



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA  
DENTAL PARA REGENERACIÓN TISULAR EN  
ODONTOLOGÍA**

**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:

STEPHANY MONSERRAT MORALES PERALTA

TUTORA: Esp. CAROLINA VEGA RAMÍREZ  
ASESOR: Mtro. ISRAEL MORALES SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Ser que mora dentro de todas las formas de vida, eso que es Todas las Cosas, la fuente eterna de todo lo que nos rodea y que no reduce el infinito invisible a una entidad finita.

En seguida muestro mi reconocimiento a la persona que más me ha impulsado y apoyado en esta vida, mi madre, cuyo amor incondicional ha sido mi motor y a través de quien fluyó la fuente misma de la vida de Dios.

También agradezco a mi Tutora de Tesis la Dra. Carolina Vega Ramírez , al Dr. Israel Morales Sánchez por su tiempo y comprensión durante el tiempo de realización del proyecto. .

A mi hermosa familia, a mis amigas Jesika Canales Pérez, Yamile Márquez Ortiz y Xelha Cruz Bojalil que han sido luz, compañía, apoyo y honestidad absoluta. A Jesús Sánchez Pita que ha sido mi maestro y a lo largo de su vida ha demostrado que podemos levantarnos sobre la base y el denominador común banal, que podemos hablar de temas grandiosos así como de pequeños, temas de peso, así como ligeros, temas profundos así como poco hondos. Él ha logrado llegar a la profundidad de su alma con su arte y así ha alcanzado lo más hondo de la mía.

De manera muy especial agradezco al Universo por enviarme un ser de luz, el cual estoy convencida ha sido enviado por Dios para traerme un mensaje muy particular y ha generado un cambio profundo en mi.

Gracias a todos. Mi vida se ha vuelto mas rica por ustedes.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. EMBRIOLOGÍA DENTARIA	5
3.1 Morfogénesis del órgano dentario	6
3.1.1 Desarrollo y formación del patrón coronario	6
3.1.1.1 Estadio de brote y yema dentaria	8
3.1.1.2. Estadio de Casquete	10
3.1.1.3 Estadio de Campana	13
3.1.1.4 Estadio terminal	23
3.1.2 Desarrollo y formación del patrón radicular	24
4. CÉLULAS MADRE	26
4.1 Definición	26
4.2 Clasificación	26
4.3 Células madre de la Pulpa Dental	34
4.3.1 Localización y origen de las Células Madre de la Pulpa Dental	37

4.3.2 Enfoque del aislamiento de las Células Madre de la Pulpa Dental	39
4.3.2.1 Aislamiento por Tamizaje	40
4.3.2.2 Cultivo de las colonias de las células madre	42
4.3.2.3 Clasificación magnética de células activadas	43
4.3.3 Elementos clave para la Ingeniería Tisular	45
4.3.3.1 Factores de crecimiento	45
4.3.3.2 Proteínas morfogénicas óseas	46
4.3.3.3 Entramado	48
4.3.3.3.1 Requerimientos para un entramado	48
4.3.3.3.2 Tipos de entramados	49
4.3.4 Diferenciación de las células madre de la pulpa dental en odontoblastos	51
4.3.5 Regeneración del complejo dentino-pulpar de las Células Madre de la Pulpa Dental	54
4.3.6 Reconstrucción de un “ <i>Bio-tooth</i> ” a partir de Células Madre de la Pulpa Dental	56
5. CONCLUSIONES	60
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61



## 1. INTRODUCCIÓN.

La biología de células madre se ha convertido en un importante campo para comprender la regeneración tisular y su aplicación en la medicina regenerativa.

Las propiedades de los tejidos humanos son muy diferentes en términos regenerativos, actualmente, el tejido epitelial puede reparar los defectos producidos después de una lesión y regenerarlos a lo largo de toda la vida; el tejido conectivo, como el hueso o el cartílago pueden regenerar sólo pequeños defectos y, en condiciones particulares; el tejido nervioso y muscular, no muestran esta capacidad debido a su alta especialización celular<sup>1</sup>.

Durante la formación de un diente, interacciones epitelio- mesénquima dentro del germen dental en desarrollo inician la diferenciación de una población de células ectomesenquimales en la papila dental a odontoblastos<sup>2</sup>.

Las células odontoblásticas son postmitóticas y son responsables de la secreción de la dentina primaria. Después de la dentinogénesis primaria, estos odontoblastos siguen funcionando y secretan dentina secundaria fisiológica, aunque en menor proporción.

Estas células mantienen la capacidad de responder a estímulos leves provenientes del medio ambiente. Sobreregulan su actividad secretora durante la dentinogénesis conduciendo a la regeneración dentinaria. Si se aplican estímulos más intensos, puede conducir a la muerte de poblaciones de odontoblastos existentes<sup>1</sup>.



En este marco, las células madre son una herramienta prometedora para la reparación tisular, gracias a su extensa proliferación y diferenciación de plasticidad, características que las hacen capaces de regenerar la estructura de los tejidos lesionados.

Uno de los principales problemas del uso terapéutico de células madre sigue siendo la identificación de los lugares de acceso dentro del cuerpo humano al igual que la recolección de una cantidad suficiente de células madre.

Un requisito que deben cumplir las células madre es la capacidad de proliferar con el fin de reparar los defectos macroscópicos y representar una alternativa terapéutica, pero esta capacidad de proliferación tiene que seguir un predeterminado esquema<sup>2</sup>.

Además de nutrientes e interacciones sistémicas *in situ*, son requeridos tres ingredientes clave para la regeneración tisular: células madre, un apropiado material de entramado y factores de crecimiento.

Debido al fácil acceso quirúrgico las células madre de pulpa dental han demostrado ser eficaces por ofrecer los siguientes requisitos: una baja morbilidad del sitio anatómico posterior a su recolección, gran eficiencia de los procedimientos para su extracción del tejido pulpar, su capacidad de diferenciación, y la interactividad con biomateriales para su aplicación en la ingeniería tisular.

La identificación de las poblaciones de las células madre dental, han sido capaces de regenerar estructuras bien organizadas y similares a los tejidos dentinarios, incrementado el interés en el uso potencial de las terapias basadas en células madre para regenerar tejidos dentales después de un traumatismo o enfermedad<sup>1</sup>.



## 2. ANTECEDENTES.

En el año de 1990 se inició el proyecto el Genoma Humano financiado en Estados Unidos por el Instituto Nacional de Salud y el departamento de energía en Inglaterra por la Universidad de Cambridge.

