



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

REGENERACIÓN CELULAR DEL TEJIDO PULPAR
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE.
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

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:

JOSELYN SALDIVAR REYES

TUTOR: Esp. JUAN IGNACIO CORTÉS RAMÍREZ

ASESOR: Esp. ANA GUADALUPE ONTIVEROS GRANADOS



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.

DEDICATORIAS

Papá y mamá:

Gracias por amarme y apoyarme en cada paso que he dado durante esta etapa de mi vida, porque gracias a su confianza en toda mi trayectoria de estudiante, ahora estoy logrando mi sueño que sin ustedes no podría continuar. Mamá, te agradezco por soportar cada desvelo durante estos 5 años, siempre estuviste ahí para alentarme en cada paso que daba, no me dejabas rendirme. Papá, te agradezco por todo el apoyo que me has brindado, por tus consejos durante este proceso.

A mi familia, les agradezco también por su confianza y el apoyo incondicional como mis pacientes.

A mis amigos, que sin ellos estos 5 años no hubieran sido divertidos, que cada día me dejaban algo nuevo que aprender de ellos. Gracias por formar parte de mi vida a todos.

Le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por cada experiencia vivida dentro del campus y por el conocimiento brindado de cada uno de mis profesores, me siento muy afortunada de haber formado parte de esta universidad.

También agradezco a mi tutor Juan Ignacio Cortés Ramírez y a mi asesora Ana Guadalupe Ontiveros Granados por su tiempo invertido y el incondicional apoyo para realizar este proyecto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO I ANTECEDENTES	7
CAPÍTULO II ODONTOGÉNESIS	9
2.1 Morfogenesis del órgano dentario.....	10
2.1.1 Estadio de brote.....	11
2.1.2 Estadio de casquete.....	12
2.1.3 Estadio de campana.....	13
2.1.3.1 Epitelio externo.....	15
2.1.3.2 Retículo estrellado.....	15
2.1.3.3 Estrato intermedio.....	15
2.1.3.4 Epitelio interno.....	16
2.1.3.5 Papila dentaria.....	17
2.1.3.6 Saco dentario.....	18
2.1.4 Estadio terminal.....	19
2.2 Desarrollo y formación del patrón radicular.....	20
CAPÍTULO III PULPA	22
3.1 Componentes estructurales.....	23
3.1.1 Odontoblastos.....	23
3.1.2 Fibroblastos.....	24
3.1.3 Células pulpares de reserva.....	25
3.1.4 Células dendríticas.....	26
3.1.5 Matriz extracelular.....	26
3.2 Funciones.....	27
3.2.1 Inductora.....	27
3.2.2 Formativa.....	27
3.2.3 Nutritiva.....	28
3.2.4 Sensitiva.....	28
3.2.5 Reparadora.....	28

CAPÍTULO IV CÉLULAS MADRE	29
4.1 Definición.....	29
4.2 Clasificación.....	29
4.2.1 Según su capacidad de diferenciación.....	29
4.2.1.1 Totipotentes.....	29
4.2.1.2 Pluripotentes.....	29
4.2.1.3 Multipotentes.....	29
4.2.1.4 Unipotentes.....	30
4.2.2 Según su lugar de origen.....	30
4.2.2.1 Células madre embrionarias.....	30
4.2.2.2 Células madre adultas.....	30
4.3 Células madre dentales (DSC).....	30
4.3.1 Células madre de dientes exfoliados (SHED).....	31
4.3.2 Células madre de la pulpa dental (DPSC).....	31
4.3.3 Células madre del ligamento periodontal (PDLSC).....	31
4.3.4 Células madre de la papila apical (SCAP).....	32
4.3.5 Células madre de los folículos dentales (DFSC).....	32
4.3.6 Células madre de la médula ósea (BMSC).....	33
 CAPÍTULO V INGENIERIA TISULAR EN ENDODONCIA	 34
5.1 Triada de bioingeniería	34
5.1.1 Factores de crecimiento.....	34
5.1.2 Andamios.....	36
5.1.3 Células madre.....	37
5.2 Trasplante y rastreo celular.....	37
5.3 Protocolo de regeneración endodóncica.....	39
5.4 Procedimiento de tratamiento para endodoncia regenerativa.....	43

CAPÍTULO VI OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE	45
6.1 Nichos de células madre.....	45
6.2 Epigenética en la pulpa dental.....	45
6.3 Matriz de crecimiento.....	46
6.4 Aislamiento de células madre.....	46
6.5 Método de digestión enzimática.....	47
6.6 Medios de cultivo celular para células madre de la pulpa dental.....	48
6.7 Criopreservación.....	48
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

INTRODUCCIÓN

Actualmente las células madre han sido un tema innovador en el campo de la medicina moderna; debido a su alta capacidad de diferenciarse en distintos tipos de células especializadas. Este avance ha permitido mejorar los procedimientos restauradores en odontología

Recuperando estructuras perdidas mediante el uso de la ingeniería tisular, gracias a sus múltiples enfoques podría ser reemplazado el tejido dañado por un material inerte que le permite al diente recuperar sus funciones como: la estética, masticación, fonación, deglución y lo más importante devolverle la sensibilidad y vitalidad del diente.¹

La terapia regenerativa se ha vuelto una alternativa de tratamiento médico, puesto que cubre con grandes avances en la ciencia, ya que podría ser capaz de regenerar las estructuras perdidas, basándose en su triada de bioingeniería (células madre, factores de crecimiento y andamios).²

Teniendo como objetivo general determinar el método que se va a utilizar para el reemplazo del tejido dañado que sea biológicamente funcional y vital. Para esto, se tendrá que establecer cuál de los métodos existentes es más fiable para precisar la regeneración del tejido pulpar.³

Las células madre son una subpoblación de células indiferenciadas con alta capacidad de autorrenovación, según su capacidad de diferenciación se clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes, también según su lugar de origen se dividen en células madre embrionarias y células madre adultas. Recientemente se han aislado numerosos tipos de células madre derivadas del tejido dental humano, incluyendo células madre de la pulpa dental, células madre del folículo dental, células madre del ligamento periodontal, células madre de la papila apical, células madre de la médula ósea.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

El inicio de esta investigación se le denomina esperanza terapéutica del nuevo siglo comienza desde el descubrimiento de experimentos con trasplante y reparación de órganos por el cirujano innovador Alexis Carrel, quién llevó al campo de la cirugía avances de cultivos celulares. En 1912 puso parte del corazón de un embrión de pollo en un medio nutriente fresco, y encontró que cada 48 horas el tejido aumentaba su tamaño, sobreviviendo por 34 años, este antecedente marco nuevas alternativas hacia la medicina regenerativa. Sin embargo, fue en 1960 cuando McCulloch y Till estudiaron los efectos de la radiación en la hematopoyesis de la médula ósea, realizaron una serie de experimentos que involucraron la inyección de células de la médula ósea en ratones irradiados, observando que pequeños nódulos habían crecido en los bazo de los ratones, en proporción al número de células de la médula ósea inyectadas. Posterior a esos estudios, en 1961, describieron cómo estas células daban origen a colonias hematopoyéticas en hígado, dando las bases para su teoría de células madre. En 1963, estos investigadores en colaboración con Lou Siminovitch, obtuvieron pruebas de que estas mismas células de la médula ósea fueron capaces de autorrenovarse, un aspecto crucial para la definición funcional de las células madre.⁴

En 1981, los científicos británicos Evans y Kaufman fueron los primeros en aislar exitosamente de la masa celular interna del blastocito células madre embrionarias (CME) de ratón y cultivarlas. A finales del siglo XX el científico alemán Ernst Haeckel y su equipo de investigación fusionaron los conceptos de filogenia y ontogenia para describir las *stammzelle* (stem cell), acuñándose el término de células madre, como un concepto para definir a las células primordiales que se diferencian en diversos tipos de células y en organismos multicelulares.

Los argumentos de Haeckel del desarrollo embrionario se basaron en la evidencia propia de sus observaciones. Oficialmente el término de células madre entró en el contexto científico cuando estas fueron utilizadas por los histoembriólogos Boveri y Haeckel, quienes describieron las características hereditarias, su pluripotencialidad y su autorrenovación de las células germinales.⁴

La revista Science en 1998 publicó que el profesor Thomson de la Universidad de Wisconsin había desarrollado la primera línea de células madre embrionarias humanas (HCME), derivadas exitosamente de la masa celular interna de un blastocisto producido por fertilización in vitro. “Esta línea celular debe ser usada en el desarrollo biológico humano, descubrimientos farmacológicos y en la medicina del trasplante”.¹

La información disponible en los estudios de regeneración hasta la fecha, indican que se debe aprender más acerca de las interacciones que se producen entre todas las células, factores de crecimiento, la proliferación y diferenciación de las células.⁵

CAPÍTULO II ODONTOGÉNESIS

Es el proceso de desarrollo dental que conduce a la formación de los elementos dentarios en el seno de los huesos maxilares. En el desarrollo de los órganos dentarios humanos aparecen sucesivamente dos clases de dientes: los dientes primarios (deciduos o de leche) y los dientes permanentes o definitivos. Ambos se originan de la misma manera y presentan una estructura histológica similar. Los dientes se desarrollan a partir de brotes epiteliales que, empiezan a formarse en la porción anterior de los maxilares y luego avanzan en dirección posterior. Las dos capas germinativas que participan en la formación de los dientes son: el epitelio ectodérmico, que origina el esmalte, y el ectomesénquima que origina los tejidos restantes (complejo dentinopulpar, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar). El fenómeno inductor es el esencial para el comienzo de la organogénesis dentaria. En la odontogénesis, el inductor desencadenante es ejercido por el ectomesénquima o mesénquima cefálico, denominado así porque son células derivadas de la cresta neural que han migrado hacia la región cefálica. Este ectomesénquima ejerce su acción inductora sobre el epitelio bucal, de origen ectodérmico, que reviste el estomodeo o cavidad bucal primitiva. La actividad inductora de la mesénquima ejercida por diversos factores químicos en las distintas fases del desarrollo dentario y la interrelación, entre el epitelio y las diferentes estructuras de origen ectomesenquimático, conducen hacia una interdependencia funcional entre ambos tejidos que es conocida con la denominación de interacción epitelio-mesénquima, mecanismo que constituye la base del proceso de formación de los dientes. En el desarrollo dentario, dicha interacción dará como resultado la determinación, diferenciación y organización de los tejidos dentales. En el proceso de desarrollo vamos a distinguir dos grandes fases: la morfogénesis o morfodiferenciación que consiste en el desarrollo y la formación de los patrones coronarios y radicular, como resultado de la división, el desplazamiento y la organización en distintas capas de las de las

poblaciones celulares, epiteliales y mesenquimatosas implicadas en el proceso y la histogénesis o histodiferenciación que conlleva la formación de los distintos tejidos dentarios: el esmalte, la dentina y la pulpa en los patrones previamente formados.⁶

2.1 Morfogénesis del órgano dentario

Desarrollo y formación del patrón coronario

El ciclo vital de los órganos dentarios comprende una serie de cambios químicos, morfológicos y funcionales que comienzan en la sexta semana de vida intrauterina (45 días aproximadamente) y que continúan a lo largo de toda la vida del diente. La primera manifestación consiste en la diferenciación de la lámina dental o listón dentario, a partir del ectodermo que tapiza la cavidad bucal primitiva o estomodeo. El epitelio ectodérmico bucal en este momento está constituido por dos capas: una superficial de células aplanadas y otra basal de células altas, conectadas al tejido conectivo embrionario o mesénquima por medio de la membrana basal, estructura importante para la diferenciación celular y la organogénesis dental. Las células basales de este epitelio bucal proliferan a todo lo largo del borde libre de los futuros maxilares, dando lugar a dos nuevas estructuras: la lámina vestibular y la lámina dentaria. Lámina vestibular: sus células proliferan dentro del ectomesénquima, aumentan rápidamente su volumen, degeneran y forman una hendidura que constituye el surco vestibular entre el carrillo y zona dentaria. Lámina dentaria: debido a una actividad proliferativa intensa y localizada en la octava semana de vida intrauterina, se forman en lugares específicos diez crecimientos epiteliales dentro del ectomesénquima de cada maxilar, en los sitios (predeterminados genéticamente) correspondientes a los 20 deciduos. De esta lámina, también se originan los treinta y dos gérmenes de la dentición permanente alrededor del quinto mes de gestación. Los primordios se sitúan por lingual o palatino en relación con los elementos primarios. Los molares se desarrollan por extensión distal de la lámina dental. El indicio del primer molar permanente existe ya en el cuarto mes de vida intrauterina. Los

molares segundo y tercero comienzan su desarrollo después del nacimiento, alrededor de los cuatro o cinco años. Los gérmenes dentarios siguen en su formación una serie de etapas que, de acuerdo a su morfología, se denominan: estadio de brote, estadio de casquete, estadio de campana y estadio de folículo dentario.⁶

