fibras orientadas, es vascular y altamente celular, contiene fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos. La función del ligamento periodontal es proteger, apoyar y proporcionar información sensorial para el sistema masticatorio, aparte de mantener la homeostasis y reparación/regeneración constante de la destrucción de tejido causada por una enfermedad periodontal o trauma.³³

Funciones: 1) mantiene la inserción del diente en el hueso alveolar; 2) suministra los nutrientes al alvéolo y al cemento; 3) protege a los dientes; y 4) mantener la homeostasis de los dientes en su alvéolo por medio de la regeneración continua.²⁴

Tiene origen ectomesenquimal que se han encontrado en una población de células madre postnatales multipotenciales, con capacidad clonogénica y alto índice de proliferación.²⁴

En la cuestión celular se ha reconocido una alta capacidad de células osteoblásticas, adipogénicas y condrogénicas en condiciones específicas de inducción in vitro y la formación de hueso ectópico y cartílagos in vivo.³⁴



Se empezó experimentando con células madre de la médula ósea, hoy en día existen otras alternativas, debido a que se han encontrado otros nichos con existencia de células progenitoras como es caso de las PDLSC. ⁴

3.1 Función

La función de las células ubicadas en el ligamento periodontal está en relación con la síntesis y la resorción de hueso alveolar y el tejido conectivo fibroso y del cemento, por lo tanto, las células pueden dividirse en tres categorías principales: células sintéticas, células de resorción y células progenitoras.

- Células sintéticas: Son células formativas como los osteoblastos, fibroblastos, cementoblastos.
- Células de resorción: Son osteoclastos, fibroblastos, cementoclastos.
- Células progenitoras: Son las enfocadas como término lo indica, cualquier célula en división con la capacidad de diferenciarse, incluidas las células madre.

Aparte encontramos otro tipo de células como las epiteliales (resto epitelial de malassez) y del tejido conectivo, las células de Masts y los macrófagos están presentes.³⁵

El nicho de las PDLSC no solo es una ubicación física sino un lugar donde las señales extrínsecas interactúan e integran para influir en el comportamiento de las células madre, se podría definirse como el microambiente in vivo en donde las células madre residen y reciben estímulos que determinan la función que tendrán.¹⁷

La interacción de las células intrínsecas en el nicho de células madre generan redes de comunicación celular y adaptan una función de las células madre para aumentar su capacidad de responder a la necesidad terapéutica.¹⁷

Son de vital importancia la existencia de estas células madre para garantizar el mantenimiento del tejido periodontal y de igual manera para la reparación/regeneración; las señales son recibidas por la matriz extracelular y el entorno extrínseco es crítico en la homeostasis de los tejidos.

En específico, las proteínas de la matriz extracelular actúan como ancla de células madre y son un mecanismo de forma mecánica de andamio para emitir la señalización de células madre. En comparación a la situación de las células madre es diferente en vivo que in vitro, el potencial proliferativo restringido es observado por la cuestión de la ausencia de nicho fisiológico.¹⁷ Figura 7

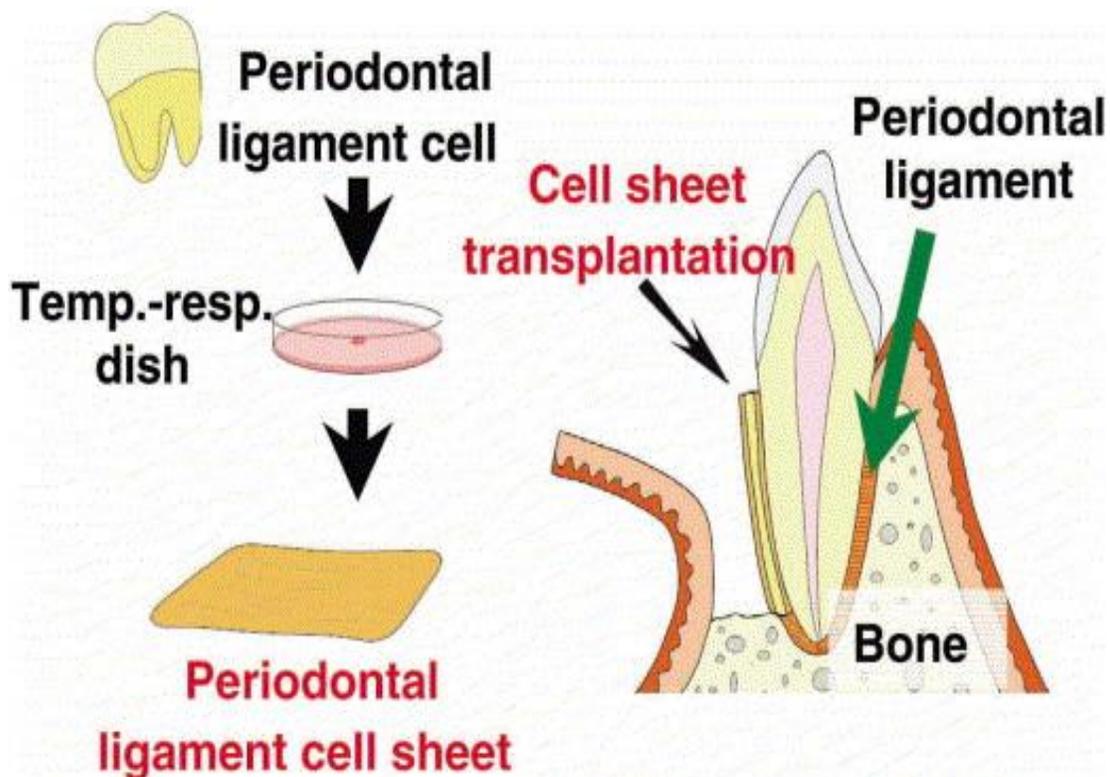


Figura 7 Trasplante de monocapa de PDLSC para regeneración de defecto óseo periodontal.³⁶

3.2 Clasificación del origen de las células madre del ligamento periodontal

Ding y col. utilizaron un modelo de cerdos miniatura para investigar la capacidad regenerativa de las PDLSC, su estudio utilizó tres fuentes celulares: células madre de ligamento periodontal alogénico; PDLSC autólogo; y grupo control solo con terapia inicial. Seis defectos óseos alveolares fueron creados quirúrgicamente en tres cerdos por grupo. Doce semanas después de la cirugía de implantación, el porcentaje de regeneración ósea del periodonto en los grupos de PDLSC autólogo y alogénico fue 38.6% y 35.7%.³⁷

3.2.1 Autólogo

La extracción de células madre de manera autóloga pueden ser cultivadas junto con de un mecanismo de andamiaje y posteriormente ser trasplantadas en el sitio del defecto óseo para lograr una regeneración, solucionando las posibles complicaciones que se han encontrado en terapias tradicionales.⁶

El uso del trasplante autólogo anula el potencial de una respuesta inmune significativa del huésped contra las células del donante, el desarrollo de poblaciones celulares adecuadas a partir de una fuente donante puede verse limitada debido a la variación en el potencial de las células madre entre los donantes, la calidad del tejido, la edad y estado de enfermedad de cada paciente.³⁸

En el estudio realizado por Ding y Liu et al, se trasplantaron PDLSC autólogas en los defectos periodontales creados quirúrgicamente a modelos porcinos miniatura, y como resultado se observó la regeneración de los tejidos periodontales satisfactoriamente, sugiriendo que es a través de la ingeniería



tisular con células madre, se consigue un tratamiento favorable para la periodontitis.³⁷

3.2.2 Alogénico

La transferencia de PDLSC utilizando células de otro paciente se denomina alotrasplante. El trasplante alogénico se refiere que las células madre provienen de un donante, se ha reportado que mientras más avanza la edad las células madre se van deteriorando por lo que a veces se tienen que tomar otros factores para aplicación correcta y funcional de la células madre, en el caso del estudio de Han y col. en ratas se utilizaron células alogénicas de ratas hembras saludables y se transfirieron a las ratas con defectos óseos periodontales y tuvo éxito teniendo como resultado un porcentaje significativamente mayor de relleno óseo, longitud del nuevo puente óseo y regeneración del cemento y ligamento periodontal en comparación con el grupo tratado con Gelfoam únicamente a los días 14 y 21.^{38, 39}