La disponibilidad en los mapas físicos y genéticos aceleró considerablemente la identificación de genes involucrados en desórdenes producidos por un gen único. Mientras que hasta 1990 solo se identificaron 10 de estos genes, en el año 1997 el número creció a mas de 100 genes identificados.

El ADN de todos los individuos humanos es idéntico en el 99.9%. Se espera que el 0.01% restante de variación pueda proveer mucha información acerca del riesgo de contraer enfermedades.<sup>1</sup>

Debido a que cada una de las enfermedades que padece el hombre tiene una base genética (con excepción del trauma), las implicaciones de este proyecto son tan profundas que han dividido la historia de la medicina en dos: “antes y después del genoma humano”. El genoma humano describe el lenguaje del código genético en la cual están escritas las instrucciones del ADN.<sup>1,2</sup>

Las estrategias utilizadas para hacer el análisis a gran escala del ADN y del ARN también son aplicables a proteínas para caracterizar su estructura, cantidad y localización dentro de la célula así como también las modificaciones postranslacionales y los patrones de interacción. Por esta razón ya se viene realizando el “proteoma humano”, que intenta describir todas las funciones e interacciones de las proteínas dentro del organismo.



Las proteínas activan numerosas enzimas que provocan las reacciones químicas que tienen lugar en los organismos vivos. La realización de este proyecto es de mayor complejidad que la del proyecto genoma humano.<sup>2</sup>

Todos los avances que han generado el proyecto genoma humano tiene implicaciones éticas, legales y sociales, por esta razón desde el inicio del proyecto se destinó el 5% de los recursos para el programa “ELSI”, que se encarga de estudiar las implicaciones culturales, filosóficas, sociales, éticas y legales de la información derivada de esta investigación.

La ingeniería tisular es un campo emergente multidisciplinario que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que pueden restaurar, mantener, o mejorar la función tisular.<sup>1</sup>

El propósito es plantear la forma por la cual, la terapia génica, la terapia con células madre mesenquimatosas (Stem cell), la ingeniería biomédica, la farmacogenómica y la robótica podrían cambiar radicalmente el ejercicio de la odontología en el presente siglo<sup>2</sup>.



### 3. EMBRIOLOGÍA DENTARIA

En el curso del desarrollo de los órganos dentales humanos aparecen sucesivamente dos clases de dientes: los dientes primarios y los 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.

Poseen una forma determinada de acuerdo con el diente al que darán origen y tienen una ubicación precisa en los maxilares, pero todos poseen un plan de desarrollo común que se realiza en forma paulatina.<sup>3</sup>

Las dos capas germinativas que participan en la formación de los dientes son: el epitelio de origen 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.<sup>3</sup>

Este ectomesénquima ejerce su acción inductora sobre el epitelio bucal de (origen ectodérmico) que reviste el estomodeo o cavidad bucal primitiva.



La actividad inductora del mesénquima ejercida por diversos factores químicos en las distintas fases del desarrollo dentinario y la interrelación, entre el epitelio y las diferentes estructuras de origen ectomesenquimático (surgen como consecuencia de la odontogénesis), conducen hacia una interdependencia tisular o interacción epitelio-mesénquima, mecanismo que constituye la base del proceso de formación de los dientes<sup>4</sup>.

En este proceso se pueden 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 poblaciones celulares, epiteliales y mesenquimatosas, implicadas en el proceso y la histogénesis o citodiferenciación que conlleva la formación de los distintos tipos de tejidos dentarios: el esmalte, la dentina y la pulpa en los patrones previamente formados<sup>3</sup>.

### **3.1. Morfogénesis del órgano dentario.**

#### **3.1.1. 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 la 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, 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. Se postula hoy que la membrana basal constituye un factor importante para la diferenciación celular y organogénesis dental.<sup>4</sup>

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, se agrandan rápidamente, degeneran y forma una hendidura que constituye el surco vestibular, entre el carrillo y la 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 correspondientes a los 20 dientes deciduos. De esta lámina también se originan los treinta y dos gérmenes de la dentición permanente alrededor del quinto mes de gestación.

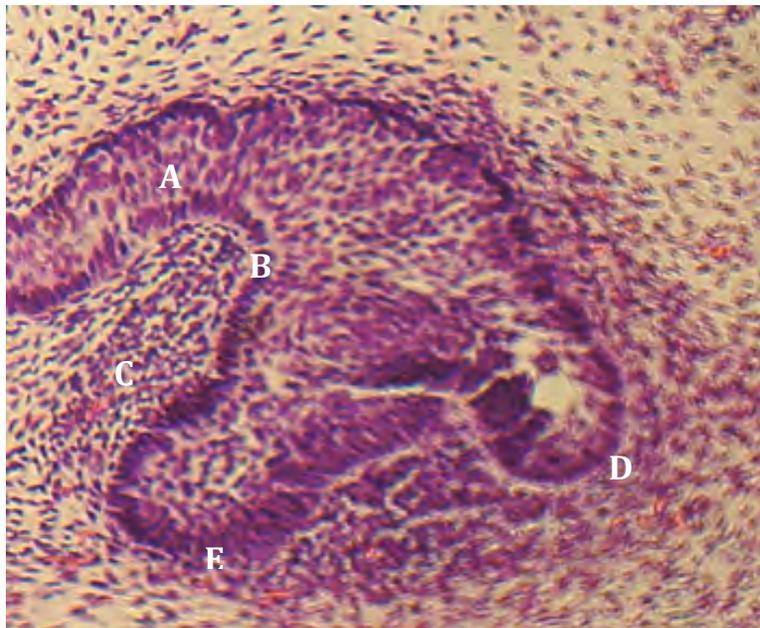
Los primordios se sitúan por lingual o palatino en relación a los elementos primarios. Los molares se desarrollan por extensión distal de la lámina dental. El indicio del primer molar permanente existe ya en el cuarto mes de vida intrauterina. Los molares segundo y tercero comienzan su desarrollo después del nacimiento alrededor de los cuatro o cinco años de edad.

Los gérmenes dentarios siguen en su evolución una serie de etapas que, de acuerdo a su morfología, se denominan: estadio de brote macizo (o yema), estadio de casquete, estadio de campana, estadio de folículo dentario, terminal o maduro.<sup>3</sup>

### 3.1.1.1 Estadio de brote y yema dentaria.

El periodo de iniciación y proliferación es breve y casi a la vez aparecen 10 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 de epitelio en las que asienta el crecimiento potencial del diente.