2.1.1 Estadio de brote o yema dentaria

El periodo de iniciación y proliferación es breve y casi a la vez aparecen diez yemas o brotes en cada maxilar. Son engrosamientos de aspecto redondeado que surgen como resultado de la división mitótica de algunas células de la capa basal del epitelio en las que asienta el crecimiento potencial del diente. Estos serán los futuros órganos del esmalte que darán lugar al único tejido de naturaleza ectodérmica del diente, el esmalte. La estructura de estos brotes es simple, en la periferia se identifican células cilíndricas y en el interior son de aspecto poligonal con espacios intercelulares muy estrechos. Las células del ectomesénquima subyacente se encuentran condensadas por debajo del epitelio de revestimiento y alrededor del brote epitelial (futura papila dentaria). Desde el punto de vista histoquímico en las células intermedias del brote se detecta más actividad biosintética que en las basales. A dicho nivel existe acumulo de glucógeno, hecho que caracteriza a algunos epitelios en proliferación, como se puede observar en la figura 1. En las células más superficiales del brote pueden detectarse algunos signos de muerte celular o apoptosis.⁶



Figura 1. Estadio de brote o yema visto al microscopio. Tomada de Gómez M CA. Histología bucodental y embriología. 2da Edició. Argentina: Ed. Mèdica Panamericana; 2009. 210–234 p.

2.1.2 Estadio de casquete

La proliferación desigual del brote (novena semana) a expensas de sus caras laterales o bordes, determina una concavidad en su cara profunda por lo que adquiere el aspecto de un verdadero casquete. Su concavidad central encierra una pequeña porción del ectomesénquima que lo rodea; es la futura papila dentaria, que dará origen al complejo dentinopulpar. El tejido mesenquimatoso que se encuentra inmediatamente por fuera del casquete, rodeándolo casi en su totalidad, salvo en el pedículo (que une el órgano del esmalte con el epitelio originario o lámina dental) también se condensa volviéndose fibrilar y forma el saco dentario primitivo o folículo dental. El órgano del esmalte, la papila y el saco constituyen en conjunto el germen dentario. Al finalizar esta etapa comienza a insinuarse, en el epitelio interno del órgano del esmalte, un cúmulo de células de donde parte una prolongación celular llamada cuerda del esmalte, que determina en una muesca en el epitelio externo, conocida como el ombligo del esmalte. Estas estructuras son temporales, pues más tarde sufren una regresión o involución. El nudo del esmalte se considera centro regulador de la morfología dentaria a través de producción de factores que participan en la interrelación epitelio- mesénquima. En los dientes molares multicuspidos existen nudos de esmalte secundarios que regulan la morfogénesis de cada región cuspidada. Todas las nuestras estructuras que surgen en esta etapa, se pueden observar en la figura 2.

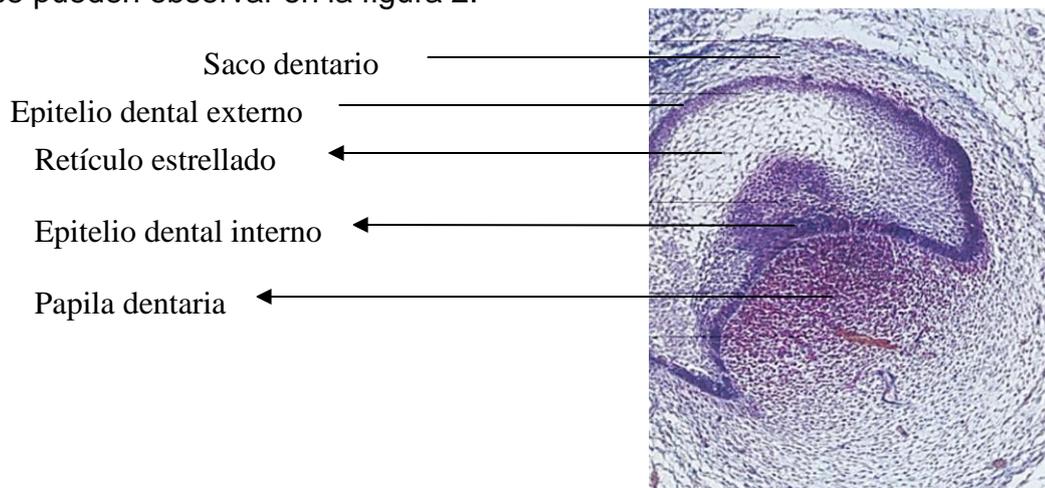


Figura 2. Estadio de casquete. Histología y embriología bucodental. Tomada de Gómez M C.A. Histología bucodental y embriología. 2da Edición. Argentina: Ed. Médica Panamericana; 2009. 210–234 p.

Tenemos en esta etapa de casquete tres estructuras embrionarias fundamentales para el desarrollo dentario:

1. Órgano del esmalte. Origen ectodermo.
 - Epitelio externo
 - Retículo estrellado
 - Epitelio interno

2. Esbozo de la papila dentaria
 - Origen: ectomesénquima

3. Esbozo de saco dentinario
 - Origen: ectomesénquima

Estas estructuras por cambios morfológicos, químicos y funcionales darán origen a todos los tejidos dentarios.⁶

2.1.3 Estadio de campana

Ocurre durante las catorce y dieciocho semanas de vida intrauterina. Se acentúa la invaginación del epitelio interno adquiriendo el aspecto característico de una campana. En este estadio es posible observar modificaciones estructurales e histoquímicas del órgano del esmalte, papila y saco dentinario respectivamente. El desarrollo del proceso permite considerar en el estadio de campana una etapa inicial y otra más avanzada, donde se hacen más evidentes la morfo e histodiferenciación. Órgano del esmalte: en la etapa inicial el órgano del esmalte presenta una nueva capa: el estrato intermedio, situada entre el retículo estrellado y el epitelio interno, estos estratos se pueden observar a detalle en la figura 3. La presencia de esta estructura celular en el órgano del esmalte es un órgano muy importante para realizar el diagnóstico histológico diferencial con la etapa anterior del casquete.⁶

En este periodo embrionario el órgano del esmalte está constituido por:

- a) Epitelio externo
- b) Retículo estrellado
- c) Estrato intermedio
- d) Epitelio interno

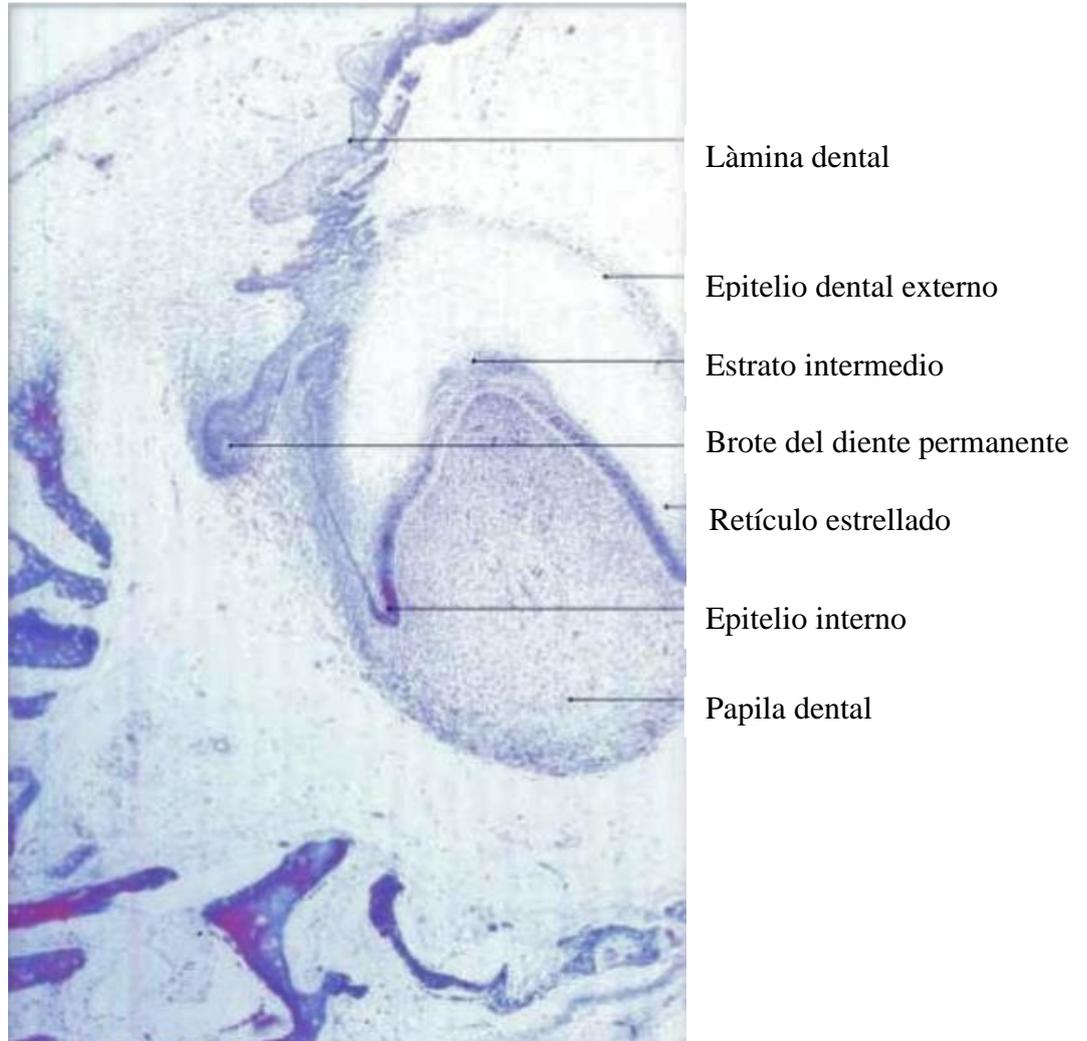


Figura 3. Estadio de campana. Histología y Embriología bucodental. Tomada de Gómez de Ferraris. Gómez M CA. Histología bucodental y embriología. 2da Edició. Argentina: Ed. Médica Panamericana; 2009. 210–234 p.