3.3 Características

3.3.1 Diferenciación: Han demostrados características similares las células madre multipotentes que se han aislado del ligamento periodontal con las células madre de la médula ósea, con la capacidad de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condrocitos en condiciones de diferenciación especificadas.⁴⁰

Las PDLSC tienen la capacidad de crear cemento y estructuras de ligamento periodontal cuando se trasplantan en defectos periodontales creados quirúrgicamente en animales, lo que demuestra su uso potencial para la regeneración periodontal.⁴⁰

3.3.2 Autorrenovación: Tiene como características principal potente capacidad de autorrenovación, las células madre pueden ser cultivadas in vitro con varios pases de cultivo sin pérdida significativa de sus propiedades fundamentales.⁴¹

3.3.3 Proliferación: El término proliferación, se refiere a su capacidad de producir una célula madre diferenciada mediante una división celular asimétrica. El número de estas se mantendrá constante si únicamente se lleva a cabo la división simétrica, siempre y cuando en cada ciclo una célula madre pueda dar lugar a dos células madre hijas. La división simétrica provee un mecanismo para incrementar la población después de una pérdida de estas mismas.⁹

3.5 Propiedades inmunomoduladoras

Esta propiedad de las células madre mesenquimales (MSCs) comprende todos aquellos mecanismos utilizados para potenciar o disminuir la respuesta inmunológica. En la inmunomodulación las MSCs son capaces de afectar a las células innatas y adaptativas del sistema inmune a través de dos mecanismos, uno mediante contacto directo célula a célula (T, B, dendríticas y macrófagos) y el segundo mediante la liberación de factores solubles como prostaglandina E2 (PGE2), factor de crecimiento transformante beta, óxido nítrico, indolamina 2.3- dioxigenasa (IDO), factor de crecimiento hepático (HGF) y el antígeno G leucocitario (HLA-G).⁴²

De igual manera se ha descrito que las MSCs liberan factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas, y hormonas, que tienen efectos paracrinos,



favoreciendo la migración, proliferación y adhesión potenciando así sus propiedades funcionales. Las MSCs tienen efectos inhibitorios o inmunosupresores en la proliferación y activación de los Linfocitos T.^{43, 44}

Las propiedades inmunosupresoras de MSCs adultas se pueden describir de la siguiente manera:

- 1.-Las MSC adultas suprimen la proliferación de Linfocitos T, la secreción de citoquinas y citotoxicidad y regulan el balance de las estirpes Th1/Th2.^{44, 45}
- 2.-Las MSC regulan la función de las células T Reguladoras; aumentan la viabilidad de las células B o inhiben su proliferación y detienen el ciclo celular.⁴²
- 3.-Las MSCs afectan a la secreción de anticuerpos y a la producción de moléculas coestimuladoras de células B.
- 4.-Las MSC inhiben la maduración, activación y presentación de antígenos de las células dendríticas y además inhiben la activación de células Natural Killer (NK) mediante la Interleucina -2 (IL-2).^{42, 46}

En resumen, la capacidad inmunomoduladora es una propiedad que poseen las células madre, en la cual inhiben el reconocimiento de aloantígenos por parte de las células T, células presentadoras de antígenos y las células asesinas naturales. Secretan citoquinas y factores de crecimiento del tipo TGFb, IFN γ , IL-4, IL-1, IL-10 y Factor de Crecimiento Hepático que promueven la actividad inmunosupresora.⁴⁷

3.6 Marcadores

Feng et al., 2010 y Chen et al. 2016 que utilizaron células madre derivadas del ligamento periodontal autólogas presentes en retiro del tejido adherente al tercer molar extraído y se obtuvieron pruebas relevantes de potencial osteogénico, cementogénico y adipogénico. Se informa la presencia de marcadores de células madre mesenquimales como CD34, CD45, CD73, CD105, CD146, CD166, SSEA4, 3G5 y STRO-1.^{48, 49}

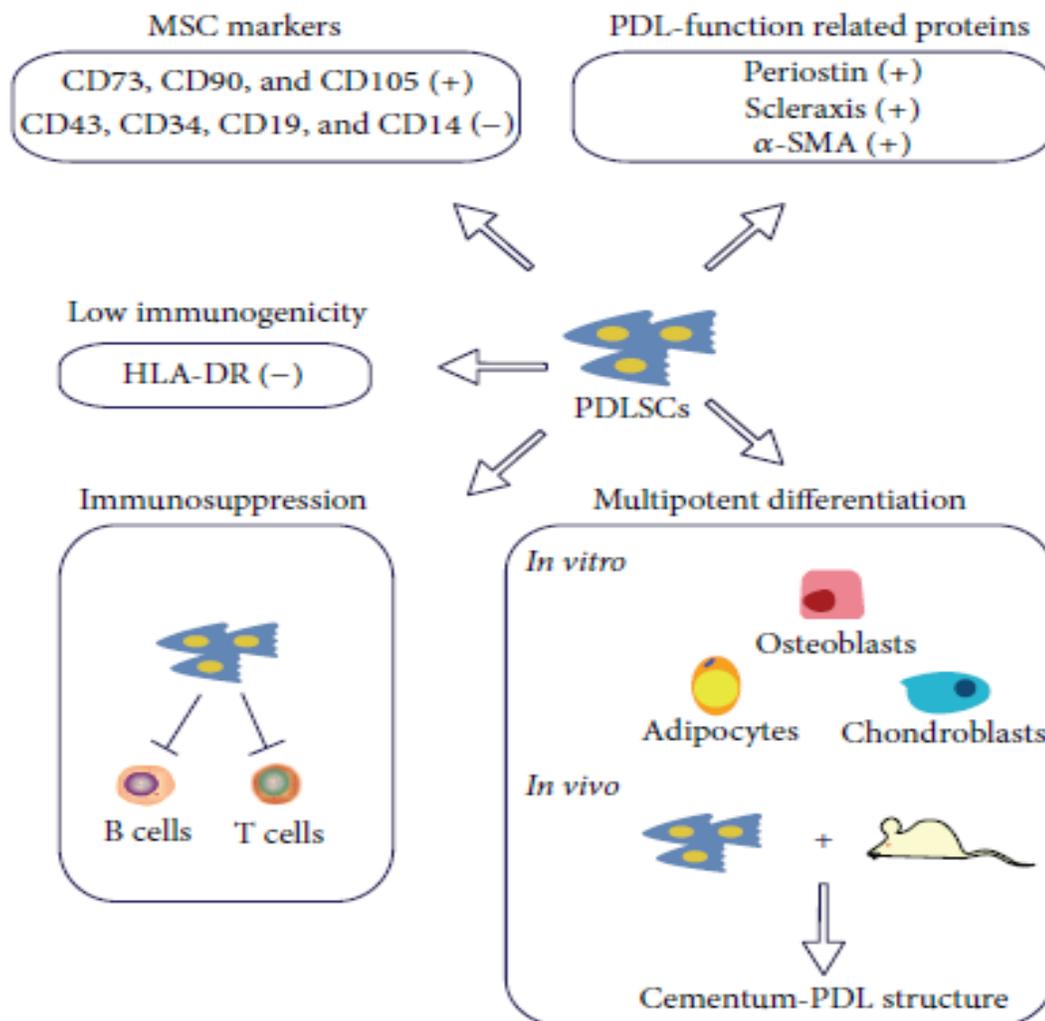


Figura 8 Criterios para la identificación de células madre del ligamento periodontal. Las PDLSC comparten similitudes con las MSC en términos de fenotipo antigénico y potencial de diferenciación multipotente in vitro. Además, las PDLSC también poseen baja



inmunogenicidad y capacidad inmunosupresora, similar a MSC. Sin embargo, las PDLSC difieren de las MSC derivadas de otros tejidos u órganos, como la expresión de proteínas relacionadas con la función PDL. (periostina, escleraxis y α -SMA) y formando una estructura de cemento-PDL in vivo.¹⁸

En un estudio se mostró que el tejido de ligamento periodontal humano contiene 27% de células positivas STRO-1 (una proteína de superficie utilizada en el reconocimiento de células madre) con un 3% fuertemente positivos. Con lo que se concluye el potencial para regenerar tejidos periodontales.^{50, 51}