Estos serán los futuros órganos del esmalte que darán lugar al único de naturaleza ectodérmica del diente, el esmalte.<sup>4</sup> La estructura de los brotes es simple, en la periférica se identifican células cilíndricas y en el interior son del 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 que dará origen a la futura papila dentaria (Fig. 1).

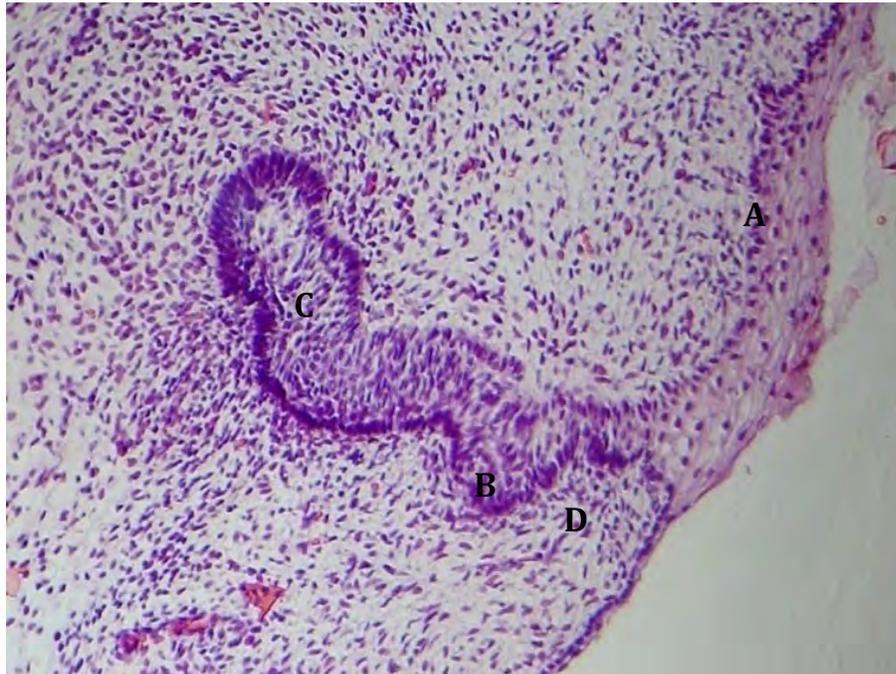


**Figura 1.** Sector de la mucosa bucal embrionaria. A) Epitelio estratificado plano con células que contienen gránulos de glucógeno, B) Lámina basal, C) Corión, D) Lámina dental E) Lámina Vestibular.

Cortesía del Mtro. Israel Morales Sánchez.

Desde el punto de vista histoquímico esta etapa se caracteriza en un alto contenido glucógeno, típico de los epitelios en proliferación. Las granulaciones ácido peryódico de Schiff (PAS<sup>+</sup>) son abundantes en las capas intermedias y muy escasas o nulas en las células basales.<sup>3</sup>

Se destaca nítidamente la positividad del PAS de la membrana basal. Las técnicas histoquímicas ponen de relieve la presencia de ARN y de fosfatasa alcalina en las células del estadio en brote y en menor proporción e intensidad que en el resto de los estadios<sup>3</sup> (Fig. 2).



**Figura 2.** Formación del diente permanente en la etapa de brote. HE. A) Lámina dental, B) Restos de la Lámina Dental del diente Primario, C) Brote, D) Ectomesénquima.

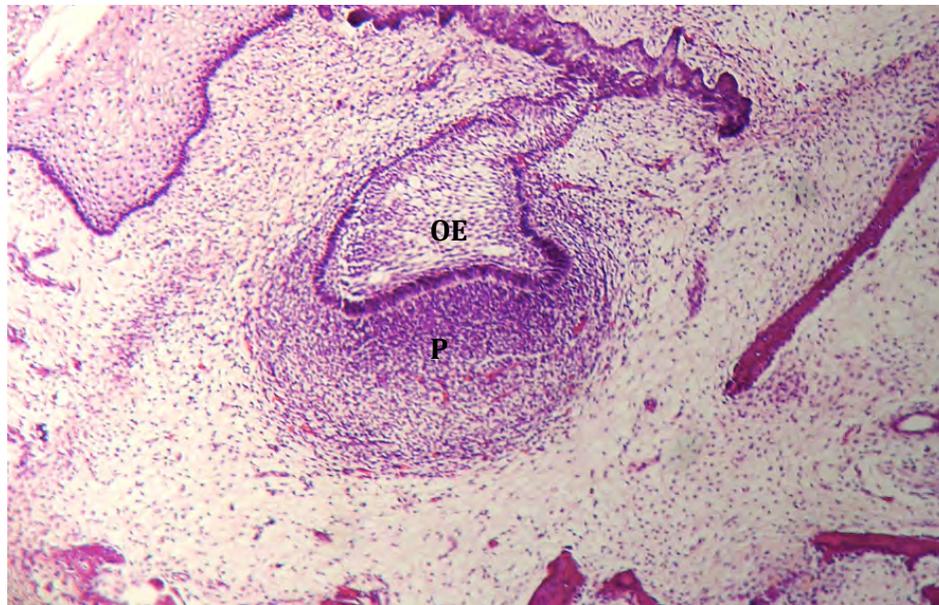
Cortesía del Mtro. Israel Morales Sánchez.