2.1.3.1 Epitelio externo

Las células cúbicas se han vuelto aplanadas tomando el aspecto de un epitelio plano simple. Al final de esta etapa el epitelio presenta pliegues debido a invaginaciones o brotes vasculares provenientes del saco dentario (capa interna), que aseguran la nutrición del órgano del esmalte, que como todo epitelio es avascular. La invasión vascular es más evidente en la fase previa al comienzo de la secreción del esmalte.⁶

2.1.3.2 Retículo estrellado

Es notable el aumento de espesor por el incremento de líquido intercelular, al avanzar el desarrollo su espesor se reduce a nivel de las cúspides o bordes incisales. En dichas zonas donde comienzan a depositarse las primeras laminillas de dentina, se corta la fuente de nutrientes del órgano del esmalte proveniente de la papila. Esta reducción del aporte nutricional ocurre en el momento en el que las células del epitelio interno están por segregar esmalte, por lo que hay una demanda aumentada de nutrientes para satisfacerla, el retículo estrellado, se adelgaza permitiendo un mayor flujo de elementos nutricionales desde los elementos sanguíneos del saco dentario hacia las células principales o ameloblastos (epitelio dental interno) que sintetizará la matriz del esmalte. La apoptosis en las células del retículo estrellado contribuye a la regresión de este.⁶

2.1.3.3 Estrato intermedio

Entre el epitelio y el retículo estrellado, aparecen varias capas de células planas; es el estrato intermedio. Este estrato es más evidente por el mayor número de capas celulares en el sitio que corresponde a las futuras cúspides o bordes incisales. En general, está formado por cuatro o cinco hileras de células planas con núcleos centrales alargados. Las relaciones intercelulares presentan desmosomas y estructuras de cierre hermético. Se han observado mitosis y debido a este hecho varios investigadores sugieren que algunos de sus elementos celulares puedan transformarse en ameloblastos. Las células del estrato intermedio en el

estadio de campana tienen marcada actividad enzimática fosfatasa alcalina positiva, mientras que las ameloblásticas carecen de esta enzima, por lo que se postula que el estrato intermedio participa indirectamente en la amelogénesis. Las células del estrato intermedio son también ricas en ATPasa dependiente del calcio.⁶

Las células planas del estrato intermedio mantienen relaciones intercelulares, a través de desmosomas, tanto con células del retículo, como los ameloblastos. Cada célula del estrato intermedio, al parecer está relacionada con seis ameloblastos. Al finalizar esta etapa de campana, cuando comienza la histogénesis o aposición de los tejidos duros dentarios (dentina, esmalte), el estrato se vincula estrechamente con los vasos sanguíneos provenientes del saco dentario, asegurando no solo la vitalidad de los ameloblastos, sino controlando el paso del aporte de calcio, del medio extracelular al esmalte en formación.⁶

2.1.3.4 Epitelio interno

Las células del epitelio interno o preameloblastos se diferencian en ameloblastos jóvenes, son células cilíndricas bajas y sus organoides no presentan aún en esta fase una orientación definida. En este periodo morfogénico, hay una condensación de fibras argirofílicas por debajo y adyacente al epitelio interno del órgano del esmalte (separándolo de la papila dentaria). Recibe el nombre de la lámina basal ameloblástica. In vitro la membrana basal es continua durante la diferenciación odontoblástica y el colágeno asociado tiene una función importante en el desarrollo dentario, pues la interferencia en su depósito por agregado de distintos agentes destructores del colágeno al medio de cultivo inhibe la morfogénesis dental. El colágeno tipo IV es el componente estructural más importante de esta membrana basal y la colagenasa tipo IV está también presente en la membrana basal. En este periodo se determina, la morfología de la corona por acción o señales específicas del ectomesénquima adyacente o papila dental sobre el epitelio interno del órgano dental. Ello conduce a que en esta capa celular se pliegue, dando lugar a la forma, número y distribución de las cúspides, según el tipo de elemento dentario que dará origen. El

patrón coronario se establece antes de comenzar la aposición o mineralización de los tejidos dentales. Al avanzar al estado de campana, los ameloblastos jóvenes ejercen su influencia inductora sobre la papila dentaria. Las células superficiales ectomesenquimáticas indiferenciadas (totipotentes) se diferencian en odontoblastos que comenzarán luego a tomar dentina. En la etapa de campana avanzada y antes de que los odontoblastos empiezan a sintetizar y secretar la matriz dentinaria, los ameloblastos jóvenes, que por citodiferenciación han adquirido el aspecto de células cilíndricas, experimentan un cambio de polaridad de sus organoides. Microscópicamente lo más evidente es la migración del núcleo de su localización central a la región distal de la célula próxima al estrato intermedio. Los ameloblastos adquieren todas las características de una célula secretora de proteínas, pero sin llevar a cabo alguna función. Permanecen inactivos hasta que los odontoblastos hayan secretado la primera capa de dentina, al final del estadio de campana los ameloblastos jóvenes se han transformado por citodiferenciación en ameloblastos secretores maduros. Las principales características citoquímicas de los ameloblastos secretores son las siguientes: en la etapa de campana ofrecen una marcada basofilia citoplasmática fácilmente evidente con azul de toluidina. Hay presencia de un alto contenido de ARN en los ameloblastos, al igual que en los odontoblastos mediante microscopia de fluorescencia cuando se utiliza naranja de acridina (que es un fluoro- cromo específico para la detección de ácidos nucleicos). El ADN flúórese de amarillo y el ARN de rojo. Con verde metil-tironina el ADN se tiñe de verde-azul y de color rojo el ARN citoplasmático.⁶

2.1.3.5 Papila dentaria

La diferenciación de los odontoblastos se realiza a partir de las células ectomesenquimáticas de la papila, situadas frente al epitelio dental interno, que evolucionan primero transformándose primero en preodontoblastos, luego en odontoblastos jóvenes, por último, en odontoblastos maduros o secretores. Los odontoblastos se encuentran formando una hilera de células semejantes a una especie de epitelio cilíndrico simple en la periferia de la papila, están separados por espacios intercelulares que a veces

contienen fibras reticulares de Von Korff e incluso capilares o fibras nerviosas. Los odontoblastos presentan las características ultraestructurales de una célula secretora de proteínas para exportación. Sintetizan las fibrillas colágenas tipo I (con pequeñas cantidades de colágeno tipo III) y los glicosaminoglicanos de la matriz orgánica de la dentina. Cuando se forma dentina, la porción de la papila se transforma en pulpa dentaria. La zona central de la papila se caracteriza ahora por presentar fibroblastos jóvenes con abundante sustancia fundamental, principalmente ácido hialurónico y condroitín sulfato responsable de su metracramasia. La inervación inicial es solamente de tipo sensorial, las fibras nerviosas autónomas están ausentes durante los estadios de brote y casquete. Con respecto a la irrigación, la agrupación de vasos sanguíneos penetra la papila en la etapa de casquete. A medida que avanza el desarrollo, los vasos se ubican en el lugar donde se formará la raíz o raíces.⁶

2.1.3.6 Saco dentario

En la etapa de campana es cuando más se pone de manifiesto su estructura. Está formado por dos capas: una interna y otra externa o superficial con abundantes fibras colágena y precolagenas se disponen en forma circular envolviendo al germen dentario en desarrollo. La colágena presente a este nivel es de tipo I y III. De la capa celular constituida por células mesenquimatosas indiferenciadas derivarán los componentes al periodonto de inserción: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Las células mesenquimatosas que se diferencian hacia hueso alveolar son células ricas en glucógeno. Tanto la inervación como la irrigación presentan dos variedades, una destinada al saco y otra destinada a la papila, donde los vasos y nervios atraviesan el saco para distribuirse por la misma. También en eseta etapa la lámina dentaria prolifera en su borde más profundo, que se transforma en un extremo libre situado por detrás con respecto al órgano del esmalte y forma el esbozo o brote del diente permanente.⁶

2.1.4 Estadio terminal

En esta etapa es cuando se identifica, en la zona de las futuras cúspides o borde incisal, la presencia del depósito de la matriz del esmalte sobre las capas de la dentina en desarrollo, estas etapas se pueden observar en la figura 4. La elaboración de matriz orgánica, a cargo de los odontoblastos para la dentina y los ameloblastos para el esmalte, es inmediatamente seguida por las fases iniciales de su mineralización. La membrana basal o futura unión amelodentinaria puede ser lisa o presentar ondulaciones festoneadas. En algunos sitios la membrana basal presenta soluciones de continuidad por donde se extienden algunas prolongaciones de los odontoblastos, que en el esmalte forman los husos adamantinos o los conductillos o túbulos dentinarios remanentes. El crecimiento aposicional del esmalte y dentina se realiza por el depósito de capas sucesivas de una matriz extracelular en forma regular y rítmica. Se alteran periodos de actividad y reposo a intervalos definidos. Una explicación adicional de la adhesión puede estar relacionada con la disposición de las fibras de colágena tipo I en la dentina, perpendiculares al borde amelodentinario en conexión con la fibronectina puede contribuir a la estabilidad entre la dentina y el esmalte, gracias al dominio adhesivo del colágeno sobre la molécula de fibronectina. Una vez formado el patrón coronario y comenzando el proceso de histogénesis dental mediante los mecanismos de dentinogénesis y amelogénesis, de forma centrifuga la primera y centrípeta la segunda, comienza el desarrollo y formación radicular. Cuando la corona se ha formado el órgano del esmalte se atrofia y constituye el epitelio dentario reducido, que sigue unido a la superficie del esmalte como una membrana delgada. Cuando el diente hace erupción algunas células del esmalte reducido de las paredes laterales de la corona se unen a la mucosa bucal y forman la fijación epitelial o epitelio de unión.

6

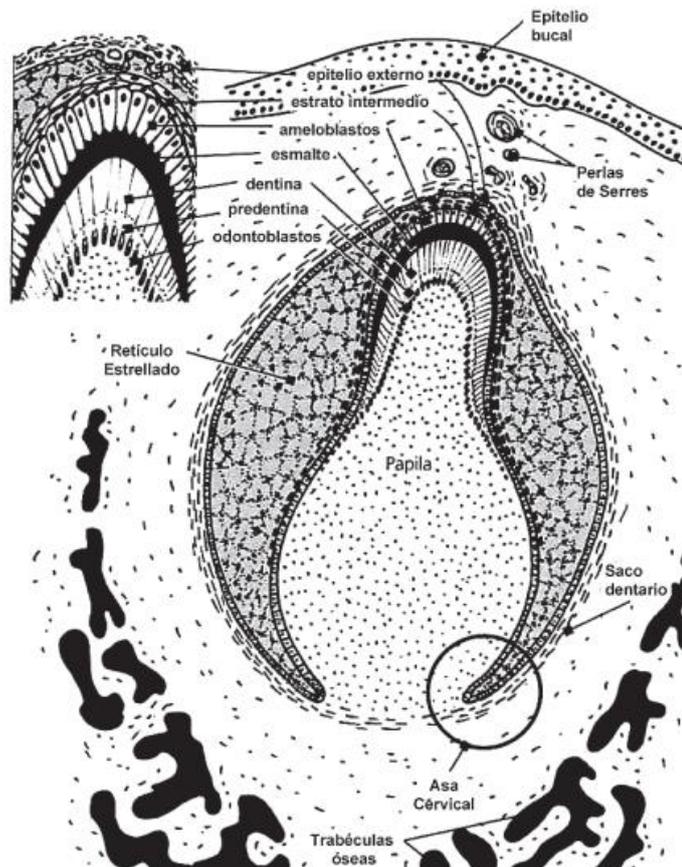


Figura 4. Estadio de folículo dental terminal o maduro. Tomada de Gómez M CA. Histología bucodental y embriología. 2da Edició. Argentina: Ed. Mèdica Panamericana; 2009. 210–234 p.

2.2. Desarrollo y formación del patrón radicular

En la formación de la raíz, la vaina epitelial de Hertwing desempeña un papel fundamental como inductora y modeladora de la raíz del diente. La vaina epitelial es una estructura que resulta de la fusión del epitelio interno y externo de órgano del esmalte sin la presencia del retículo estrellado a nivel del asa cervical o borde genético, En esta área que es la zona de transición entre ambos epitelios, las células mantienen un aspecto cuboidal. La vaina prolifera en profundidad en relación con el saco dentinario por su parte externa y con la papila dentaria internamente. En este momento las células muestran un alto contenido de ácidos nucleicos, relacionados con la división o mitosis celular. Al proliferar, la vaina induce a la papila para que se diferencien en la superficie de la mesénquima papilar, los odontoblastos radiculares.⁶

Cuando se deposita la primera capa de dentina radicular, la vaina de Hertwing pierde su continuidad, es decir, se fragmenta y forma los restos epiteliales de Malassez, que en el adulto persisten cercanos a la superficie radicular dentro del ligamento periodontal. Se ha sugerido que en un factor importante en el proceso de fragmentación de la vaina de Hertwing es la disminución rápida en la expresión de la molécula P-cadherina, relacionada con la adhesión celular. Si bien los restos epiteliales de Malassez no poseen ninguna función en la odontogénesis, son la fuente del revestimiento epitelial de los quistes radiculares.⁶

En síntesis, la elaboración de dentina por los odontoblastos es seguida por la regresión de la vaina, y la diferenciación de los cementoblastos, a partir de las células mesenquimatosas indiferenciadas del ectomesénquima del saco dentinario que rodea la vaina. El desplazamiento de las células epiteliales de la vaina hacia la zona periodontal comienza con la formación de dentina. La formación del patrón radicular involucra, también, fenómenos inductivos.⁶