3.7 Localización

Entre las diferentes células madre dentales, las PDLSC pueden servir como fuente celular, fácilmente accesible desde los tejidos blandos adherentes al diente extraído y proporciona un excelente efecto terapéutico para promover la regeneración periodontal.¹⁷

En cuanto a la localización de las células madre en el ligamento periodontal en el estudio realizado por Han y col. en ratas se utilizaron células madre de manera alogénica de ratas hembra y se extrajo el ligamento periodontal retirando suavemente del tercio medio de la superficie de la raíz molar y se logró cultivar exitosamente.³⁸

Las PDLSC se encuentran en el área de 0 a 20 μ m desde el perímetro de los vasos sanguíneos poseen una actividad mitótica baja.¹⁷

Por otra parte; las PDLSC aisladas de la cavidad alveolar se compararon con las células madre convencionales derivadas de la superficie de la raíz y tenían una mayor capacidad de proliferación, así como un potencial de diferenciación osteogénico y adipogénico más fuerte que las extraídas de la raíz.¹⁸



Las fuentes de PDLSC derivados de dientes deciduos tuvo una mayor proliferación, un potencial adipogénico más fuerte y un potencial osteogénico que los derivados de dientes permanentes.¹⁸

Lee y col. reveló que las células madre obtenidas de los ligamentos periodontales de dientes supernumerarios tenían una mejor eficiencia formadora de colonias que las células madre derivadas de la médula ósea y podían diferenciarse en adipocitos y osteoblastos.¹⁸



CAPÍTULO 4. OBTENCIÓN Y APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DEL LIGAMENTO PERIODONTAL EN ODONTOLOGÍA

La ingeniería tisular ha desarrollado terapias utilizando células madre que han resultado muy prometedoras, ya que se ha logrado la regeneración ósea alveolar y tener solución en grandes defectos en el tejido periodontal.¹¹

El objetivo de la terapia regenerativa es estimular a las células somáticas para formar nuevamente los tejidos perdidos, en efecto, presentan múltiples ventajas, por ejemplo, fácil aislamiento, cultivo y estabilidad fenotípica in vitro, demostrada capacidad de diferenciación, además, importantes propiedades inmunomoduladoras utilizadas de manera alogénica.^{1, 2}

4.1 Métodos de obtención de las células madre del ligamento periodontal

El uso de células madre se puede destacar la relevancia de los medios de cultivo o de una nutrición adecuada para ellas; otro factor de importancia en la ingeniería tisular es un andamio que sirva como una matriz extracelular temporal para que exista una óptima función, nutrición, adhesión, proliferación y señalización celular.⁶

La implantación de células en el defecto periodontal se realiza a través de enfoques libres de biomaterial o basados en biomaterial, además, estas células derivadas del huésped pueden someterse a aislamiento, expansión ex vivo (cultivo de células madre) y reimplantación de estas células en el defecto periodontal o inyectadas directamente como una suspensión o entregadas por andamios de biomateriales o portadores de células de forma in vivo. Aunque la expansión ex vivo de las células madre es necesaria, estas células generalmente reducen su capacidad de autorrenovarse y proliferar durante el



paso. Las principales dificultades que enfrenta la implementación clínica generalizada de las estrategias existentes de administración celular para la terapia periodontal son la calificación, el costo y el tiempo requeridos para el cultivo *ex vivo*.^{2, 52}

4.1.1 In vivo

Los análisis *in vivo* con PDLSC realizados en ratones inmunocomprometidos sugirieron 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. Esta capa de tejido contenía fibras colágenas y se asociaba íntimamente al hueso alveolar próximo al periodonto regenerado.⁵³

Seon y col. realizaron un estudio evaluando las características *in vivo* e *in vitro* de las PDLSC y como resultados se observaron después de 8 semanas de implantadas las células madre tejidos similares al cemento con una matriz de fibra que tenía un patrón más irregular o una alineación lineal perpendicular a la capa celular de revestimiento y los densos haces de colágeno perpendicular al tejido duro recién formado que se asemeja a las fibras de Sharpey, en algunas áreas, los tejidos contenían células de tipo cementocito incrustadas que se asemejan al cemento celular.⁵⁴

4.1.2 In vitro

Para realizar el aislamiento de las células madre en este caso del ligamento periodontal existen dos posibles métodos; uno, conocido como el método de explante y que se basa en la alta tasa de proliferación celular de las células madre a partir de un tejido fragmentado y su adherencia al plástico, mientras que el segundo método, conocido como el método de digestión enzimática, consiste en la extirpación quirúrgica del tejido, su digestión en dispaasa/colagenasa y su caracterización a través de una selección realizada gracias a

marcadores específicos; principalmente con el apoyo de un citómetro de flujo con clasificador de células activadas fluorescentemente.⁵¹

- Método del explante

El procedimiento general consiste en inocular un medio de cultivo gelificado (generalmente con agar) con un fragmento de tejido u órgano, llamado explante, previamente tratado para eliminar todo organismo que se encuentre en su superficie.⁵⁵

Seo y col. en el 2004 y 2005 realizaron el cultivo con el método de explante de la siguiente manera se retiró el ligamento periodontal y se cortaron en trozos de 0.5 mm³ de diámetro se depositaron directamente sobre placas de cultivo de 35 mm sin medio de cultivo para permitir que el tejido se adhiriera a la placa, luego de unos minutos se agregó alfa-MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20% y antibióticos (Penicilina). Los trozos de tejido se cultivaron en incubadora a 37 °C y aire con 5 % de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada dos días hasta la formación de una monocapa celular con confluencia de 90-100%, la cual se puede observar mediante microscopía óptica.^{53, 56, 57, 58, 59}

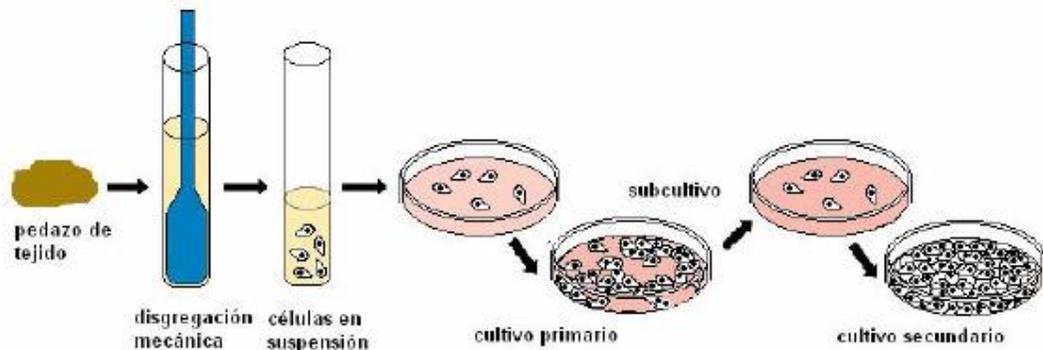


Figura 9 Esquema cultivo celular: cultivo primario y cultivo secundario⁵⁸

- Método de digestión enzimática

Las células madre cultivadas por métodos de digestión enzimática tienen mayores tasas de proliferación, mejor eficiencia en la formación de colonias y una mayor capacidad de diferenciación que las células madre de crecimiento. Sumado que la tasa de éxito del cultivo primario fue mayor con 3 mg/ml colagenasa y 1 mg/ml dispasa tipo I (96.7%) juntas que con el uso de tripsina y EDTA (72.7%). Por lo tanto, la colagenasa tipo I y la dispasa se recomiendan para el cultivo primario de las PDLSC.

El medio de cultivo es de suma importancia ya que también afecta las características biológicas de las células. Dos medios se usan ampliamente para cultivarlas: el medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) y el medio esencial mínimo α (α -MEM) que contiene L-glutamina y L-ascorbicacid-2-fosfato. Tanto α -MEM como DMEM pueden mantener fenotipos de células madre (expresión de Stro-1, CD146, CD105 y CD44), generalmente durante 1 hora en CO₂.