### 3.1.1.2 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 (Fig. 3).

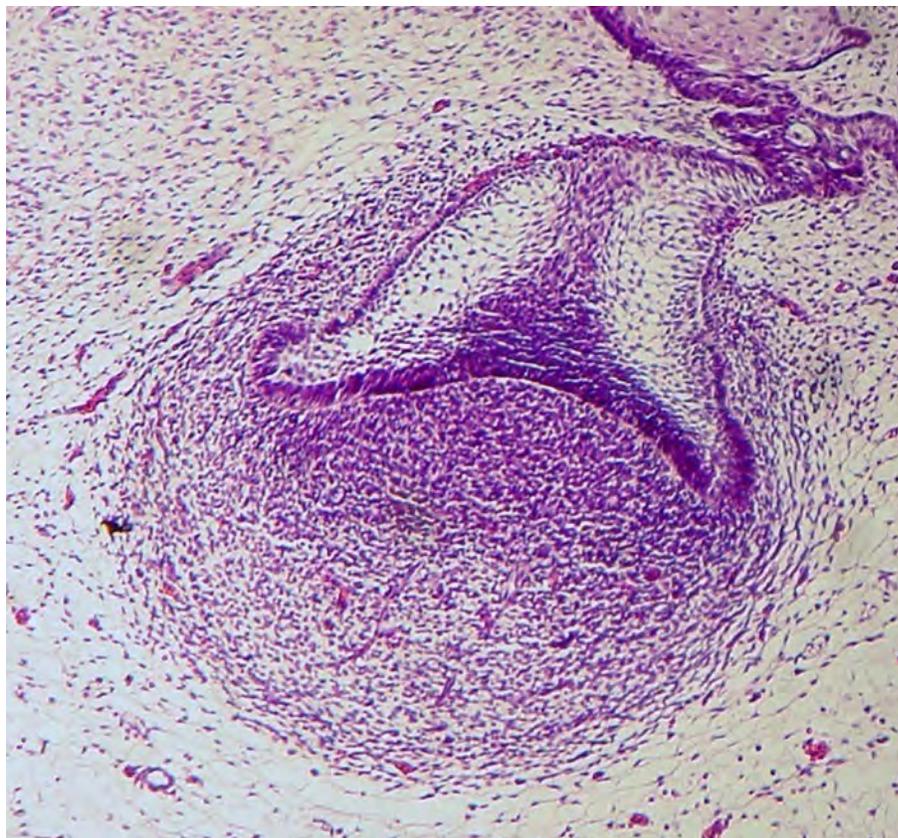
El tejido mesenquimático que se encuentra inmediatamente por fuera del casquete, rodeándolo casi en su totalidad, salvo en el pedículo (que une el órgano del esmalte con el epitelio originario o lámina dental) también se condensa volviéndose fibrilar y forma el saco dentario primitivo o folículo dental. El órgano del esmalte, la papila y el saco constituyen en conjunto el germen dentario.<sup>3</sup>



**Figura 3.** Etapa inicial de casquete: OE (órgano del esmalte) P (papila dental).  
Cortesía del Mtro. Israel Morales Sánchez.

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 termina 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. Se las vincula con la morfogénesis coronaria<sup>3</sup>. 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 (Figs. 4 y 5). En los dientes molares multicuspídeos existen nudos de esmalte secundarios que regulan la morfogénesis de cada región cuspídea.<sup>3</sup>

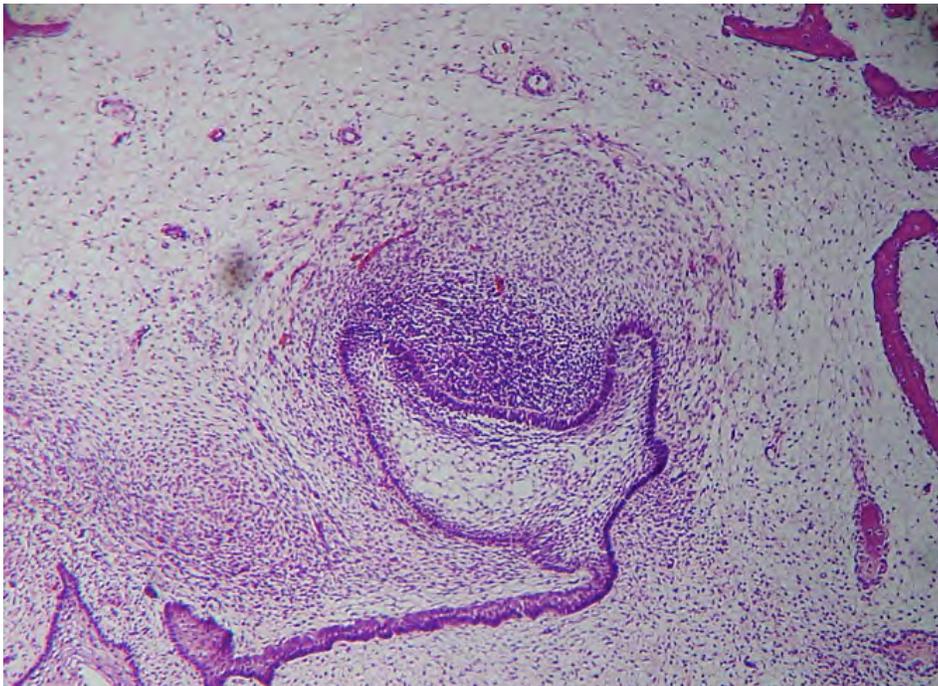


**Figura 4.** Estadio de casquete inicial.  
Cortesía del Mtro. Israel Morales Sánchez.

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

1. Órgano del esmalte. Origen ectodermo
  - a) Epitelio externo
  - b) Retículo estrellado
  - c) Epitelio interno o preameloblástico
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. <sup>5</sup>



**Figura 5.** Etapa terminal de casquete.  
Cortesía del Mtro. Israel Morales Sánchez.



### 3.1.1.3 Estadio de Campana

Ocurre durante las catorce a dieciocho semanas de vida intrauterina. Se acentúa la invaginación del epitelio interno adquiriendo el aspecto químico de una campana.

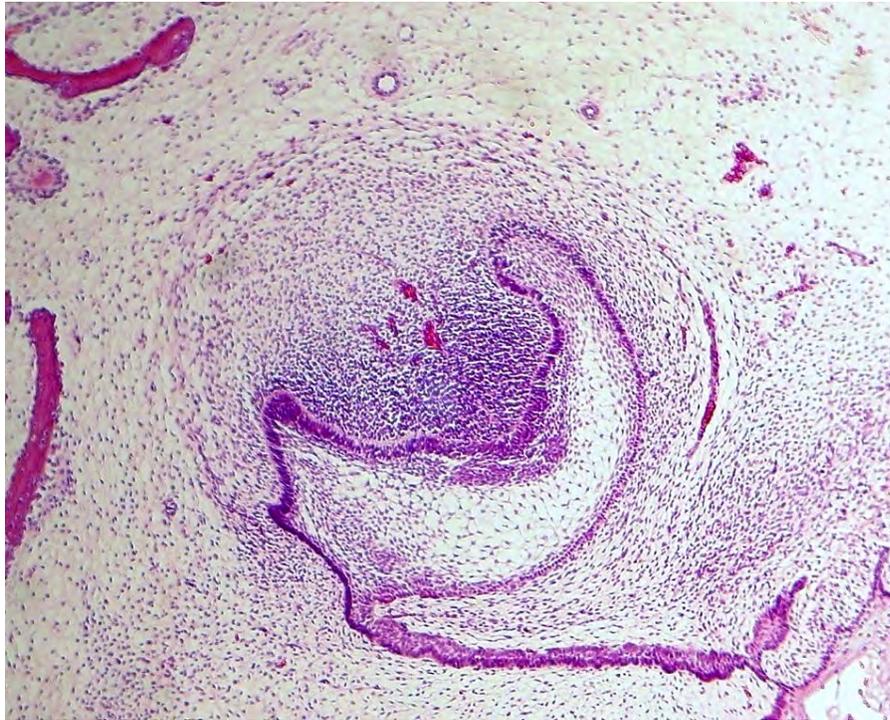
En este estadio es posible observar modificaciones estructurales e histoquímicas del órgano del esmalte, papila y saco dentario respectivamente.