CAPÍTULO III

PULPA

La pulpa dentaria forma parte del complejo dentino-pulpar, que tiene origen embriológico en la papila dental (tejido ectomesenquimatoso derivado de la cresta neural). La pulpa se aloja en la cámara pulpar es la forma madura de la papila y tiene la particularidad de ser el único tejido blando del diente. La cámara pulpar es la cavidad central excavada en plena dentina, que, desde el punto de vista morfológico, reproduce la forma del elemento dentario, por lo que cambia según la anatomía de los dientes. La cámara pulpar en los premolares y molares se divide, en porción coronaria y porción radicular. En la zona coronaria, la cámara posee un piso y un techo, donde encontramos los cuernos pulpares, que son prolongaciones camerales que se dirigen hacia las cúspides. La presencia y la dimensión de los cuernos pulpares, especialmente, en dientes jóvenes, son particularidades anatómicas importantes de recordar a la hora de preservar la vitalidad pulpar durante el desgaste de cavidades, especialmente oclusales. Del piso de la cámara salen dos o tres conductos que penetran en las raíces y terminan en uno o varios orificios en el vértice distal de la raíz. Estos conductos se extienden, desde la región cervical hasta el foramen apical o ápice radicular. Se denomina pulpa radicular a la porción tisular alojada en esos conductos (periápice). En el foramen apical, la pulpa radicular se conecta directamente con el tejido periapical del ligamento periodontal. En esta área se localizan células mesenquimáticas de reserva (multipotentes), que se diferenciarán según las necesidades funcionales, en distintos fenotipos celulares: fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos. Durante el desarrollo de la raíz, la vaina epitelial de Hertwig es la que determina la forma y el número de las raíces.⁶

3.1 Componentes estructurales

La pulpa dental es un tejido conectivo laxo, ricamente vascularizado e inervado. En su periferia (unión pulpa-dentina) se ubican los odontoblastos, que son células especializadas que se encargan de sintetizar los distintos tipos de dentina. La pulpa está formada por 75% de agua y un 25% de materia orgánica. Esta última está constituida por células y matriz extracelular (MEC) representada por fibras y sustancia fundamental.⁷

3.1.1 Odontoblastos

Los odontoblastos constituyen el tipo celular más característico y especializado del complejo dentino-pulpar. Durante la dentinogénesis los odontoblastos forman la dentina y los túbulos dentinarios, y su presencia en estos últimos hace de la dentina un tejido vivo y sensible. Las diferencias más significativas entre odontoblastos, osteoblastos y cementoblastos, son que los osteoblastos y cementoblastos son de forma poligonal o cuboide, mientras que los odontoblastos completamente desarrollado de la pulpa coronal es una célula cilíndrica alta. El odontoblasto parece sintetizar principalmente colágena de tipo I. El odontoblasto se considera una célula postmitótica fija que, una vez que se ha diferenciado totalmente, parece no sufrir división celular. Se odontoblastos se muestran en la figura 5 y 6. La vida útil del odontoblasto coincide con la vida de la pulpa viable.⁷ Los nuevos odontoblastos que se originan en los procesos reparativos de la dentina lo hacen a expensas de las células ectomesenquimatosas o células madre de la pulpa dental, aunque algunos autores opinan que podrían derivar de los fibroblastos pulpares. La fibronectina desempeña un papel mediador importante en la diferenciación de las células ectomesénquimales en odontoblastos.⁶

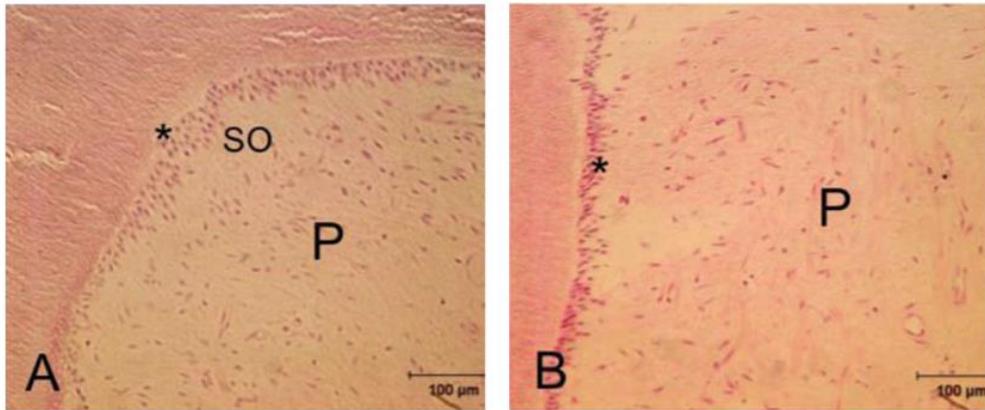


Figura 5. A y B Muestras histológicas de pulpa sana y capas de odontoblastos y subodontoblastos en la porción coronal y cervical. Tinción de hematoxilina y eosina Tomada de . Yildirim S. Dental Pulp Stem Cells 1ra Ed. New York: Spinger; 2012. 25–78 p.

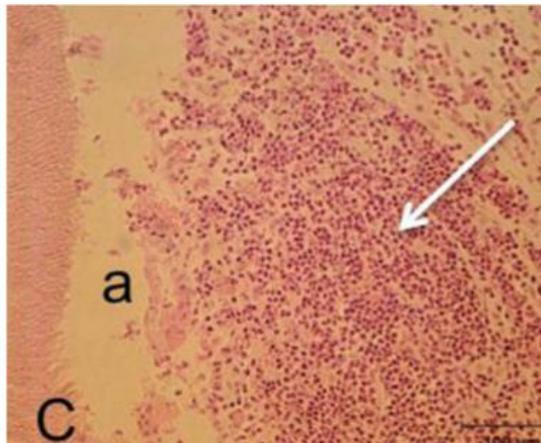


Figura 6. Muestra histológica de células inflamatorias en la porción coronal y cervical. Tinción de hematoxilina y eosina, Tomada de Yildirim S. Dental Pulp Stem Cells . 1ra Ed. New York: Spinger; 2012. 25–78 p.

3.1.2 Fibroblastos

Son las células principales y más abundantes del tejido conectivo pulpar, especialmente, en la corona, donde forman la capa denominada rica en células. Los fibroblastos en fase de diferenciación temprana son poligonales y se muestran muy separados y uniformemente muy distribuidos en el seno de la sustancia fundamental.⁷

En pulpas jóvenes se ha observado que estas células poseen prolongaciones citoplasmáticas largas y delgadas, conectadas mediante complejos de unión a otros fibroblastos, adquiriendo un aspecto de “sincitio” morfológico, pero no funcional. En la pulpa adulta se transforman fibrocitos,

tomando una forma ovalada, con un núcleo de cromatina más densa y un citoplasma escaso de débil basofilia, con organoides reducidos. En los procesos de reparación del tejido conectivo, los elementos fibroblásticos suelen variar en número y morfología. En estas circunstancias se han identificado fenómenos de división celular y por esto, por lo que algunos autores consideran que los fibrocitos aún conservan cierta capacidad de regeneración. Sin embargo, otros sostienen que los fibroblastos adultos en estas situaciones derivan de otras células con menos grado de diferenciación. Dichos fibroblastos, dan origen a los diversos tipos de colágeno y tienen capacidades proliferativas distintas. El aspecto alargado, fusiforme o estrellado de los fibroblastos depende del tipo de matriz extracelular en la que se encuentren. Por lo general, se encuentran en las fibras de colagenasas las cuales se orientan en las distintas direcciones del espacio. La función de los fibroblastos es formar, mantener y regular el recambio de la matriz extracelular fibrilar y amorfa. Son células multifuncionales, pues tienen también la capacidad de degradar el colágeno, en respuesta a distintos estímulos fisiológicos del medio interno.⁶

3.1.3 Células pulpares de reserva

Estas células se denominan también mesenquimáticas indiferenciadas, derivan del ectodermo de la cresta neural. Las células de la cresta neural migran a diferentes regiones, entre ellas, la cefálica durante la etapa embrionaria. Estas células constituyen, en la pulpa adulta, la población de reserva pulpar, por su capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos productores de dentina o en fibroblastos productores de matriz pulpar, según el estímulo que actúa sobre ellas. El factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF) es un poderoso estimulante de la proliferación y diferenciación de las células de la pulpa. Con la edad el número de células mesenquimáticas disminuyen, lo cual trae una reducción en la capacidad de autodefensa de la pulpa. Generalmente, se ubican en la región subodontoblastica o en la proximidad de los capilares sanguíneos, por lo que suelen llamarse células perivasculares o pericitos. Las células ectomesenquimáticas son difíciles de diferenciar de los fibroblastos en cortes histológicos. A menudo, se describen como células de menor tamaño y de

aspecto estrellado. Las células mesenquimáticas indiferenciadas del periápice son las que pueden dar lugar a distintas líneas celulares: fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos y, ocasionalmente, odontoblastos, como respuesta biológica ante determinadas situaciones clínicas. Recientemente se ha identificado la célula madre o troncal de la pulpa dental. Se trata de la célula (DPSC) (dental pulp stem cell) que ha sido aislada de la pulpa dental postnatal. En la actualidad se están investigando nuevos marcadores útiles para identificar las células madre *in situ* y para su aislamiento y su purificación *ex vivo*.⁶

3.1.4 Células dendríticas

Son células accesorias del sistema inmunitario. Células similares se encuentran en la epidermis y en las membranas mucosas, donde reciben el nombre de células de Langerhans. Se encuentran fundamentalmente en tejidos linfáticos, aunque también presentan amplia distribución en tejidos conjuntivos, incluida la pulpa. Estas células se denominan células presentadoras de antígeno.⁷

3.1.5 Matriz extracelular

También llamada sustancia fundamental. Es amorfa y en general, se considera un gel, en vez de un sólido. Sus componentes son similares en todos los tejidos, pero la cantidad varía. El principal componente estructural es el colágeno. La red de fibras de colágeno actúa también como soporte de los demás componentes de la matriz extracelular: proteoglucanos, ácido hialurónico y fibras elásticas. Los dos primeros componentes son los glucosaminoglucanos de la matriz extracelular. Debido a su contenido la sustancia fundamental es responsable de las propiedades de retención de agua de los tejidos conjuntivos y actúa como un tamiz molecular que regula la difusión de sustancias a través de este espacio. El tejido conjuntivo está formado por células y fibras, incluidas en la sustancia fundamental. Casi todas las proteínas de la matriz extracelular son glucoproteínas. Los proteoglucanos son una subclase importante de glucoproteínas. La fibronectina es una glucoproteína grande de superficie que, junto con el

colágeno, forma una red fibrilar integrada que influye en la adhesión, la motilidad, el crecimiento y la diferenciación de las células. En la pulpa, los principales proteoglucanos son el ácido hialurónico, el sulfato de dermatano, el sulfato de heparano y el sulfato de condroitina. El contenido de proteoglucanos del tejido pulpar disminuye alrededor de un cincuenta por ciento con la erupción dental. La consistencia del tejido conectivo de la pulpa depende en gran medida de los proteoglucanos de la sustancia fundamental. La sustancia fundamental forma una almohadilla amortiguadora que protege las células y los componentes vasculares del diente. En ciertas lesiones inflamatorias que cursan como una elevada concentración de enzimas lisosómicas de macrófagos, puede producirse la degradación de la sustancia fundamental.⁷

3.2 Funciones

3.2.1 Inductora

El mecanismo inductor del complejo dentino-pulpar se pone de manifiesto durante la amelogénesis, ya que es necesario el depósito de dentina para que se produzca la síntesis y el depósito del esmalte.

3.2.1 Formativa

La pulpa tiene como función esencial formar dentina. La capacidad de esta se mantiene mientras dura su vitalidad. La elaboración de la dentina está a cargo de los odontoblastos y, según el momento en que ésta se produce, surgen distintos tipos de dentina: primaria, secundaria y terciaria. Esta última variedad se elabora en respuesta a distintos estímulos irritantes, como, por ejemplo, biológicos (caries), físicos (calor, presión) o químicos (sustancias nocivas de algunos materiales dentales).

3.2.2 Nutritiva

La pulpa nutre a la dentina a través de las prolongaciones odontoblásticas y de los metabolitos que, desde el sistema vascular pulpar se difunden a través de la linfa de los túbulos dentinarios.