Sin embargo, las PDLSC cultivadas en α -MEM tenían mayores tasas de proliferación y un potencial osteogénico más fuerte que las células madre derivadas el ligamento periodontal cultivadas en DMEM, esto puede deberse a más aminoácidos, vitaminas y nucleótidos en α -MEM que en DMEM. Las células generalmente se cultivan con un 20% de oxígeno durante la expansión in vitro. Sin embargo, la hipoxia parece ser el microambiente fisiológico de las células madre. La expresión de marcadores de pluripotencia (Oct-4, Sox-2 y c-Myc) y el potencial de diferenciación de PDLSC aumentaron significativamente un cultivo por debajo del 2% de oxígeno.¹⁸

Los cultivos primarios de PDLSC producen números de células pequeñas (promedio de 1,250 células), que es menos de lo necesario para generar una

hoja de células para la regeneración periodontal (al menos 4×10^6 células). Las células madre deben proliferar al menos 12 duplicaciones de la población antes de la aplicación. Por lo que es importante expandir las células in vitro sin perder su potencia.¹⁸

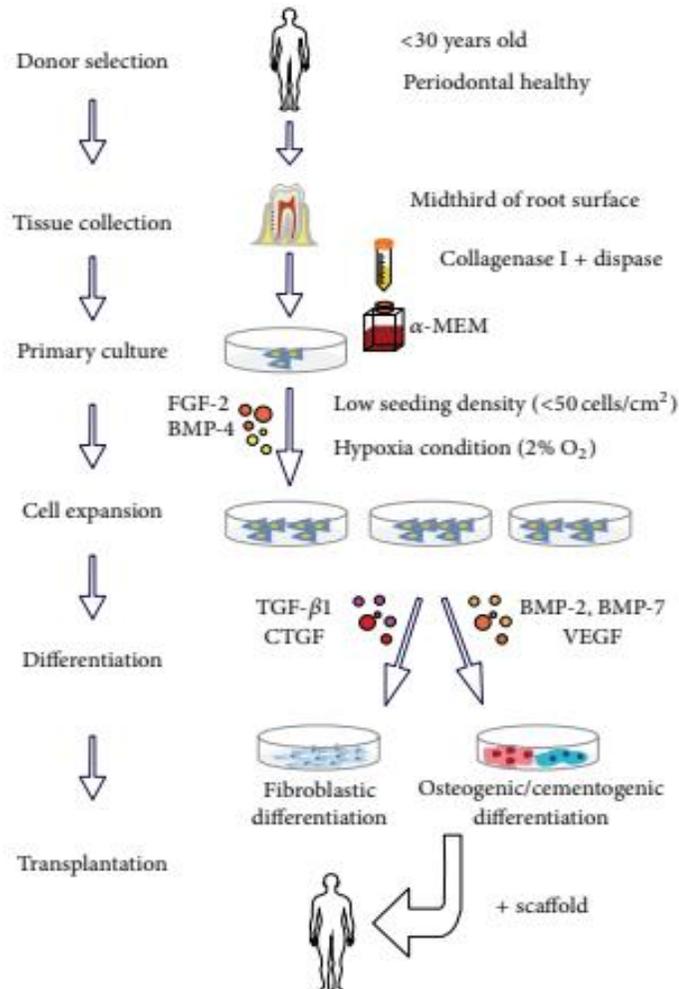


Figura 10 Condiciones optimizadas para el aislamiento y el cultivo de PDLSC. Métodos y condiciones de cultivo óptimos, como el uso de digestión enzimática, α -MEM y la siembra de células a baja densidad, bajo hipoxia se recomiendan. El uso secuencial de diferentes factores de crecimiento es efectivo para la expansión y diferenciación celular.¹⁸

Seo y col en 2004 y 2005 incubó el tejido en una solución de colagenasa tipo I, con una concentración de 1 mg/ml en medio de cultivo α -MEM suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de



estreptomina) y tripsina al 0,25 %. Esta mezcla se incubó dentro de una estufa a 37° C durante 15 minutos. Se cultivaron durante 6, la médium fue cambiado dos veces por semana hasta generar una monocapa.⁵³

Para los métodos y condiciones de cultivo celular para expandir las PDLSC rápidamente sin perder su potencia y características. Para el cultivo primario de las células madre, tanto el crecimiento externo como los métodos de disociación enzimática fueron factibles. ¹⁸

Se espera que utilizando la técnica del explante se establezca una monocapa celular luego de 15 - 18 días; mientras que mediante la técnica de digestión enzimática, la monocapa se debiera establecer a los 14 días.^{24, 60}

Después de una fase de expansión celular, estas células se introducen en una estructura biomimética, y se inducen a la diferenciación en sentido osteogénico.¹

Las células obtenidas se cultivaron en un medio osteogénico a base de alfa-MEM suplementado SFB al 10 %, 100 nM de dexametasona, 10 mM β -glicerofosfato, 50 μ g/ml ácido ascórbico, 100 U/ml de penicilina/estreptomina y 0,25 mg/ml de anfotericina B, con el fin de diferenciar las células al linaje óseo/cemento con producción de nódulos de mineralización in vitro. El medio osteogénico se cambió cada 3 días, hasta completar 21 días.^{54, 61, 62}

La dexametasona estimula la proliferación de las MSCs y permite la diferenciación a un linaje óseo, β -glicerol fosfato es un fosfato orgánico que da un soporte a la osteogénesis mediante el control de la mineralización y la actividad de los osteoblastos y el ácido ascórbico desempeña un papel en el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y promueve la producción de osteocalcina.⁶³



Sin embargo, las principales desventajas de las células madre cultivadas ex vivo son la dificultad en el suministro celular, la inmunogenicidad celular, la tumorigenicidad, la dificultad en el control de los destinos celulares in vitro e in vivo, la rentabilidad y la larga duración, y por parte es costoso se suma a las desventajas.¹⁷

Las células madre cultivadas in vitro pueden tener un potencial proliferativo restringido debido a la falta de nicho fisiológico. La expansión celular ex vivo es esencial para tratar defectos de gran tamaño.¹⁷

Se evidenció que una proliferación celular significativamente más alta de PDLSC resulta en mayores depósitos de calcio después de 3 semana de cultivo, lo que sugiere que las PDLSC son una fuente mejor de células madre osteogénicas.²

4.2 Conservación

El método utilizado para esto es la criopreservación, proceso en el cual las células o el tejido completo son preservados por medio de la congelación a temperaturas bajo cero, como 77K o 196°C (Punto de ebullición del nitrógeno). A estas bajas temperaturas cualquier actividad biológica incluyendo las reacciones bioquímicas que dejarían la célula muerta, son efectivamente detenidas.⁶

Las PDLSC obtenidas de los dientes deciduos pueden ser criopreservado, y más adelante en la vida del donante podría usarse como fuente de células madre para reconstruir periodonto destruido por enfermedades periodontales.⁵⁴

4.3 Andamios

Un andamio es un material que portador que ayuda a suministrar su contenido celular en este caso las células madre y diversos factores angiogénicos a el sitio donde se desea la regeneración periodontal, que sus características deben ser biodegradables y biocompatibles.¹⁷

Las células madre interactúan con estas matrices o andamios de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento, mientras que sintetizan su propia matriz extracelular, que proporciona un ambiente y arquitectura específicos del tejido, y sirve como almacenaje de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento, entre otros factores.⁶⁴

Al usar este tipo de matrices las células parecen desplegar una mayor adhesión, movilidad, velocidad de proliferación celular y morfologías más similares a las del tejido del que buscamos un reemplazo.⁶⁴

Las matrices o andamios necesitan reunir unas propiedades para la ingeniería del tejido óseo:

- **Biocompatibilidad:** No debe causar una reacción inmune, ni ser tóxica en los tejidos en el cual se van a implantar.
- **Porosidad:** Deberá tener poros que son necesarios para la difusión de gases y nutrientes entre las células cultivadas. En cuestión del tejido óseo la comunicación celular está aumentada, para desarrollar un tejido normal y funcional. En un andamio, el diámetro de poros apropiado oscila entre 100 y 350 micras para tener la capacidad regenerativa.^{4, 64}
- **Biodegradable:** Deberá ser absorbible por el tejido que la rodea sin que sea necesaria su eliminación por manera quirúrgica.