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. 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<sup>3</sup> (Fig. 6).

De manera en este periodo embrionario el órgano del esmalte esta constituido por:

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



**Figura 6.** Campana inicial.

Cortesía del Mtro. Israel Morales Sánchez.

**a) 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 mas evidente en la fase previa al comienzo de la secreción del esmalte.

**b) 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.



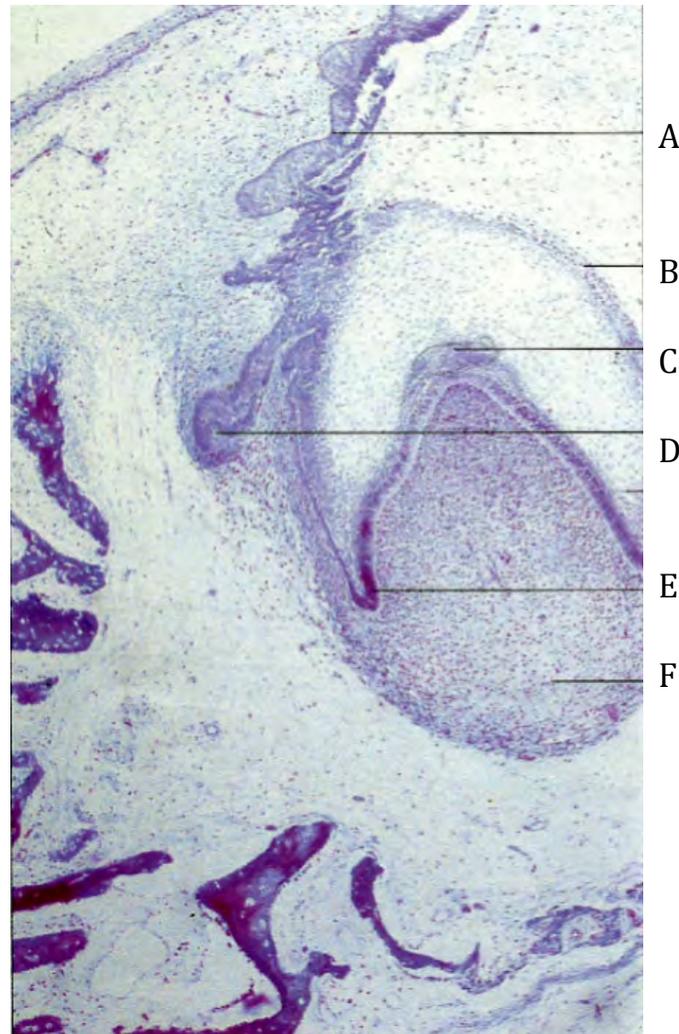
Esta reducción del aporte nutricio ocurre en el momento en que las células del epitelio interno están por segregar esmalte, por lo que hay una demanda aumentada de nutrientes, para satisfacerla, el retículo estrellado, se adelgazara permitiendo un mayor flujo de elementos nutricionales desde los elementos 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 del mismo. <sup>3</sup>

**c) Estrato Intermedio:** Entre el epitelio interno y el retículo estrellado, aparecen varias capas de células planas; es el estrato intermedio. (Fig.7)

Este estrato es mas evidente por el mayor número de capas celulares por en el sitio que corresponderá a las futuras o cúspides o bordes incisales. En general, está formado por cuatro o cinco hileras de células planas con núcleos centrales alargados. <sup>3</sup>

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. <sup>4</sup>

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. <sup>5</sup>



**Figura 7.** Forma del diente en la etapa de campana inicial.

A) Lámina dental, B) Epitelio dental interno, C) Brote del diente permanente, d) Retículo estrellado, E) Epitelio interno del órgano del esmalte, F) Papila dentaria.<sup>3</sup>

Las células planas del estrato intermedio mantienen relaciones intercelulares, a través de desmosomas, tanto con células del retículo, como con los ameloblastos. Cada célula del estrato intermedio está, al parecer, relacionada con seis ameloblastos<sup>4</sup> (Fig.8).

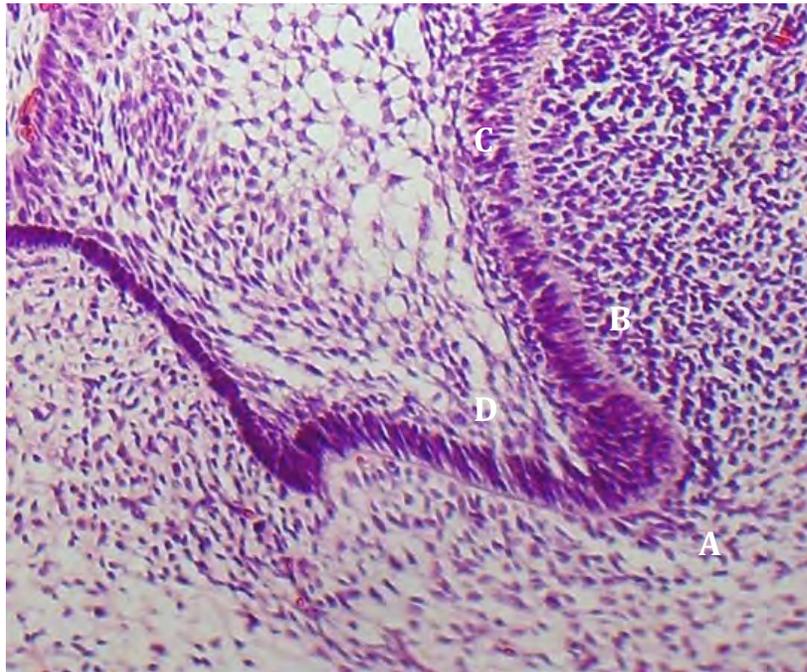


**Figura 8.** Etapa de campana inicial.

A) Tejido óseo en formación, B) brote del diente permanente, C) Asa cervical, D) Papila dentaria, E) Epitelio dental interno, F) Estrato intermedio, G) Retículo estrellado, H) Saco dentario. No se detectan odontoblastos<sup>3</sup>.