3.2.3 Sensitiva

La pulpa mediante los nervios sensitivos responde, ante los diferentes estímulos o agresiones, con dolor dentinario o pulpar. En la sensibilidad de la pulpa y la dentina no interesa la naturaleza del agente estimulante, ya que la respuesta es siempre de tipo dolorosa. El dolor dentinal es agudo y de corta duración, mientras que el dolor pulpar es sordo y pulsátil, persistiendo durante cierto tiempo.

3.2.4 Defensiva o reparadora

El tejido pulpar tiene una notable capacidad reparadora, formando dentina ante las agresiones. Las dos líneas de defensa son: 1) formación de dentina peritubular, con estrechamiento de los conductos, para impedir el paso de microorganismos hacia la pulpa, esta es la primera respuesta de la pulpa frente al avance de procesos cariosos. 2) formación de dentina terciaria, reparadora o de irritación. Esta dentina es elaborada por los nuevos odontoblastos que se originan de las células ectomesenquimatosas o células madre de la pulpa.⁶

CAPÍTULO IV

CÉLULAS MADRE

4.1 Definición

Son una subpoblación de células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación, que es la capacidad de las células para multiplicarse; multipotencialidad, se refiere a la capacidad de una célula para diferenciarse en múltiples y distintos linajes celulares.⁸

4.2 Clasificación

4.2.1 Según su capacidad de diferenciación.

4.2.1.1 Totipotentes

Únicamente el cigoto y las descendientes de las dos primeras divisiones son células totipotenciales ya que tienen la capacidad de formar tanto el embrión como el trofoblasto de la placenta. En sentido estricto solamente los estadios iniciales del cigoto constituirían células madre totipotenciales.

4.2.1.2 Pluripotentes

A los cuatro días las células totipotenciales empiezan a diferenciarse, formando el blastocisto y la masa celular interna son consideradas pluripotenciales y pueden diferenciarse en las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero pierden la capacidad de formar la placenta.

4.2.1.3 Multipotentes

Son células capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas de acuerdo con su localización; por ejemplo, las células madre del sistema nervioso central tienen el potencial de generar tres tipos celulares: neuronas, oligodendrocitos y astrocitos.

4.2.1.4 Unipotentes

Son células capaces de generar un solo tipo de célula específica; por ejemplo, las células madre de la membrana basal de la epidermis interfolicular, que producen únicamente escamas queratinizadas.⁴

4.2.2 Según su lugar de origen

4.2.2.1 Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias derivan de la masa celular interna de embriones en estado de blastocito, por lo tanto, en cuestiones éticas, legales y médicas (rechazo de tejidos) puede hacer que este tipo de células resulten inapropiadas para aplicaciones clínicas debido a su ilimitada capacidad de proliferación de las células puede llegar a detectarse una alta probabilidad de desarrollar tumores.⁴

4.2.2.2 Células madre adultas

En 1960 se encontraron por primera vez en la médula ósea hace décadas, estas células fueron inicialmente llamadas células madre estromales, pero más tarde recibieron la terminología ahora más ampliamente aceptada como células madre mesenquimales. Las células madre adultas parecen presentar mayor población de células adultas en hueso, ligamento periodontal, pulpa dental, etc. Se caracterizan principalmente por su autorrenovación, su multipotencialidad y su capacidad limitada de proliferación, debido a estas características las células madre adultas han causado gran interés para la regeneración tisular. Recientemente se han identificado nuevos tipos de estas células, procedentes de tejidos dentales.³

4.3 Células madre dentales (DSC)

Recientemente, se han aislado y caracterizado numerosos tipos de células madre mesenquimales derivadas del tejido dental humano, incluyendo células madre de la pulpa dental, células madre de dientes deciduos exfoliados, células madre del folículo dental, células madre del ligamento periodontal, células madre de la papila apical, células madre de la médula

ósea. En la figura 7 podemos observar la localización de las células madre dentales⁹

4.3.1 Células madre de dientes exfoliados (SHED)

El descubrimiento de las células madre de dientes exfoliadas fue por Miura y col. en el año 2003, quién arrojó la posibilidad de usar células madre de la pulpa dental para la ingeniería tisular. Las ventajas de las células madre de dientes exfoliados son: mayor tasa de proliferación comparada con las células madre de dientes permanentes, fácil de expandir *in vitro*, alta plasticidad, ya que pueden diferenciarse en neuronas, adipocitos, osteoblastos y odontoblastos.¹⁰

4.3.2 Células madre de la pulpa dental (DPSC)

Se Identificó por primera vez por Gronthos y col. en el año 2000 en terceros molares humanos; verificó que poseían características sorprendentes de capacidad de autorrenovación y diferenciación de múltiples linajes al encontrar que podían diferenciarse en neuronas, adipocitos, osteoblastos y odontoblastos. Los científicos han estado trabajando para encontrar un andamio eficiente y un microambiente apropiado para promover la diferenciación de (DPSC). En un estudio reciente sembraron células madre de la pulpa dental en materiales de andamiaje (colágeno esponjoso, cerámica porosa y una malla de titanio fibroso) y los implantaron en ratones durante 6 a 12 semanas, el tejido formado no era pulpa como complejo, pero algo parecido al tejido conjuntivo. Estos estudios indican el potencial de las células madre de la pulpa dental en la ingeniería tisular.¹⁰

Estudios más recientes demostraron que (DPSC) superó su consideración como células madre ectomesenquimatosas, porque fueron capaces de dar lugar a linajes no mesenquimales tales como células se Schwann y células endoteliales.¹¹

4.3.3 Células madre del ligamento periodontal (PDLSC)

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado, derivado del folículo dental y originado de las células de la cresta neural. Estudios recientes han demostrado que las células madre del ligamento periodontal

son células multipotentes con características similares de los (BMSC) y (DPSC), capaces de desarrollar diferentes tipos de tejidos como los tejidos óseos y dentarios asociados. Se encontró en estudios que las células madre del ligamento periodontal podrían diferenciarse en células que puedan colonizar y crecer en un andamio biocompatible, sugiriendo una fuente autóloga fácil y eficiente de células madre para la ingeniería de tejido óseo en la odontología regenerativa. Además de la capacidad osteogénica, también se demostró la capacidad de diferenciación en cementoblastos.¹⁰

4.3.4 Células madre de la papila apical (SCAP)

La papila apical es el tejido blando que se localiza en los ápices de dientes permanentes. La papila dental contribuye a la formación de los dientes y finalmente se convierte en el tejido pulpar, y una zona apical rica en células se encuentra entre la papila apical y la pulpa. En la papila apical de los dientes permanentes inmaduros se descubrió una población de células madre que muestran una mayor capacidad de proliferación y mayor potencia de mineralización que (DPSC). Las células madre de la papila apical representan una población de células de un tejido en desarrollo y por lo tanto podría presentar una mayor plasticidad que otras células madre dentales. Estas células cultivadas pueden someterse a una diferenciación en adipocitos, osteoblastos/odontoblastos, condrocitos y neuronas.⁹

4.3.5 Células madre de los folículos dentales (DFSC)

Estas células han sido aisladas de folículos dentales de terceros molares. Se encontró que las células madre del folículo dental eran capaces de diferenciarse en osteoblastos/cementoblastos. Además fueron trasplantadas en ratones inmunodeficientes y fueron capaces de recrear un nuevo ligamento periodontal como tejido después de 4 semanas. Kémoun demostró que los derivados de la matriz del esmalte estimularon a las células madre del folículo dental para diferenciarse en cementoblastos. Los tres linajes principales fueron ligamento periodontal, cemento y óseo.¹⁰

4.3.6 Células madre de la médula ósea (BMSC)

Se originan en poblaciones celulares de la médula ósea y son capaces de diferenciarse a lo largo de múltiples linajes mesenquimales. Se han

realizado pruebas de la capacidad de las células madre de la médula ósea para regenerar tejido periodontal y restaurar los defectos periodontales. Se demostró que el autotrasplante es capaz de formar cemento *in vivo*, ligamento periodontal y hueso alveolar después de la implantación en sitios periodontales defectuosos. Curiosamente cuando se consideró que las células madre de la médula ósea eran una fuente de células mesenquimales, Hu y col. investigaron la posibilidad de que dieran lugar a diferentes tipos de células epiteliales y su potencial para servir como fuente para dar lugar a células similares a los ameloblastos. No todos los científicos identifican las células madre de la médula ósea como ideales para la ingeniería dental; Jing señaló que la capacidad de diferenciación de (BMSC) disminuía considerablemente con el aumento de la edad de los donantes. Sostiene la opinión de que las células madre adiposas podrían ser inducidas a linaje odontogénico y podrían ser utilizadas para la regeneración dental.¹²

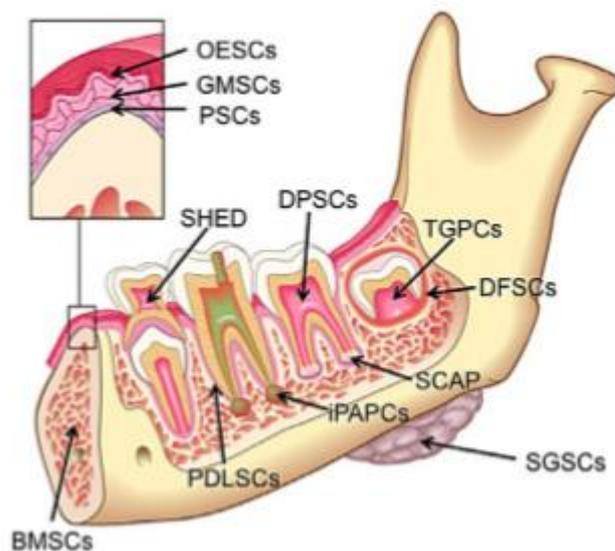


Figura 7. Esquema de las células madre dentales. Tomada de Diogenes A, Teixeira F HK. An update on clinical regenerative endodontics. Endod Top. 2013;28(1):2–23.

CAPÍTULO V

INGENIERIA TISULAR EN ENDODONCIA

Langer y Vacanti definen la ingeniería tisular como: un campo interdisciplinario que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular o un órgano entero. La ingeniería tisular también se ha definido como: la comprensión de los principios del crecimiento tisular, y su aplicación para producir tejido de reemplazo funcional para uso clínico. El aspecto de ingeniería de tejidos dentino-pulpar es de gran interés, con un elevado número de estudios realizados en los últimos años.¹⁰ El tejido regenerado pulpar debe estar revascularizado, contener densidad similar y arquitectura a la matriz extracelular de la pulpa, dar lugar a nuevos odontoblastos, producir nuevas matrices de dentina mineralizada y estar innervado.¹³

Los fundamentos de la ingeniería tisular involucran fuentes celulares, andamios para la expansión y diferenciación celular, así como portadores de factores de crecimiento. Los ensayos con animales y humanos son una parte importante de las aplicaciones.¹⁴

5.1 Triada de bioingeniería

La bioingeniería implica el uso de:

5.1.1 Factores de crecimiento

Son proteínas que inducen a la diferenciación y proliferación por receptores unidos a la superficie celular facilitando la migración celular. Entre los factores más comunes en los procesos de regeneración del complejo dentinopulpar sobresale el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la proteína ósea morfogenética (BMP), aunque en estudios recientes se ha comprobado que la dentina actúa como un reservorio de esos factores, los cuales, al ser liberados por agentes cauterizantes, ácidos o lesiones cariosas una vez inducida su desmineralización, ejercen una

función clave en la formación de dentina terciaria. Las citoquinas se usan indistintamente con factores de crecimiento debido a que muchas citoquinas comparten acciones similares con factores de crecimiento. A diferencia de los efectos sistémicos por las hormonas en las células diana, los factores de crecimiento o citoquinas típicamente actúan localmente en las células diana. Los factores de crecimiento que actúan sobre las células de la pulpa dental son:

1. PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) regulan el crecimiento y la división celular. En particular desempeña un papel importante en la formación y crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis). La quimiotaxis y proliferación de células madre pueden ser inducidas por este factor de crecimiento en el sitio de la lesión.
2. TGF- β (Factor de crecimiento transformante) su efecto es muy variable y depende del tipo de células y tejidos. Regula una amplia gama de actividades celulares, tales como: la migración celular, proliferación celular, la diferenciación celular y la síntesis de matriz extracelular.

Se ha demostrado en dientes de perro que aumenta la proliferación y la producción de células de la matriz extracelular en cultivo de tejido de pulpa dental y promueve la diferenciación de odontoblastos de la pulpa dental.