- Osteoinductividad: Las células madre son agrupadas en los sitios de regeneración y estimuladas para diferenciarse hacia la línea osteogénica.
- Propiedades mecánicas: Se debe tener en cuenta que las zonas de reemplazo estarán sometidas a tensiones y fuerzas mecánicas.
- Osteoconducción: La matriz o andamio deberá tener unas propiedades topográficas que permitan que las células osteogénicas migren hacia la superficie de la matriz a través de un coágulo de fibrina, que se establece después de haber implantado el material.⁶⁴

Primero encontramos materiales naturales y estos se pueden agrupar en tres categorías: proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Dentro de estos tenemos el colágeno, elastina, fibrina, alginato, seda, glicosaminoglicanos, tales como hialuronano y quitosano. Ofrecen resistencia estructural, son biocompatible y biodegradable, pero como desventajas está que son difíciles de procesar y afecta que tienen el riesgo de transmitir patógenos, provocando una respuesta inmunológica.⁶⁵

El colágeno ha tenido especial interés y se ha utilizado en múltiples enfoques en la ingeniería de tejidos, sin embargo, es mecánicamente débil y sufre una degradación rápida.⁶⁵

Por otra parte, están los polímeros sintéticos, que proporcionan propiedades químicas y mecánicas correctas y permiten un excelente control sobre las características fisicoquímicas, como el peso molecular, tamaño de poro, rigidez o la presencia de grupos funcionales.⁶⁵

Los andamios sintéticos de uso común incluyen materiales de poliéster, tales como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y poli caprolactona



(PCL). El poliéster no es tóxico y es biocompatible, y se ha utilizado para numerosas técnicas de tejido.⁶⁵

Las desventajas de los polímeros sintéticos pueden ser respuesta inflamatoria crónica o aguda en el huésped, y disminución localizada del pH debido a la acidez de la degradación hidrolítica subproductos.⁶⁵

Hay otra alternativa que son los copolímeros pueden ser más útiles que los andamios de polímeros individuales porque la copolimerización puede compensar las desventajas que pueden tener los polímeros individuales. Ésteres de poliéster, tales como polietilenglicol (PEG) o tereftalato de polibutileno (PBT) y poliuretanos (PU) son polímeros sintéticos útiles para hueso, músculo esquelético o tejido cardiovascular ingeniería.⁶⁵

Hidrogeles, que no son una categoría material por sí misma, puede estar hecho de varios materiales naturales, como colágeno, fibrina, proteoglicanos y ácido hialurónico, pero puede también se sintetiza a partir de polietilenglicol o moléculas de péptidos autoensamblantes. Los hidrogeles ofrecen una alta biocompatibilidad, agua similar a los tejidos contenido, propiedades viscoelásticas ajustables y la posibilidad de inyección y gelificación in situ.⁶⁵

También se utilizan injertos óseos como andamio, por ejemplo, el Bio-oss (hueso bovino) en combinación con las PDSLC utilizado para defectos periodontales en un estudio realizado por Chen y col.⁴⁹

Las células se pueden sembrar en el andamio y cultivado in vitro para generar el tejido deseado antes trasplante que se le llama ingeniería de tejidos basada en células. Y tenemos un diferente enfoque que es el diseño de materiales



para el trasplante de un sistema libre de células, que, debido a una combinación de moléculas de señalización incorporadas en el andamio, inducir la búsqueda de células madre residentes en el respectivo tejidos, y promover su diferenciación para apoyar la regeneración y esto se puede denominar ingeniería de tejidos sin células, este último enfoque es especialmente atractivo debido a un manejo más fácil proceso que elimina los problemas asociados con el uso de células madre.⁶⁵

4.4 Técnica quirúrgica

La primera fase del tratamiento consiste en controlar la causa de la enfermedad, con el objetivo de detener el proceso de destrucción del tejido. Esto se denomina fase etiológica, higiénica o relacionada con la causa.³

Una vez que se controla la causa, se considera la corrección de las consecuencias provocadas por la enfermedad. Esta fase, llamada fase correctiva o quirúrgica, se centra en el tratamiento de la bolsa periodontal y los problemas mucogingivales, con el objetivo final de restablecer una relación degenerativa-dental de la manera más favorable posible, con el objetivo de facilitar el control higiénico del paciente.³

El tratamiento quirúrgico

Sasvehalli y col. realizaron un estudio que abarcó del noviembre del 2015 hasta abril del 2017, en el cual consistió en seleccionar pacientes de ambos sexos de 30 a 50 años diagnosticados con periodontitis.¹⁷

Como tal la técnica quirúrgica fue la siguiente:

Se realizó un colgajo con preservación de papila modificada, se seleccionó en función del ancho de la papila interdental. La elevo el colgajo para permitir la exposición del defecto y el cuidado desbridamiento de la superficie de la raíz. Desbridamiento completo de se realizó el defecto intraóseo y luego se extrajo



diente designado ya sea por impactación o por razones no funcionales.¹⁷

Se retiró cuidadosamente el ligamento periodontal de las raíces del molar extraído, utilizando una cureta estéril y se mezclaron con una esponja de gelatina (Abgel), para así formar una masa transferible que se colocó posteriormente en el defecto periodontal y se condensó suavemente.

Se apretó el nudo presuturado y se aplicó un apósito periodontal.

Se dieron instrucciones postoperatorias y sutura la eliminación se realizó después de 10 días.¹⁷

Un día antes de la cirugía se prescribieron 500 mg amoxicilina 2 cápsulas por día y continuó durante 5 días, aceclofenaco 100 mg, dos veces al día durante 3-5 días fue prescrito de igual manera.

El desbridamiento supragingival se realizó una vez en 3 meses durante el período de seguimiento de 12 meses.¹⁷

Los resultados del estudio entre 28 pacientes, 6 hombres y 8 mujeres fueron:

- Hubo una notable disminución de placa y sangrado gingival desde el inicio hasta el final del estudio, donde se comparó el grupo que sometido a la colocación de PDLSC y curetaje abierto y el grupo control que solo se trató con curetaje abierto.
- Dentro de los grupos, la posición del margen gingival no mostrar cualquier cambio significativo desde el inicio hasta el estudio diferente intervalos.
- Se mostró una reducción significativa de la profundidad de sondaje en el grupo con aplicación de PDLSC.
- La unión cemento-esmalte a la cresta ósea alveolar la medición fue mayor en los grupos con PDLSC.
- A los 6, 9 y 12 meses, el grupo con aplicación PDLSC mostró una mejora significativa en el área del defecto resolución del 30% al 51%

desde el inicio hasta los 12 meses, en comparación con el grupo control que obtuvo 11% a 15%.¹⁷