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 del calcio, del medio extracelular al esmalte en formación, este estrato participa en la secreción y generalización del esmalte.

**d) Epitelio interno:** Las células del epitelio interno o preameloblastos se diferencian en ameloblastos jóvenes, son células cilíndricas bajas y sus organoides no presentan aún es esta fase una orientación definida. En este periodo morfogénético, 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 lámina basal ameloblástica<sup>3</sup> (Fig.9).

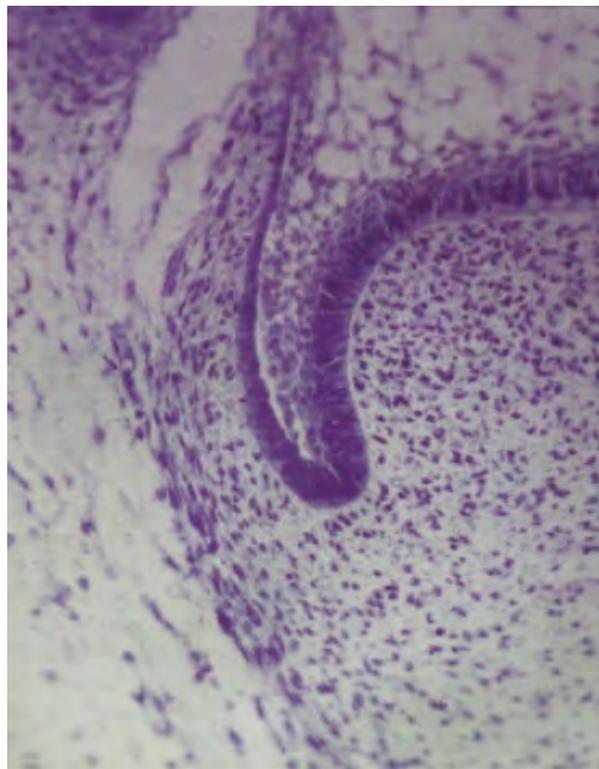


**Figura 9.** Detalles del borde cuspídeo. A) Retículo estrellado, B) Estrato intermedio, C) Epitelio dental interno, D) Papila dentaria.

Cortesía del Mtro. Israel Morales Sánchez.

*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<sup>4</sup> (Fig.10).

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 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.<sup>5</sup>



**Figura 10.** Detalle de asa cervical<sup>3</sup>.

Al avanzar el 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 formar 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.

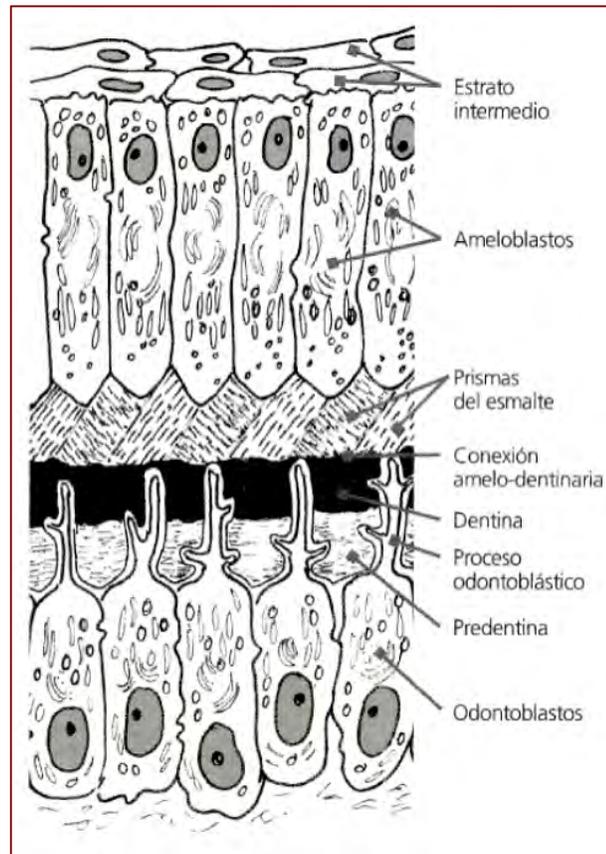
Microscópicamente lo más evidente es la migración del núcleo de su localización central a la región distal de la célula próxima al estrato intermedio.

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 o maduros<sup>3</sup> (Fig.11).

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 flúorese 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.<sup>4</sup>

**Papila dentaria:** la diferenciación de los odontoblastos se realiza a partir de las células ectomesenquimáticas de la papila que evoluciona transformándose primero en preodontoblastos, luego en odontoblastos jóvenes, y por último, en odontoblastos maduros o secretores.



**Figura 11.** Disposición de ameloblastos y odontoblastos secretores<sup>3</sup>.

Estos adoptan una forma cilíndrica de 40  $\mu\text{m}$  de alto un diámetro medio de 4 a 8  $\mu\text{m}$ , con un núcleo polarizado hacia la región distal de la célula. Es su extremo proximal o libre (futuro polo secretor) se diferencia una prolongación citoplasmática única que queda localizada en plena matriz dentinaria, llamada prolongación principal, proceso odontoblástico o prolongación odontoblástica.

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 condroitina sulfato responsable de se metacromasia.<sup>3</sup>

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 penetran 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.<sup>4</sup>

**Saco dentario:** en la etapa de campana es cuando más se pone de manifiesto su estructura. Esta formado por dos capas: una interna célulo-vascular y otra externa o superficial con abundantes fibras colágena y precolágenas 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 mesenquimáticas indiferenciadas derivarán los componentes del 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 la otra a la papila, donde los vasos y nervios atraviesan el saco para distribuirse por la misma.