3. BMP 2, 4, 7 y 11 (Proteínas morfogénicas óseas) juegan un papel importante en la inducción de la mineralización. BMP2 estimula la diferenciación de las células de la pulpa dental en odontoblastos. Las células de la pulpa dental de bovinos tratados con BMP2 y BMP4 se diferenciaron en preodontoblastos. La proteína BMP7 promueve la formación de la dentina cuando se coloca sobre la pulpa dental, se observó en varios modelos de animales, incluyendo ratas, hurones, cerdos miniatura y macacos. La proteína BMP11 estimula la diferenciación de odontoblastos *in vitro* y la formación de dentina reparadora *in vivo*.

4. VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) también conocido como factor de permeabilidad vascular. Promueve la migración celular, la proliferación celular, la vasodilatación y la permeabilidad vascular.
5. FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) desempeña un papel importante en la migración celular, la proliferación y la diferenciación durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. Hasta la fecha se han identificado 22 tipos en los seres humanos de los cuales FGF2 parece ser importante en la regeneración del complejo dentino-pulpar, porque induce la migración de las células de la pulpa.⁸

5.1.2 Andamios

Es un componente esencial en la ingeniería de tejidos, es el soporte físico. La mayoría de las células son dependientes de anclajes y pueden morir si no poseen adhesión celular, los Scaffolds o andamios generan un sustrato de adhesión, además de propiedades mecánicas importantes para la construcción de estructuras tridimensionales y señales bioactivas. Estos deben ser desarrollados según el tipo de tejido de manera independiente para la regeneración. Sin embargo, deben tener características comunes como, posibilitar la fijación celular, ayudar a la difusión de nutrientes y oxígeno, siendo tolerables por el tejido. Además de generar señales morfogenéticas para hacer posible la unión, diferenciación y supervivencia celular, no provocar una respuesta inflamatoria, ser estériles y ser estables mientras se mantiene la forma y fuerza del tejido.^{15,5}

Los materiales del andamio son generalmente selectivos para una aplicación particular del tejido. Como estos materiales están todavía en fase de evolución mostrando los inconvenientes de las infecciones y la inmunogenicidad, su aceptabilidad para el desarrollo de andamios sigue siendo un tema de gran desafío. Numerosos andamios se desarrollan a partir de biomateriales utilizando los mejores principios de la ciencia biológica. Independientemente del tipo de tejido, varios factores desempeñan un papel significativo en la síntesis del andamio como: la

porosidad, resistencia mecánica, biocompatibilidad, bioreabsorbilidad, forma tridimensional precisa, técnicas de fabricación.¹⁶

A tales efectos se han recomendado el coágulo sanguíneo y el plasma rico en plaquetas (PRP), ambos ya usados con esa finalidad. En algunas situaciones en las que no es posible la inducción del sangrado se puede usar plasma rico en plaquetas, ya que esta ha demostrado que tiene un alto potencial como andamio. El plasma rico en plaquetas tiene un volumen de plasma autólogo con altas concentraciones de factores de crecimiento que permiten la quimiotaxis, diferenciación y metabolismo celular, liberándose en un periodo lento de 7- 14 días.¹⁷

5.1.3 Células madre

Se encuentran en distintos órganos y tejidos a manera de nichos mesenquimales. Estas células se distinguen por su capacidad de autorrenovación ilimitada, su capacidad de diferenciación y proliferación. Junto con los factores de crecimiento y andamios deben inducir a la proliferación celular, la migración y la diferenciación en un tejido específico.

5.2 Trasplante y rastreo celular

Con enfoque alternativo, la endodoncia regenerativa pretende regenerar tejidos similares a la pulpa dental utilizando dos posibles estrategias: trasplante y rastreo celular. El primero significa el trasplante de células madre exógenas cargadas en los andamios incorporados con moléculas de señalización (factores de crecimiento) en el sistema del conductos radiculares del anfitrión para permitir la regeneración. Las células trasplantadas se recogen del huésped (autólogo) o de otros individuos (allogénico) y pueden ser procesados o cultivados para aumentar la proliferación celular. Aproximadamente 10 años después de descubrimiento de células madre de la pulpa dental por Gronthos en el 2000, la regeneración del complejo pulpo-dentina se logró utilizando células madre dentales exógenas trasplantadas en animales por Huang en el 2010. Sin embargo, la terapia celular enfrenta muchos obstáculos en la práctica

clínica porque hay que seguir procedimientos complejos, como extracción dental, extirpación pulpar, expansión celular, almacenamiento, envío, falta de aprobación reglamentaria, altos costos, riesgo de rechazo inmune, transmisión de patógenos durante el injerto.¹²

El rastreo celular en la regeneración tisular se define como el reclutamiento activo de células endógenas en un compartimiento anatómico. Comparado con el trasplante de células, las estrategias de rastreo celular podrían ser más fáciles de realizar clínicamente, porque no hay necesidad de aislar y manipular células madre *in vitro*. En este enfoque sin células, los andamios bioactivos impregnados con factores de crecimiento se inyectan en los conductos radiculares sin pulpa para inducir la migración, proliferación y diferenciación de células madre endógenas que residen alrededor del ápice radicular. Las posibles fuentes celulares incluyen células madre de la pulpa dental, células madre de la papila apical y células madre de la médula ósea. Existen dos condiciones previas para lograr la regeneración de la pulpa: desinfección efectiva del conducto radicular y tamaño apropiado del foramen apical (especialmente en dientes maduros con ápices cerrados), que debe ser lo más pequeño posible, sin afectar la migración celular, neovascularización y reinervación. Las citoquinas son moléculas críticas de señalización que participan en la regeneración de la pulpa, porque movilizan células endógenas y regulan la proliferación y diferenciación de células madre.¹²

El mayor obstáculo que enfrenta el rastreo de celular para la regeneración pulpar está representado por la escasez de células endógenas en sitios defectuosos. El número de células periapicales se reduce en los dientes con pulpas necróticas y lesiones periapicales (SCAP) posee un beneficio clave con respecto a su ubicación apical que apoya la supervivencia tisular durante la necrosis pulpar. La razón biológica de esta aparente supervivencia resistente, a pesar de condiciones difíciles, puede explicarse por la densidad relativamente baja de los vasos sanguíneos en la papila apical en comparación con la pulpa dental adyacente, mientras que el folículo dental que rodea la papila apical es altamente vascularizado y puede actuar como una cama capilar para suministrar nutrientes a (SCAP). Por lo tanto, las células madre de la papila apical y las células madre

circundantes están equipadas para recibir nutrientes y oxígeno a través de la difusión de los tejidos apicales circundantes como el folículo dental, y posiblemente el tejido granulomatoso muy vascularizado presente en la periodontitis apical.³

Se ha investigado el uso de (DPSC), (SHED) y (SCAP) para la regeneración del tejido dentino-pulpar en la técnica trasplante celular. En un estudio (DPSC) tratados en medio de cultivo se trasplantaron en ratones inmunocomprometidos, generaron un tejido similar a la pulpa con vascularización y se formó una capa de un tejido similar a la dentina en las paredes del conducto. Los mismos procedimientos hicieron con (SCAP), aquí observaron distintas capas de odontoblastos que recubren la dentina mineralizada. (SHED) sembrado en andamios biodegradables junto con factores de crecimiento como (BMP y TGF), observaron células similares al odontoblasto en la superficie de la dentina, con un proceso citoplasmático extendiéndose dentro de un túbulo dentinario.⁹

5.3 Protocolo de regeneración endodóncica

Los procedimientos de regeneración endodóncica (REPs) han sumergido como alternativas viables para el tratamiento de dientes inmaduros con necrosis pulpar. Sin embargo, se estableció muchas décadas antes. En 1965 Nygaard- Ostby observó que la formación de un coágulo no sólo era deseable, sino también buscaba como un medio para asegurar la curación adecuada. Para probar la hipótesis de que la presencia de un coágulo de sangre dentro de un sistema de conductos radiculares promueve la cicatrización, dientes maduros diagnosticados con pulpa vital o necrótica recibieron tratamiento de conductos radiculares seguido de instrumentación, hemorragia intracanal provocada, y una obturación con kloroperka colocado coronal al coágulo formado. Los resultados fueron: evidencia radiográfica de cierre apical y resolución de signos y síntomas. Del análisis histológico se observó crecimiento interno de tejido conectivo, niveles variados de tejido mineralizado a lo largo de las paredes del conducto, así como “islas” de tejido mineralizado incrustado dentro del tejido recién formado. Dado que la pulpa es un tipo de tejido conectivo con

un suministro rico en fibroblastos, este hallazgo general fue bastante prometedor. Sin embargo, la falta de tipos celulares no deseados (cementoblastos) y la falta de tipos celulares deseados (odontoblastos) indican que este protocolo no llevó a la regeneración histológica completa de la pulpa dental. A pesar de sus deficiencias este estudio sentó las bases para los estudios posteriores en el campo de la endodoncia regenerativa. En 1971 se publicó otro estudio que incluía el uso de antibióticos en el protocolo de desinfección y la promoción intencional de la hemorragia intraconducto. Estos hallazgos sentaron las bases para la endodoncia regenerativa contemporánea, demostrando que la reparación podría tener lugar después de la desinfección del conducto radicular en diente inmaduros. Hubo un paréntesis de 30 años hasta que se publicó el primer caso de (REP). En el 2001 Iwaya dio a conocer en este informe el tratamiento de un diente maduro con necrosis pulpar sin instrumentación y con el uso de una pasta antibiótica compuesta de ciprofloxacino y metronidazol (pasta antibiótica doble, DAP). Con este informe logró recuperar el procedimiento de revascularización.³

Este estudio fue seguido en el 2004 por Banchs y Trope dando a conocer un caso clínico que describió el tratamiento de un premolar inferior inmaduro. El sistema de conductos fue irrigado por NaOCl (5.25%), sin instrumentación, seguido por la colocación de una pasta antibiótica triple (TAP) compuesta de ciprofloxacino, minociclina y metronidazol durante 28 días. En la segunda cita, se eliminó la mezcla antibiótica con irrigación salina y se provocó el sangrado intraconducto seguido de la colocación de una restauración coronal sobre el coágulo sanguíneo formado. Este estudio también reportó un continuo desarrollo de la raíz y una respuesta positiva a las pruebas de vitalidad. Es importante destacar que es el protocolo de tratamiento (REP) más utilizado. En 2011, se realizó un estudio para evaluar la presencia de células madre tras la fase de sangrado provocado en procedimientos regenerativos. Se encontró que hay una afluencia sustancial de células madre mesenquimales en los conductos radiculares durante los procedimientos regenerativos, resultando en un aumento mayor de 700 veces en la expresión de marcadores (MSC). Esta fue la primera

demostración de que los (REP) son terapias basadas en células madre. Aunque este estudio no evaluó si los (MSC) detectados se derivan de la papila apical, se asumió que estas células eran (SCAP) ya que la etapa de sangrado provocado laceró la papila apical. A pesar de la periodontitis apical crónica y abscesos apicales, apunta a la impresionante capacidad de supervivencia de estas células. La razón biológica de esta aparente supervivencia resistente, a pesar de condiciones difíciles, puede explicarse por la densidad relativamente baja de los vasos sanguíneos en la papila apical en comparación con la pulpa, mientras que el folículo dental que rodea la papila apical es altamente vascularizado y puede actuar como una cama capilar para suministrar nutrientes a (SCAP). Estos hallazgos plantean la cuestión de cómo los (MSC) como (SCAP) pueden sobrevivir durante la periodontitis apical donde una microflora compleja, una serie de mediadores inflamatorios, células inmunes, y presumiblemente baja tensión de oxígeno se encuentran comúnmente. Por lo tanto, parece que las (SCAP) están equipadas para recibir nutrientes y oxígeno, a través de la difusión de los tejidos apicales circundantes como el folículo dental, y posiblemente el tejido granulomatoso muy vascularizado presente en la periodontitis apical. En la figura 8 y 9 podemos observar la cantidad de (SCAP) y la densidad de los vasos sanguíneos de esa zona. La Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) publicó una declaración de posición definiendo los criterios mínimos requeridos para identificar (MSC). Las células madre deben adherirse al plástico y, cuando se cultiva, formar colonias con morfología fibroblastoide. Además, deben expresar CD105, CD73 y CD9, su capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condroblastos y adipocitos *in vitro*. El establecimiento de estos estándares de identificación (MSC) fue un paso crucial para futuros estudios de bioingeniería. Así pues, la adhesión a estas normas garantizará que se utilicen poblaciones homogéneas y verdaderas de (MSC), lo que aumentará considerablemente la productividad.³ Por otra parte, las estrategias de (REP) que contemplan el trasplante de células madre expandidas destacan la importancia de poder garantizar que una población de (MSC) pura se utiliza para el máximo beneficio y seguridad del paciente. También existen varios factores que dependen de cada caso y pueden

influir en el resultado de los (REP).