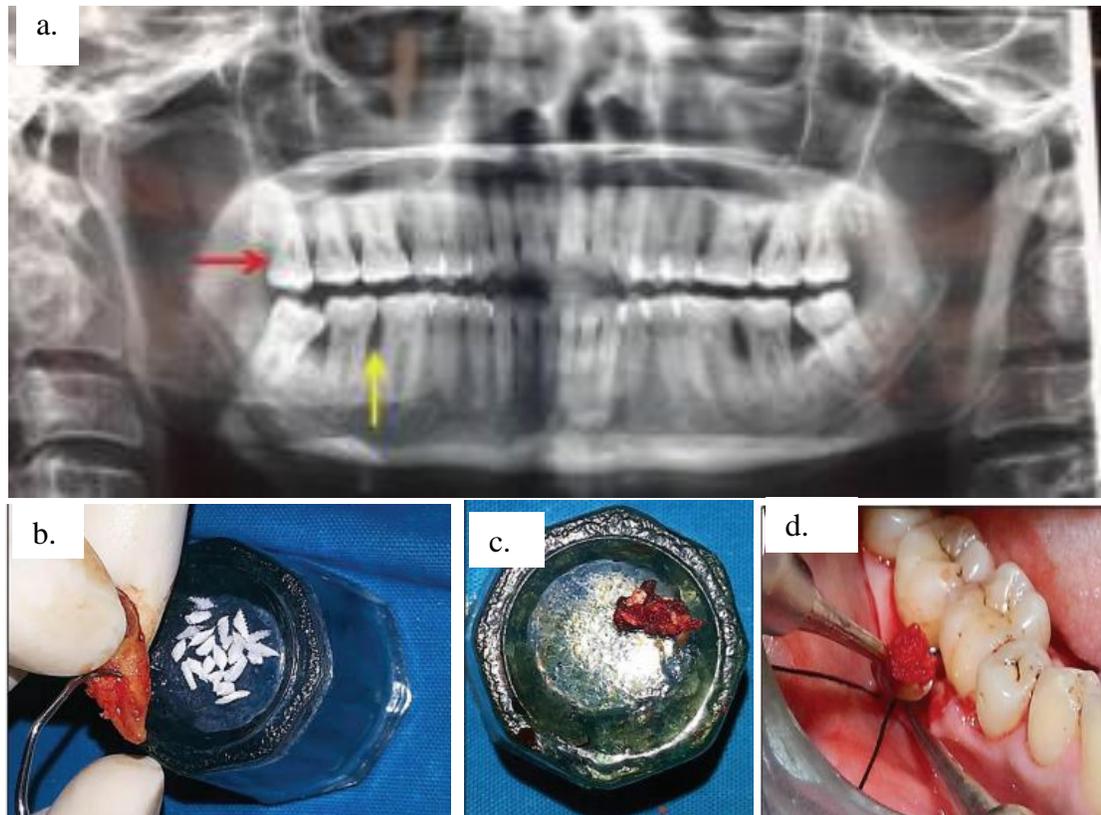


Figura 11 a. Ortopantomografía que muestra el diente indicado para extracción con flecha roja y defecto intraóseo por flecha amarilla. b. Tejido blando adherente a la raíz de un tercer molar extraído, y la extracción de células madre del ligamento periodontal que se alberga el nicho y Abgel. c. Masa transferible. d. Transferencia del tejido cosechado al defecto. ¹⁷

Chen y col. realizaron un estudio con un total de 30 pacientes con periodontitis de 18 a 65 años, un grupo tratado con la implementación de Bio-oss (hueso bovino) en el defecto óseo sin células madre y el segundo grupo con la aplicación de Bio-oss (hueso bovino) con PDLSC, con seguimiento de 12 meses.⁴⁹

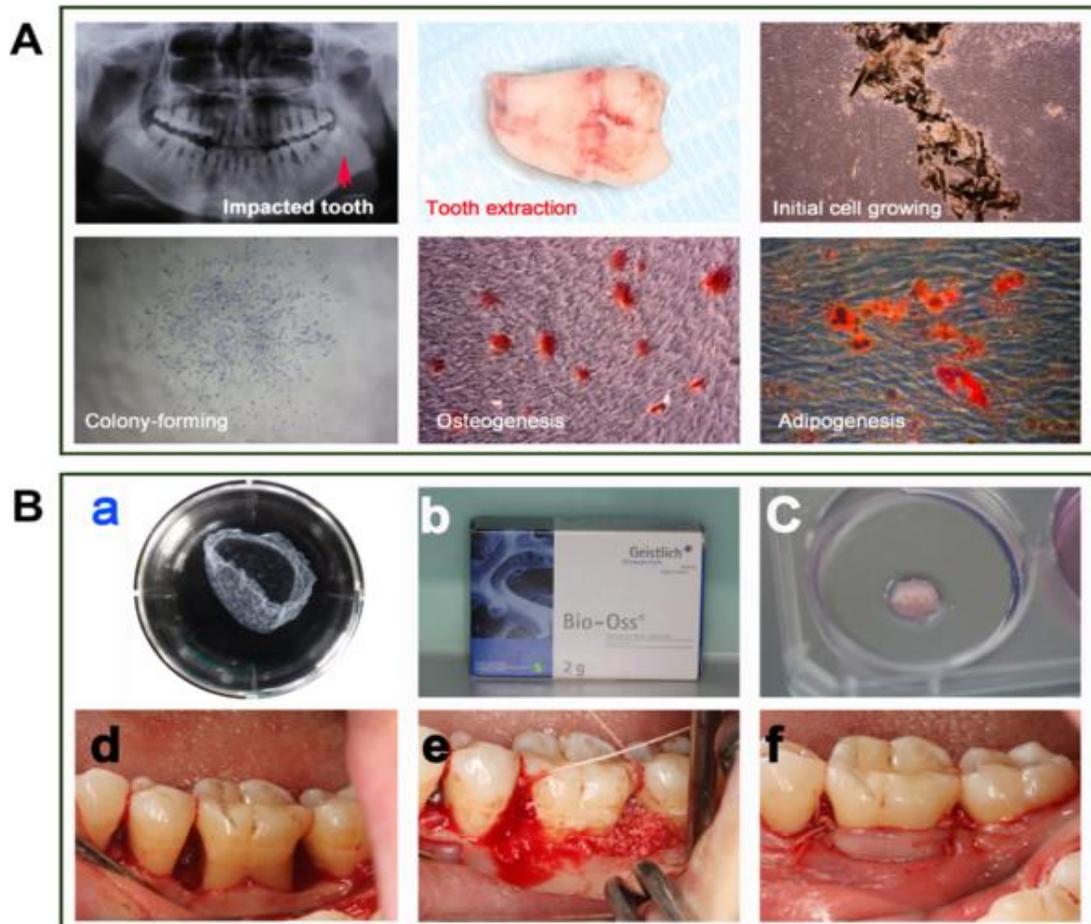


Figura 12 Aislamiento celular, caracterización y cirugía. A El tercer molar impactado de los pacientes se extrajo y se sometió a aislamiento celular y celular. Caracterización de la capacidad de formación de colonias celulares y la diferenciación osteogénica / adipogénica. B La producción de trasplantes de hoja celular / andamio y trasplante in vivo, que incluye: (a) formación de lámina celular; (b) Partículas Bio-Oss®; (c) trasplantes de hoja celular / andamio; (d) exposición de defectos óseos; (e) colocación de trasplantes; y (f) cierre del colgajo.⁴⁹

Los terceros molares de los pacientes en el grupo celular fueron extraído y sometido a aislamiento celular y trasplante, las células se evaluaron para

determinar la capacidad de formación de colonias celulares en cuanto a su diferenciación osteogénica / adipogénica.⁴⁹

Cada paciente recibió una preparación inicial estándar, que incluye instrucción de higiene oral y fase uno antes del tratamiento quirúrgico, para minimizar el potencial bacteriano.⁴⁹

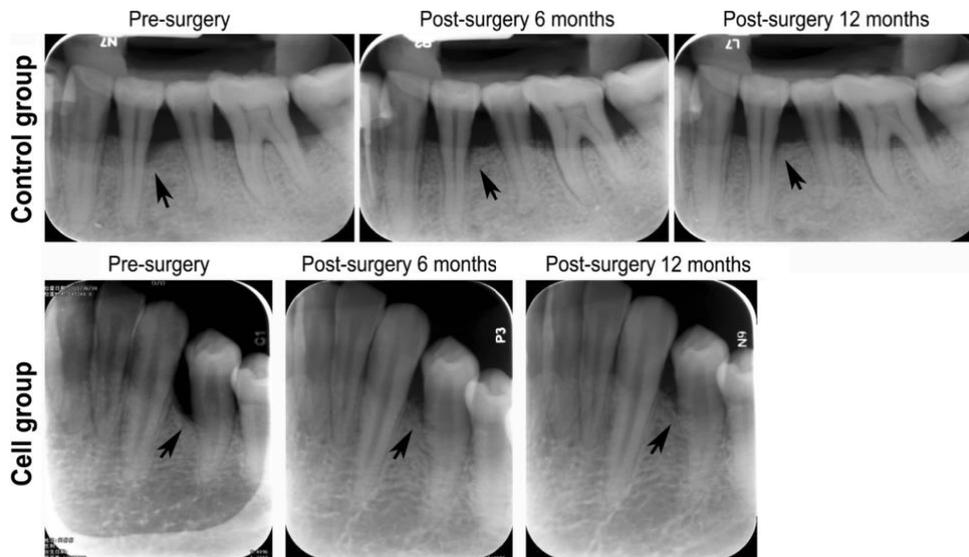


Figura 13 La evidencia radiográfica de la altura del hueso aumenta en el grupo de control y el grupo de células (las puntas de flecha negras apuntan a sitios de hueso defecto en cada radiografía).⁴⁹

La tercera fase del tratamiento periodontal, también llamada fase de mantenimiento, o tratamiento de soporte periodontal.³

4.5 Indicaciones y limitaciones clínicas

Las principales indicaciones clínicas para la regeneración tisular, actualmente se limitan a defectos intraóseos de 2 y 3 paredes, o a lesiones en furcaciones grado II. Por lo que se busca intensamente ampliar las capacidades celulares para la regeneración y mejorar las indicaciones para aplicar principios de ingeniería tisular a los tejidos afectados por una periodontitis.²