También en esta 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.<sup>3</sup>

### **3.1.1.4 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 (Fig.12).



**Figura 12.** Etapa de campana aposicional <sup>3</sup>.

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 alternan periodos de actividad y reposo a intervalos definidos.<sup>3</sup>

Una explicación adicional de la adhesión puede estar relacionada con la disposición de las fibras colágenas tipo I en la dentina, perpendiculares al borde amelodentinario en conexión con la fibronectina presente en el esmalte maduro. El contacto entre colágeno y fibronectina puede contribuir a la estabilidad entre la dentina y el esmalte, gracias al dominio adhesivo del colágeno sobre la molécula de fibronectina.<sup>4</sup>

Una vez formado el patrón coronario y comenzado el proceso de histogénesis dental mediante los mecanismos de dentinogénesis y amelogénesis, de forma centrífuga la primera y centrípeta la segunda, comienza el desarrollo y la formación del patrón 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.<sup>3</sup>

### **3.3 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 del 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 del mesénquima papilar, los odontoblastos radiculares. 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 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 origen del revestimiento epitelial de los quistes radiculares.

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.<sup>3</sup>



## 4. Células Madre.

### 4.1 Definición

Una **célula madre** ha sido considerada la célula mas importante para la regeneración en medicina y se caracteriza por dar origen a células hijas idénticas a ella mediante división celular <sup>6</sup>. La célula madre tiene capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir células de uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad<sup>7</sup>.

### 4.2 Clasificación

Una célula madre posee la capacidad de replicarse y diferenciarse dando lugar a diversos tipos de células especializadas. Se pueden clasificar según:

- a) Su potencial de diferenciación, en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.
- b) Su tejido de origen en células madre embrionarias o adultas.
- c) Su capacidad de re-población tisular *in vivo* en corto, medio o largo plazo de regeneración<sup>7</sup>.

Los términos usados para definir una célula, obedecen al comportamiento de éstas en condiciones *in vivo* o *in vitro*<sup>8</sup> de ahí que existan diversas clasificaciones. De acuerdo al tipo de tejido que originan, existen cuatro tipos de células madre: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes.<sup>7</sup>



El término totipotencial (del latín *totus*, que significa completo) hace referencia al potencial que tienen estas células para generar un embrión completo (tejido embrionario y extraembrionario) y posee la capacidad de convertirse en cualquier tipo de célula en el cuerpo<sup>7</sup>. Como se puede observar en el primer paso de desarrollo humano donde el huevo o cigoto recién fecundado comienza a dividirse produciendo un grupo de células madre llamadas embrión. Estas primeras células madre son totipotentes<sup>9</sup>.

El término Pluripotencial (del latín *plures*, que significa muchos o varios), es utilizado para describir las células madre pluripotentes que pueden dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo. Es importante destacar que para que una célula madre pueda considerarse como pluripotente tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vivo* e *in vitro* de las células en que se ha diferenciado y finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de éstas en el tejido blanco, tanto en presencia como en ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta<sup>7</sup>.

Identificamos que en los cinco días posteriores a la fertilización, el embrión forma una estructura similar a una pelota hueca conocida como blastocisto. En etapa de blastocisto el embrión contiene dos tipos de células: en la capa exterior de trofoblastos que eventualmente formará la placenta, y una capa interior de células conocidas como la masa celular interna que llegará a convertirse en embrión y se desarrollará en un organismo maduro. Las células madre embrionarias en el blastocisto son pluripotentes, es decir, que tienen la capacidad de llegar a convertirse casi en cualquier tipo de célula en el cuerpo.<sup>9</sup>



Después de ocho semanas de desarrollo, el embrión es referido como un feto. Por este tiempo ha desarrollado una forma humana. Las células madre en el feto son las responsables del desarrollo inicial de todos los tejidos antes del nacimiento. Como las células madre embrionarias, las células madre fetales son pluripotentes.<sup>9</sup>

Las células madre multipotenciales son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados solamente con una de las tres capas embrionarias. El cordón umbilical es la línea de vida que transporta nutrientes y sangre rica en oxígeno desde la placenta hacia el feto. La sangre del cordón umbilical contiene células madre que son genéticamente idénticas al bebé recién nacido. Las células madre del cordón umbilical son multipotentes, es decir, ellas pueden diferenciarse en un rango limitado de tipos celulares. Las células madre del cordón umbilical pueden ser almacenadas criogénicamente después del nacimiento para su uso en la terapia médica del futuro.<sup>7</sup>

El término de células madre adultas suele ser bastante confuso porque los lactantes y los niños también contienen células madre adultas. Por lo tanto el término Células Madre Postnatal es preferible. Estas células residen en los tejidos que ya se han desarrollado, dirigiendo su crecimiento y manteniéndose a lo largo de la vida. Estas células son multipotentes.<sup>9</sup>

La última categoría corresponde a las células madre unipotenciales, son células que solo pueden generar células hijas que se diferencian a lo largo de una sola línea celular, tal como su nombre lo refiere (del latín *unus*: uno)<sup>7</sup>.



Ahora si las células madre se clasifican de acuerdo al tejido de donde se pueden obtener, estas pueden proceder del embrión o de un organismo adulto, de ahí que se hable de células madre embrionarias y células madre adultas. Ellas son células no especializadas capaces de renovarse a si mismas y bajos ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, ellas pueden ser dirigidas a más linajes especializados comprometidos.<sup>7</sup>

Sin embargo, las células madre tienen diferente potencial: solo los primeros embriones recuperables de ovocitos fertilizados y los descendientes de las primeras dos divisiones son realmente totipotentes capaces de dividirse sin diferenciación por un prologado periodo en cultivo, y capaz de formar cualquier tipo de tejido embrionario y extraembrionario<sup>10</sup>. Las células madre embrionarias pueden ser obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión cuando el óvulo fecundado es una esfera compacta o mórula<sup>11</sup>; estas son entonces precursores totipotenciales con capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro*.

Las células madre embrionarias (derivadas del blastocisto) y las células embrionarias germinales (derivadas postimplantación del blastocisto) son similares en muchos aspectos: ambos tipos de células son capaces de replicarse y dividirse en cultivos por largos periodos de tiempo sin mostrar alteraciones cromosómicas, además expresan una serie de marcadores característicos de progenitores totipotenciales que facilitan su identificación: sin embargo, las células madre embrionarias derivadas del blastocisto y las células madre germinales difieren del tejido de donde provienen y de su comportamiento *in vivo* ya que las células madre embrionarias son capaces de generar teratomas mientras que las células germinales humanas no <sup>7</sup>.