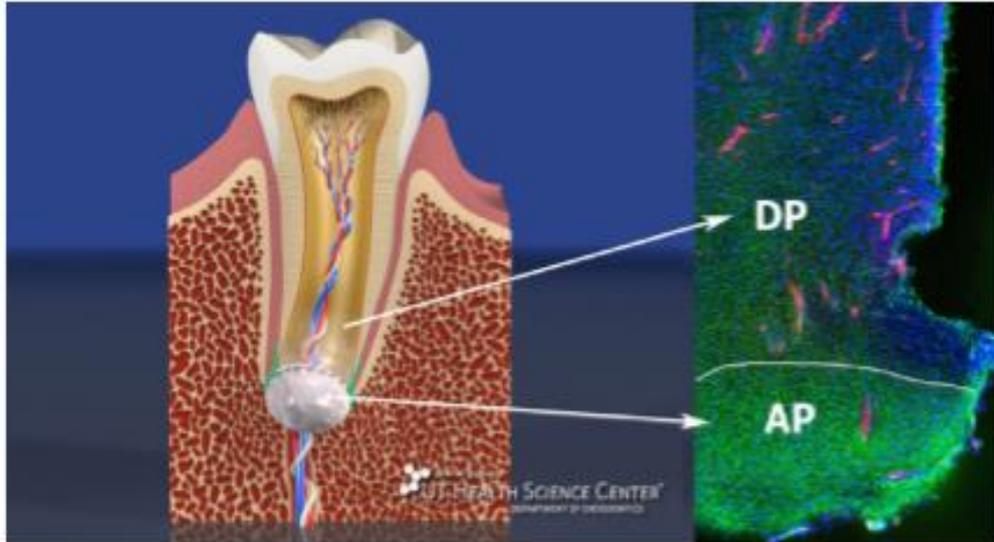


Figura 8. Dibujo de un premolar mandibular inmaduro y una micrografía cofocal. Las células madre mesenquimales se visualizan con vimentina (verde), mientras que las células endoteliales/ vasos sanguíneos se identifican con el factor de von Willebrand (rojo). El límite de la papila apical y la pulpa dental está delimitado por la línea blanca. La expresión de vimentina es especialmente prominente dentro del AP, mientras que los vasos sanguíneos son raros. Tomada de Diogenes A, Teixeira F HK. An update on clinical regenerative endodontics. Endod Top. 2013;28(1):2–23.

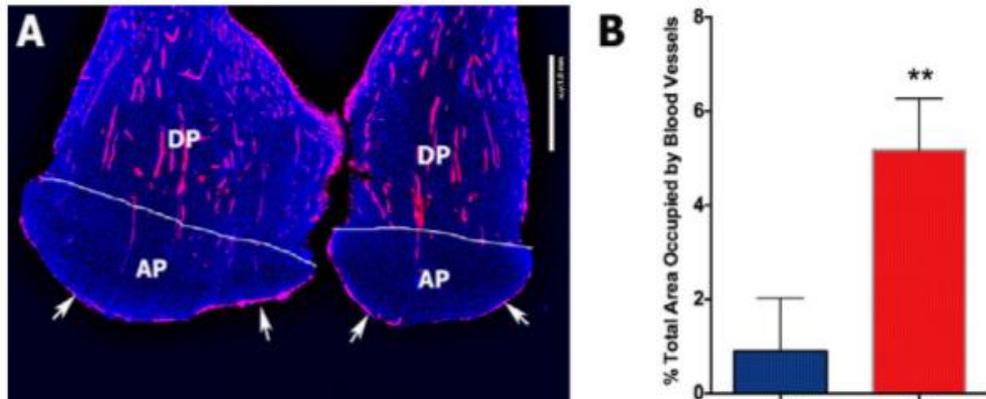


Figura 9. Cuantificación de la densidad de los vasos sanguíneos en la papila apical (AP) y la pulpa dental (DP). A: Se observa una microscopia confocal representativa del tejido radicular que contiene tanto AP como DP con núcleos celulares visualizados en azul (tinción TO- PRO- 3) mientras que los vasos sanguíneos se visualizan en rojo (Tinción de von Willebrand). Tomada de Diogenes A, Teixeira F HK. An update on clinical regenerative endodontics. Endod Top. 2013;28(1):2–23.

5.4 Procedimiento de tratamiento para endodoncia regenerativa

Primera sesión:

- 1) Consentimiento informado, incluyendo explicación de riesgos y tratamientos alternativos o ningún tratamiento.
- 2) Después de comprobar la anestesia local adecuada, se obtiene el aislamiento del diente.
- 3) Se accederá al sistema de conductos radiculares y se determinará la longitud de trabajo (radiografía periapical).
- 4) El sistema de conductos radiculares se irriga lentamente primero con NaOCl 1.5% (20ml/conducto, durante 5 minutos), con aguja destilada.
- 5) Los conductos se secan con puntas de papel.
- 6) Se coloca hidróxido de calcio en el sistema de conductos a 1mm del apice.
- 7) El acceso se obtura temporalmente.

Segunda sesión (2- 4 semanas después de la primera visita):

- 1) Primero se realizará un examen clínico para asegurarse de que no presente sensibilidad a la palpación y la percusión.
- 2) Si se observa sensibilidad, un tracto sinusal o aumento de volumen, se repite el tratamiento realizado en la primera sesión. En este punto, se puede optar por usar pasta antibiótica doble o pasta antibiótica triple (a no más de 100mg de cada fármaco/ml).
- 3) Después de comprobar la anestesia local adecuada de mepivacaína al 3% (sin epinefrina), se realiza el aislamiento absoluto.
- 4) Se accede al sistema de conductos radiculares; la pasta antibiótica se elimina irrigando con EDTA al 17% (30ml/conducto/10 minutos).
- 5) Los conductos se secarán con puntas de papel.
- 6) Se induce el sangrado con una lima tipo K-file #25 a 2mm del foramen apical, con el objetivo de tener el conducto entero lleno de sangre al nivel de la unión cemento- esmalte.
- 7) Una vez formado el coágulo, se coloca una pieza pre-medida de Collapug, cuidadosamente encima del coágulo, para que sirva como matriz interna para la colocación de aproximadamente 3mm de MTA blanco.
- 8) Una capa de Ionómero de vidrio de 3- 4 mm, que fluya suavemente sobre MTA y se cura con luz durante 40s.
- 9) Sobre el Ionómero de vidrio se coloca una restauración de resina compuesta reforzada (Z-100).
- 10) El caso deberá ser objeto de seguimiento a los tres meses, seis meses y al año, durante un total de 4 años.³

El protocolo de regeneración con revascularización se ha utilizado para dientes permanentes inmaduros con periodontitis apical, el estudio de Ricucci demostró, a partir de un estudio histológico de un premolar con tratamiento de revascularización como se observa en la figura 10 y 11, observó como resultado un tejido conjuntivo fibroso caracterizado principalmente por fibroblastos y fibras de colágena que habían llenado el espacio del conducto radicular hasta el tapón coronal de MTA, grandes células parecidas a los cementoblastos, células inflamatorias, pero no se lograron observar células similares a los odontoblastos.¹⁸

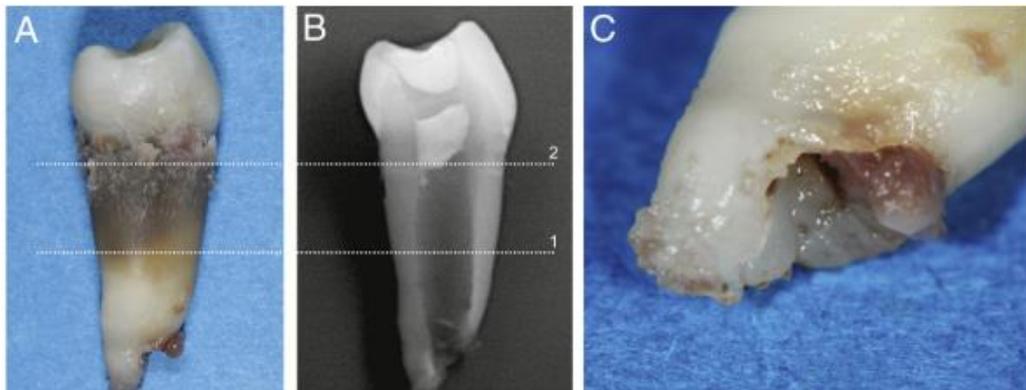


Figura 10. A) Se observa la decoloración de la raíz en los dos tercios coronales. B) Una radiografía del diente extraído tomada con una proyección mesiodistal. C) Una vista detallada del área del foramen apical. Becerra P, Ricucci D, Loguin S, Gibbs J. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. J Endod . 2014;40(1):133–9.

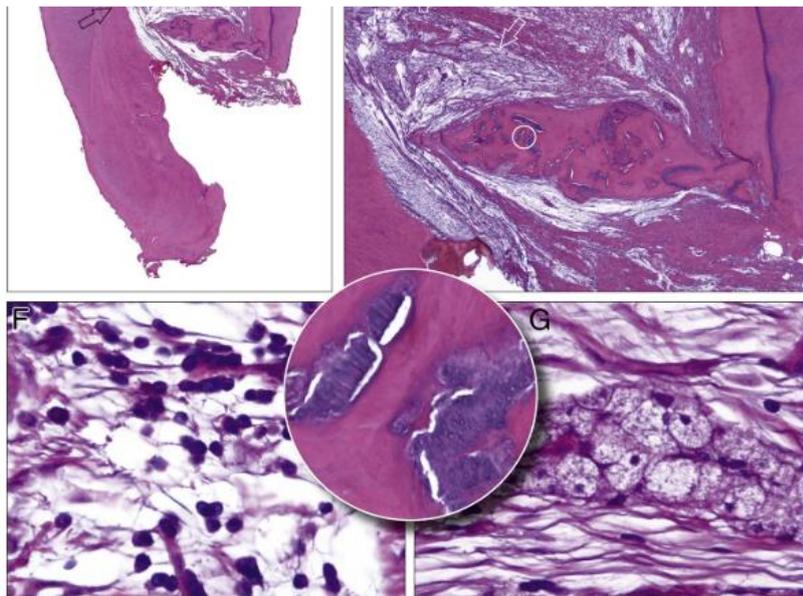


Figura 11. E) Vista detallada del canal apical que muestra la abundancia de tejido fibroso no mineralizado, también se observa la isla de tejido calcificado caracterizada por una masa de calcificación distrófica con numerosas espículas de dentina incrustadas con túbulos dentinarios cortados en todas direcciones (aumento de 400x). F) Una vista a gran aumento del área indicada por la flecha izquierda en E se nota una concentración de células inflamatorias crónicas (principalmente células plasmáticas (con aumento de 400x). Tomada de Becerra P, Ricucci D, Loguin S, Gibbs J. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. J Endod .