Limitaciones clínicas

La edad del donante también afecta a las células madre. Los PDLSC obtenidos de donantes de edad tenían menos capacidad regenerativa en comparación con los de donantes jóvenes.¹⁸

Las *Porphyromonas gingivalis* (el principal patógeno de la periodontitis crónica) inhibió severamente la diferenciación osteogénica por lo que es una gran limitación para eficacia de la regeneración tisular, se debe realizar un tratamiento integral para tener resultados a largo plazo.¹⁸

4.6 Éxito del tratamiento y resultados a largo plazo

En el estudio previamente mencionado de Sasvehalli y col. donde era un estudio entre el 2015 y 2017 con pacientes de ambos sexos del grupo de edad de 30 a 50 años diagnosticados con periodontitis, en el que consistía en tratar a un grupo con curetaje abierto y la otra parte del grupo con curetaje abierto y colocación de PDLSC de manera directa los resultados se calcularon a las 3, 6, 9 y 12 meses después del tratamiento se encontró lo siguiente:

	Índice de placa y sangrado	Relleno del defecto	Profundidad de sondaje	Nivel de inserción clínica	Altura ósea
Curetaje abierto + células madre	Disminuyó significativamente	50%	28.4%	45%	24% al 28%
Curetaje abierto	Permaneció como el inicio del tratamiento	11%	9.2%	25%	9%

Tabla 2 Evolución de 28 pacientes, 6 hombres y 8 mujeres en cada grupo a los 12 meses después del tratamiento.¹⁷

Dogan y col. informaron una mayor regeneración periodontal en defectos de furca de Clase II sembrados con células derivadas de ligamentos periodontales en comparación con defectos de control. Específicamente, encontraron que el área media del defecto lleno de hueso nuevo era el 51.2% del área del defecto en los defectos que recibieron las células derivadas del ligamento periodontal en comparación con el 32.9% del área del defecto en los defectos de control. Se descubrió que la nueva formación de tejido conectivo y cemento cubre el 75.5% de la superficie radicular desnuda en los animales que reciben células regenerativas derivadas del ligamento periodontal en comparación con el 71.7% en los animales de control.⁶⁶

En el día 14, se observó un mayor grado de formación de tejido óseo y cementogenesis, con inserción de fibra, en defectos tratados con Gelfoam "+ PDLSC en comparación con otros grupos. Sin tratamiento los defectos se rellenaban comúnmente con tejido fibroso con un mínimo de tejido óseo nuevo formación, observada principalmente en los bordes de la herida sin evidencia de cementogenesis en curso.³⁸

La presencia de células similares a osteoblastos que recubren la matriz orgánica, células similares a osteocitos atrapadas en lagunas de estructuras mineralizadas recién formadas y células de revestimiento similares a cementoblastos en superficies dentinales y de cemento expuestas, se observaron en animales tratados con espuma de gel "+ PDLSC. Capa mineralizada recién formada en la superficie radicular desnuda apareció celular y fue continuo con el de las capas superficiales de cemento adyacentes no lesionadas. A diferencia de la mayoría de los especímenes evaluados el día 7, la unión del tejido conectivo apareció principalmente unida a la superficie



radicular cortada. Sin embargo, las fibras de colágeno permanecieron en gran medida desorganizadas, con la mayoría paralelamente orientada a la superficie radicular cortada, en notable contraste con el Sharpey preexistente.³⁸



Conclusiones

Con base a los estudios realizados sustentan la efectividad en el tratamiento de defectos óseos causados principalmente por enfermedad periodontal utilizando PDLSC tanto en animales como en humanos.

Principalmente se ha experimentado con PDLSC autólogas pero una opción disponible y que todavía está en investigación serían las PDLSC aplicadas de forma alogénica ya que con enfermedad periodontal llega a afectar el potencial de células madre.

La terapia regenerativa será una gran alternativa de tratamiento, pero se tiene que estandarizar tanto la técnica quirúrgica, el cultivo y el mecanismo apropiado para cada paciente. Se tienen que diseñar dispositivos de entrega apropiados; comprender la inmunogenicidad y las propiedades inmunorreguladoras de estas células; determinar si las células alogénicas se pueden usar de forma segura; definir qué tejidos pueden proporcionar las células donantes más apropiadas; idear medios para controlar el proceso regenerativo general; y costo-beneficio / efectividad.

El objetivo es continuar el trabajo en el campo periodontal, con los diferentes instrumentos que tenemos, gracias a la biotecnología, para obtener la regeneración total de tejidos periodontales perdidos, con el fin de recrear de manera predecible y reproducible una anatomía periodontal real.

La evidencia confirma que a partir de estudios realizados en animales de experimentación y en humanos, estas células pueden ser aplicadas no solo en periodoncia sino también en endodoncia, cirugía, regeneración maxilar y mandibular, siendo necesario continuar la experimentación con células madre para ampliar las áreas de aplicación de estas.



Actualmente se sigue investigando la efectividad de las células madre para determinar si es una buena opción de tratamiento, por la cuestión de costo de cultivo y saber si será un éxito en todos los casos. Es una técnica que ha generado resultados satisfactorios, pero se podría más adelante comparar con otras técnicas previamente utilizadas como la regeneración tisular guía.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carini F. Menchini Fabris Gb. Biagi E. Salvade' A, Sbordone L, Baldoni Mg. Estudio experimental sobre la utilización de células madre humanas en la terapia de los defectos periodontales: resultados preliminares. *Avances en periodoncia*. 2011; 23(2): 97-107.
2. Afrashtehfara Kelvin I., Zerónb Agustín. Potencial de regeneración periodontal por medio de células progenitoras obtenidas del ligamento periodontal. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2011; 55(4): 4-9.
3. Alpiste Illueca F, Buitrago Vera P, Grado Cabanilles P., Fuenmayor Fernandez V., Gil Loscos F.J. Periodontal regeneration in clinical practice. *Med oral patol oral cir bucal*. 2006: 382-392.
4. Sanguino D, Bolaños J.C. Regeneración de tejidos orales mediante células madre. *Gaceta Dental*. 2011: 94-114.
5. Franco Torresani. *Implantología*. Italia : 20/09/2019 Disponible en: <https://www.studiotorresani.com/implantologia>
6. Jucht D, Rujano R, Romero M, Rondón L. Utilización de células madre en el ámbito odontológico. revisión de la literatura. *Acta bioclínica*. 2014: 101-123.
7. González Orta L, Font Rytzner A. Nova García J. Investigación con células madre de origen dentario. *Gaceta Dental*. 2011; 118-129.
8. Lidyce Q., Cira C. Células madre: una revolución en la medicina regenerativa. *MEDISASN*. 2017;21(5):574.
9. Mata Miranda M., Vázquez J., Sánchez V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Medigrafic*. 2013; 27(3): 194-199.
10. Harrison. *Principios de Medicina Interna*, 18ª Edición. McGraw Hill Interamericana de España 2005; 89-101.



11. Gomes Paz A., Maghaireh H., Guido Mangano F. Stem Cells in Dentistry: Types of Intra- and Extraoral Tissue-Derived Stem Cells and Clinical Applications. Hindawi. 2018 ; 1 – 14.
12. Tipos de células. Architecture : 25/09/2019 Disponible en: <https://slubne-suknie.info/?n=tipos+de+celulas>
13. Hernan Dario. Células madre del concepto a la práctica médica. Colombia : 25/09/2019 Disponible en: <https://www.studocu.com/es/document/universidad-autonoma-de-bucaramanga/anatomofisiologia-general/apuntes/celulas-madre-del-concepto-a-la-practica-medica/5309343/view>
14. Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cell from mouse fibroblasts by four transcription factors. Cell Prolif. 2008 ; 41 : 51-6.
15. Tada, S., Kitajima, T., and Ito, Y. Design and synthesis of binding growth factors. Int. Journal Molecular Science. 2012 ; 13 : 6053–6072.
16. Dennis D., Mooney D. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science. 2009; 324(5935): 1673–1677.
17. Sasvehalli Shalini H., Laxman Vandana K., Direct application of autologous periodontal ligament stem cell niche in treatment of periodontal osseous defects: A randomized controlled trial. Wolters Kluwer – Medknow. 2018; 22(6): 503-512.
18. Wenjun Z., Liang M. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects. Hindawi. 2015 ; 1-7.
19. Castro Y. Avances en regeneración dentaria y periodontal. Visión dental. 2015; 18(1): 204-213.
20. Wang P., Wang Y., Tang W. Bone Morphogenetic Protein-9 Enhances Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells via the JNK Pathway. Plos one. 2016 ; 1-21.



21. Hakki S., Bozhurt B. Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Society for biomaterials. 2013 ; 1-12.
22. Correa M., Rengifo C. Mecanismos moleculares implicados en la destrucción ósea en la periodontitis. Revisión de la literatura. Revista Clínica de Periodoncia Implantología Rehabilitación Oral. 2013; 6(3): 142-147.
23. Rabelo Amorim B., Sallum E.A., Zaffalon Casati M., Gonzales Silverio Ruiz K., Correa Viana Casarin R., Rosamilia Kantovitz K., Nociti junior F.H. Mesenchymal stem cells in periodontics: new perspectives. Rev Gaúch Odontol. 2017; 65(3): 254-259.
24. Trejo Iriarte C.G., Ramírez Ramírez O., Muñoz García A., Verdín Terán S.L., Gómez Clavel J. Isolation of periodontal ligament stem cells from extracted premolars. Revista Odontológica Mexicana. 2017; 21(1): 12-20.
25. Gandia C., Arminan A., Garcia J.M., Iledo´ E., Ruiz A., Sanchez-Torrijos J., c Paya´ R. Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction. AlphaMed Press. 2008; 26: 638–645.
26. Huang G., Gronthos S., Shi S. Mesenchymal Stem Cells derived from dental Tissues vs. those from Other Sources : their Biology and Role in regenerative Medicine. J Dent Res. 2009; 88(9):792-806.
27. Nam H., Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental Pulp. Elsevier. 2009; 386 (2009) 135–139.
28. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. IntEndod J 2009; 42:955-62.
29. Torres L, Marimon M, Morejon M, Camacho R, Leon L. Autotransplante de células madre adultas en defecto óseo de rama mandibular por quiste dentiger. Rev Ciencias Médicas. 2011; 15(4): 27-32.



30. D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A 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.
31. Guadarrama Plata, Guadarrama Quiroz L., Robles Bermeo N. Aplicaciones odontológicas de las células madre pulpares de dientes temporales y permanentes. Revisión de estudios in vivo. *Revista ADM.* 2018; 75 (3): 127-134.
32. Céspedes DI, Perona M. Futuro de la odontología restauradora. *Rev Estomatol Herediana.* 2010; 20(1): 44-49.
33. Dean R. The Periodontal Ligament: Development, Anatomy and Function. *OHDM.* 2016; 16(6): 1-7.
34. Iwasaki Kengo. Keiko Akazawa, Nagata Mizuki, Komaki Motohiro, Honda Izumi, Morioka Chikako, Yokoyama Naoki, Ayame Hirohito, Yamaki Kazumasa, Tanaka Yuichi, Kimura Tsuyoshi, Kishida Akio, Watabe Tetsuro, Morita Ikuo. The fate of transplanted periodontal ligament stem cells in surgically created periodontal defects in rats. *International Journal of molecular sciences.* 2019; 20(192): 1-15.
35. Gothi R., Sangwan N., Kaushik A., Sikka N. Periodontal Ligament Stem Cells-The Regeneration Front. *Dentistry.* 2015 ; 5(1): 1-7.
36. Morrobel M. Periodoncia II: El cemento. República Dominicana. 26/09/2019. Disponible en: <http://embriologiainfo.blogspot.com/2012/04/periodocio-ii-el-cemento.html>
37. Ding G, Liu Y, Wang W et al. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells* 2010 ;28 :1829–1838.
38. Han J., Menicanin D., Marino V., Ge S., Mrozik K., Gronthos S., Bartold P.M. Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model. *Journal of periodontal research.* 2014; 49: 333-345.



39. Childs R., Hede K. Tipos de trasplantes de células madre para el tratamiento del cáncer. American Cancer Society. 2015: 1-15.
40. Bright R., Hynes K., Gronthos S., Bartold PM. Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review. Journal of periodontal research. 2015; 160-172.
41. Miranda R., Galvan J. Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales. Revista Cubana de Hematol. 2015;31(1):20-31.
42. Gao F, Chiu S, Motan D, Zhang Z, Chen L, Ji H, Tse H, Fu Q, Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. Cell Death and Disease 2016 ; 7, e2062.
43. Wang L, Zhao Y, Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration. J Dent Res. 2012 ; 91(11):1003–10.
44. Machado C, Telles P, Nascimento I. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. Rev Bras Hematol hemoter. 2013; 35(1):62–7.
45. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. Trends Mol Med. 2012 ; 18(2):128–34.
46. Yi T & Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. Arch pharm res. 2012 ; 35(2):213–21.
47. Franco L., Restrepo L. Células madre mesenquimales: una alternativa para la regeneración ósea. Revista nacional de odontología. 2012; 8(15): 79–86.
48. Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, et al. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: A report of 3 cases. Oral Dis 2010; 16:20-8.
49. Chen FM, Gao LN, Tian BM, Zhang XY, Zhang YJ, Dong GY, et al. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous



- periodontal ligament stem cells: A randomized clinical trial. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7:33.
50. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res.* 2007 ;10 :149-60.
51. Sanhuenza C., Sanhueza S. Células madre mesenquimales orales: Estado del arte en odontología. *Avances en odontoesromatología.* 2016; 32(2): 97-105.
52. Vandana KL., Haneet Ryana., Priyanka Jairaj D. Autologous periodontal stem cell assistance in periodontal regeneration technique (SAI-PRT) in the treatment of periodontal intrabony defects: A case report with one-year follow-up. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects.* 2017; 11(2): 123-126.
53. Seo, B.M., et al., Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004; 364(9429): 149-55.
54. Seon S., Oh Kim S. Seung K. In Vitro and In Vivo Characteristics of Stem Cells Derived from the Periodontal Ligament of Human Deciduous and Permanent Teeth. *Mary Ann.* 2012 ; 18(9) : 2040-2051.
55. Graciano C., Perez J. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista digital universitaria.* 2005; 6(11): 3-16.
56. Seo M., Miura M. Recovery os stem cells from crypreserved periodonatal ligament. *Research reports.* 2005; 84(10): 907-912.
57. Camejo S., Merentes D. Establishment of culture, colony forming efficiency and cell proloferation os mesenchymal cella of human dental pulp. *Acta odontológica venezolana.* 2013; 51(4): 1-16.
58. Pietrasanta L., Bilderling C. Tópicos en biofísica molecular. 2do ctr. 2013; 1-9.
59. Arbos A., Nicolau F., Qetglas M. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un



- programa altruista de donación de sangre de cordón. Elsevier Dyma. 2013; 32(1): 3–11.
60. Marino S., Staines K., Brown G. Models of ex vivo explant cultures : applications in bone research. Bone Key Reports. 2016 ; 808 : 1-18.
61. Rodríguez JP., González M., Ríos S. Cytoskeletal organization os human mesenchymal stem cells(MSC) changes during their osteogenic differentiation. Journal of celular biochemistry. 2004; 93: 721-731.
62. Xu J., Wang W., Kapila Y. Multiple differentiation of STRO-1/CD146 PDL mesenchymal progenitor cells. Mary Ann. 2009 ; 18(3) : 487-496.
63. Pineda C., Londoño C. Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. Revista Ingeniería Biomédica. 2009; 3(5): 58-65.
64. González G. Cultivos celulares. Células madre y regeneración ósea. Biotecnología. 2012; 4: 223-238.
65. Proksch S., Galler K. Scaffol Materials and dental stem cells in dental tissue regeneration. Springer Cross mark. 2018 ; 1-14.
66. Dogan A., Ozdemir A., Kubar A. Assesment of periodontal healing by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in artificial furcation defects in a dog. May Ann. 2002; 8(2): 273-282.
67. Kim H., Kim K., Koo K. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model. Journal Periodontal. 2009 ; 80(11) : 1815-1823.