CAPÍTULO VI

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE

6.1 Nichos de células madre

Schofield propuso en 1978 que el nicho es un microambiente fisiológicamente favorable para las células madre. El nicho debe ser flexible para coordinar el comportamiento de las células madre con la homeostasis y la reparación. Como tal, el nicho proporciona un mecanismo para equilibrar con precisión la producción de células madre y células progenitoras para mantener la homeostasis del tejido. Por tanto, un nicho de células madre no se define únicamente por la presencia de células madre sino también por la capacidad de regular el comportamiento de las células madre. La replicación de un nicho *in vitro* permitirá condiciones predecibles y controlables para terapias regenerativas. Sin embargo, hasta ahora no hay condiciones de cultivo disponibles, que ayudan a mantener la integridad de las células madre adultas a lo largo del tiempo. El tejido pulpar por otro lado es un área propensa a la destrucción debido a la caries avanzada, pero podríamos encontrar (DPSC) en la pulpa más propiamente dicha de manera inactiva.¹⁹

6.2 Epigenética de la pulpa dental

El término “epigenética” fue introducido en los años cincuenta por Conrad H. Waddington, quien la concibió como “el análisis causal del desarrollo”, que implica todas las interacciones de los genes con su medio ambiente. La epigenética puede regular el destino de las células madre en la pulpa dental podría ser útil para comprender los mecanismos de control transcripcional del nicho (DPSC). La pulpa dental es un tejido completamente dinámico en constante diálogo con el medio ambiente, por lo tanto, la pulpa dental está bajo la amenaza de ataques bacterianos y virales debido a caries, eventos traumáticos, calor extremo, rechinar los dientes, hábitos orales y más. Por lo tanto, se debe esperar que los eventos epigenéticos modifiquen las redes reguladoras de genes de los nichos

(DPSC). La población heterogénea de la pulpa dental reacciona por varios mecanismos a aquellos factores que pueden influir en la calidad de las células madre dentro del nicho. Por lo tanto, los dientes temporales y los dientes permanentes jóvenes podrían ser mejores fuentes para el aislamiento de células madre.¹⁹

6.3 Matriz de crecimiento

Para que los tejidos se regeneren dentro del conducto radicular, se impone la presencia de una matriz de crecimiento que propicie un ambiente favorable para la organización, proliferación, diferenciación y regeneración celular. Las matrices deben cumplir con las siguientes características: Alta porosidad y un adecuado tamaño del poro, necesario para facilitar el cultivo y la difusión de nutrientes a través de la estructura de las células, gran área de superficie, buena degradación debe ocurrir dentro de lo posible con la misma velocidad de formación de los tejidos, biocompatibles y deben interactuar positivamente con otras células de adhesión, crecimiento y migración, además deben presentar buena resistencia física y mecánica. A tales efectos se han recomendado el coágulo sanguíneo y el plasma rico en plaquetas (PRP), ambos ya usados con esa finalidad. En algunas situaciones en las que no es posible la inducción del sangrado se puede usar plasma rico en plaquetas, ya que esta ha demostrado que tiene un alto potencial como scaffold. El plasma rico en plaquetas tiene un volumen de plasma autólogo con altas concentraciones de factores de crecimiento que permiten la quimiotaxis, diferenciación y metabolismo celular, liberándose en un periodo lento de 7- 14 días.¹⁹

6.4 Aislamiento de células madre

Los dientes extraídos por la práctica dental de rutina y los dientes exfoliados por resorción fisiológica son fuentes de pulpa dental. El aislamiento de la pulpa dental es bastante fácil y no invasivo: la corona dental debe desinfectarse brevemente antes de la extracción con clorhexidina al 0.3% y después de la extracción con yodo y alcohol étílico al 70%. Los dientes deben colocarse en un medio de transporte, si se transportan a otro laboratorio para procedimientos de aislamiento. El medio de transporte

debe incluir al menos 3% de penicilina y estreptomina y 5mg/ml de anfotericina B. Dado que la cavidad bucal tiene la segunda proporción más alta de microorganismos, todos los instrumentos deben esterilizarse para evitar el riesgo de una contaminación microbiana. Los dientes permanentes deben romperse con un mini martillo para acceder a la cámara pulpar y conductos radiculares. Las coronas de los dientes deciduos reabsorbidos también podrían ser separadas, ya que los restos del tejido pulpar residen en la cámara pulpar. Una vez que se establece un acceso visual claro, el tejido pulpar se puede extraer con pinzas quirúrgicas sin dientes. Existen principalmente dos métodos de aislamiento para (DPSC): la digestión enzimática y el método de crecimiento.¹⁹

6.5 Método de digestión enzimática

Después de lavar con solución salina, el tejido pulpar debe cortarse en trozos pequeños (1mm). Los trozos de tejido deben lavarse dos veces con solución salina y colocarse en una solución de 2mg/ml de colagenasa tipo I y dispersarse durante 30 a 45 minutos a 37°C con agitación suave en un agitador orbital. Las suspensiones celulares se pueden obtener haciendo pasar los tejidos a través de un filtro de células de 70µm. Alternativamente, el homogeneizado se debe centrifugar a 130xg durante 5 minutos, y el sedimento se debe suspender en el medio de crecimiento. Luego las placas de cultivo celular se pueden usar para cultivar y expandir (DPSC) hasta varios pasajes. Hay diferentes combinaciones enzimáticas como: colagenasa tipo I de 3mg/ml y 4mg/ml de dispasa durante 30 a 60 minutos a 37°C, 1mg/ml de colagenasa tipo I y 2 mg/ml de dispasa 2mg/ml de colagenasa tipo I y dispasa durante 30 minutos a 37°C o 0,2% de tripsina durante 5 minutos a 37°C o 3% de colagenasa tipo I durante 1 hora a 37°C. El tejido pulpar que se cortó en trozos, se coloca directamente en una placa de cultivo celular con el medio de crecimiento.¹⁹

6.6 Medios de cultivo celular para células madre de la pulpa dental

El medio puede influir en las técnicas de manipulación y cultivo, así como en la capacidad morfológica y diferenciación de las células, especialmente para el cultivo de poblaciones de células heterogéneas que contienen células de diversas etapas de diferenciación como en la pulpa dental.²⁰

Las células de la pulpa dental generalmente se cultivan en el medio basal de Eagle's (EBM), el medio esencial mínimo de Eagle's (MEM), α -MEM o el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). Un medio nutritivo F12 de Ham's más complejo (F12) fue optimizando para la clonación. Una mezcla 1:1 de DMEM/F-12 combina la riqueza de F12 y la mayor concentración de nutrientes de DMEM. Se ha demostrado que varios medios favorecen diferentes poblaciones celulares en cultivos de células pulpares. Mientras que el medio 199 favorece las células fibroblásticas, MEM y BME soportan muchos tejidos conectivos y células epiteliales (Miller y col. 1976). Nakashima descubrió que la mezcla DMEM Y DMEM/F-12 condujo a los mejores resultados en adherencia, crecimiento celular, número de células y en la cantidad de células que se encuentran en comparación con F-12. Inicialmente Nakashima concluyó que el DMEM puede ser el indicado para el cultivo de células de la pulpa, porque la cantidad de población resultante y el índice muestra que hay una mayor población de células fibroblásticas de la pulpa.¹⁹

6.7 Criopreservación

Las células madre adultas pueden obtenerse de individuos en cualquier etapa de la vida, por lo tanto, pueden proporcionar una fuente de células para trasplantes autólogos. Las células madre pueden sobrevivir a temperaturas bajas siempre y cuando estén dispersas en crioprotectores. Del mismo modo, las células aisladas de terceros molares humanos y criopreservados durante al menos un mes conservaron la expresión del marcador STRO-1 y el potencial de proliferar en neurogénico, adipogénico, osteogénico/odontogénico. La criopreservación de dientes intactos

proporciona otro posible método de aislamiento que puede permitir la extracción posterior de células madre demostrando un comportamiento similar al de las células madre extraídas de dientes frescos.¹

Es un proceso en el que las células o tejidos completos se preservan a temperaturas muy bajas (-196°C). Esto permite que las células reinicien la proliferación, la diferenciación y la formación de nuevos tejidos para uso terapéutico. Los informes muestran que los tejidos pulpares dentales de los dientes criopreservados no pueden mantener sus propiedades biológicas debido a la limitación de la permeabilidad del agente crioconservador en la cavidad pulpar (Osathanon 2010). Sin embargo, también se ha demostrado que la tasa de aislamiento de las células de la pulpa dental de los dientes criopreservados es bastante alta. Aunque los métodos de crioconservación son actualmente suficientes para fines de investigación celular, se requiere evidencia clínica más concreta y exitosa de sus beneficios indispensables para dientes completos y (DPSC) aisladas para futuros propósitos regenerativos.¹⁹

CONCLUSIONES

- Hace décadas las investigaciones comenzaron a enfocarse en las células madre debido a su alta capacidad de autorrenovación que es lo que las caracteriza, pero hay muchas controversias sobre la regeneración pulpar con células madre dentales.
- La terapia con células madre dentales es un gran avance científico que ha sido probado en diferentes especies de animales en estudios *in vitro* e *in vivo*, mediante esos experimentos han demostrado que efectivamente estas células han mostrado tener una alta capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación sobre los tejidos.
- Hasta el momento se conocen dos técnicas en la regeneración pulpar que son de rastreo y trasplante celular; estas técnicas han sido probadas en animales y en dientes extraídos, los cuales aún no se encuentran los tejidos deseados, pero si existe un incremento de tejido. La diferencia es que el procedimiento para la técnica del trasplante celular es más complicada y su costo es muy elevado a comparación con el rastreo celular.
- Las estrategias de rastreo celular para la regeneración de la pulpa necesitan una mayor comprensión si van a convertirse en un enfoque confiable y eficaz en endodoncia.
- Aún se sigue trabajando para mejorar estas técnicas de regeneración pulpar, porque aún no hay un estudio como tal con un protocolo a seguir que asegure la regeneración pulpar, lo único que por el momento existe es un protocolo para el tratamiento con dientes inmaduros mediante revascularización que ayuda al cierre apical.
- Es necesario que los estudios clínicos no solamente se basen en control radiográfico y la sintomatología, sino también el éxito histológico para un resultado más confiable que nos permita considerar que podría ser en un futur un posible plan de tratamiento para la regeneración pupar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sedgley C. Dental Stem Cells and Their Sources. *Dent Clin North Am.* 2012;56(3):549–61.
2. Nakashima M, Lohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Aiji Y. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):1–13.
3. Diogenes A, Teixeira F. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Top.* 2013;28(1):2–23.
4. Mata M, Vázquez G S V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatol y Reprod humana.* 2013;27(3):194–9.
5. Harold E, Bassam M, Atheel M. Regenerative Endodontics and Tissue Engineering. What the Future Holds? *Dent Clin North Am* 2012;56(3):677–89.
6. Gómez de Ferraris M, Carranza A. *Histología bucodental y embriología.* 2da Edición. Argentina: Ed. Médica Panamericana; 2009. 210–234 p.
7. Hargraves KM, Berman LH. *Vías de la pulpa.* 11va Ed. España: Elsevier ; 2016. 532–565 p.
8. Kim S, Zhou J, Solomon C, Zheng Y, Suzuki T, Chen M. Effects of Growth Factors on Dental Stem/Progenitor Cells. *Dent Clin North Am.* 2012;56(3):563–75.
9. Lui J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Wenjun Z, Jianhua Y. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2015;33(3):627–38.
10. Li P, Ling Y, Xue-dong Z. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci.* 2009;1(1):6–12.
11. Luzuriaga J, Pineda J, Irastorza I, Etxebarria V, Gallastegui P, Encinas J. BDNF and NT3 reprogram human ectomesenchymal dental pulp stem cells to neurogenic and gliogenic neural crest progenitors cultured in serum-free medium. *Cell Physiol Biochem.* 2019;52(6):1361–80.
12. Eramo S, Pinna R. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J.* 2018;51(4):405–19.
13. Leyva E Gaitán L. *Patología General Inmunología.* México: TRILLAS; 2008.
14. Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *J Med Life.* 2019;12(3):225–9.
15. Ibáñez R. Ingeniería Tisular en Odontología. *Rev la Asoc Dent Mex.* 2012;69(4):164–7.

16. Deb P, Deoghare A, Borah A, Barua E, Das Lala S. Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. *Mater Today Proc.* 2018;5(5):12909–19.
17. Santiago DE, Salas NL, Urgellés PY, Riesgo CY, Noa YN. Regeneración endodóntica con células madre,. *Medisan.* 2014;18(12):1748–58.
18. Becerra P, Ricucci D, Loguin S, Gibbs J. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J Endod .* 2014;40(1):133–9.
19. Yildirim S. *Dental Pulp Stem Cells.* 1ra Ed. New York: Springer; 2012. 25–78 .
20. Cevallos R, Rodriguez G. Wnt/ β -Catenin/TCF Pathway Is a Phase-Dependent Promoter of Colony Formation and Mesendodermal Differentiation During Human Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cells.* 2018;36(5):683–95.