Además de las células embrionarias se han identificado células madre adultas que se pueden encontrar en la mayoría de los tejidos de un individuo totalmente desarrollado como la médula ósea, el sistema neuronal, el sistema gastrointestinal, hígado, páncreas, el músculo esquelético, el músculo cardíaco y el pulmón.

En un principio se pensó que las células madre adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a un tipo celular procedente de su mismo tejido de origen o al menos de su misma capa embrionaria; sin embargo, esta idea ha sido reevaluada por varios grupos de investigadores cuyos estudios sugieren que las células madre adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen<sup>12</sup>.

Esta “capacidad biológica”, propia de estas células adultas, se fundamenta en la habilidad que tienen de alterar drásticamente su fenotipo en respuesta a los cambios del microambiente donde se desarrollan, y se le conoce como fenómeno de **plasticidad**<sup>13</sup> (Fig.13).

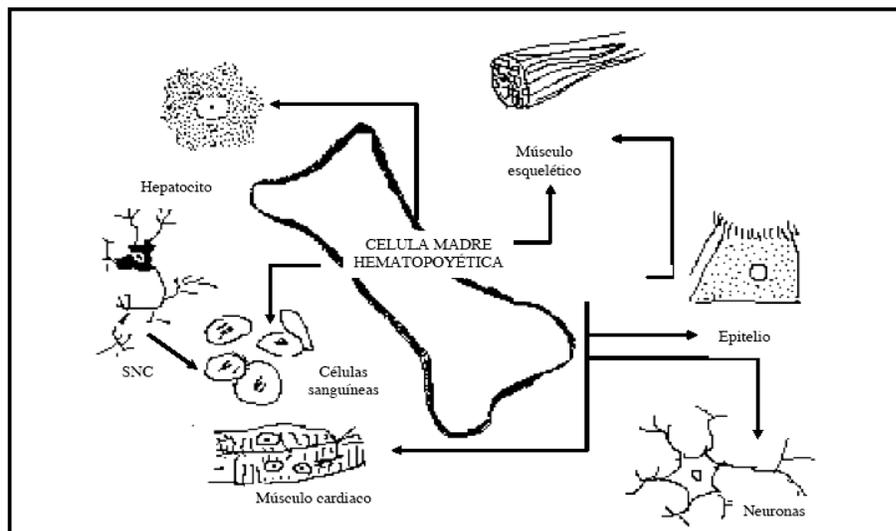
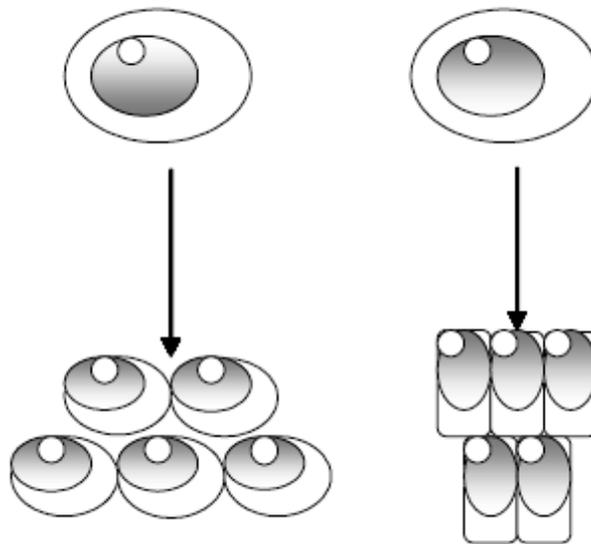


Figura 13 . Plasticidad de las células adultas <sup>7</sup>.

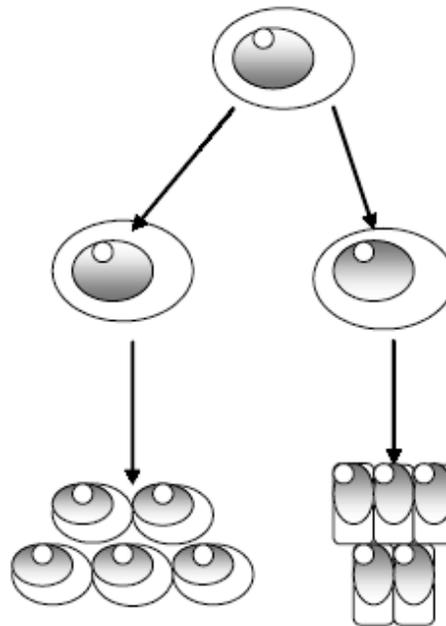
Evidencias obtenidas tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que las células madre adultas, originadas de un tejido determinado, tienen la capacidad de producir células con una expresión fenotípica característica de otros tejidos cuando se transfieren a un microambiente diferente al original.

Existen cuatro modelos que explican los posibles mecanismos que llevan a las células madre adultas a diferenciarse a células de un tejido diferente al original en respuesta a cambios del microambiente o procesos de reparación tisular; el primer modelo es el que corresponde al conocido convencionalmente sobre diferenciación celular en el que una célula progenitora restringida hacia un solo linaje da origen a células de su misma estirpe<sup>7, 13</sup> (Fig.14)



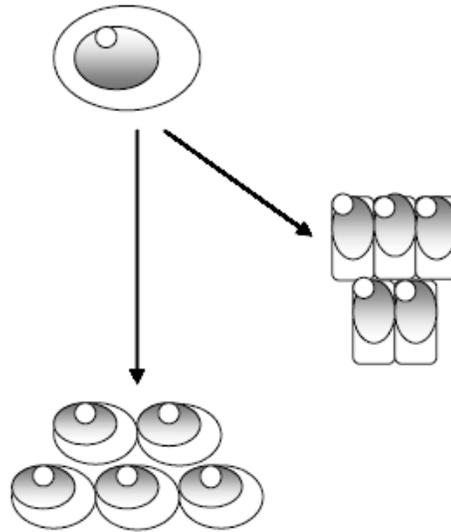
**Figura 14.** Modelo clásico de diferenciación celular<sup>7</sup>.

El segundo modelo se refiere a la capacidad que tiene las células madre adultas de diferenciarse en progenitores más activos en el ciclo celular que pueden dar origen a su vez a células de linajes celulares diferentes, tal es el caso de la célula madre hematopoyética la cual puede regenerar dos progenitores celulares diferentes (progenitor mieloide y progenitor linfoide) que dan origen a su vez a linajes celulares diferentes (Fig. 15).



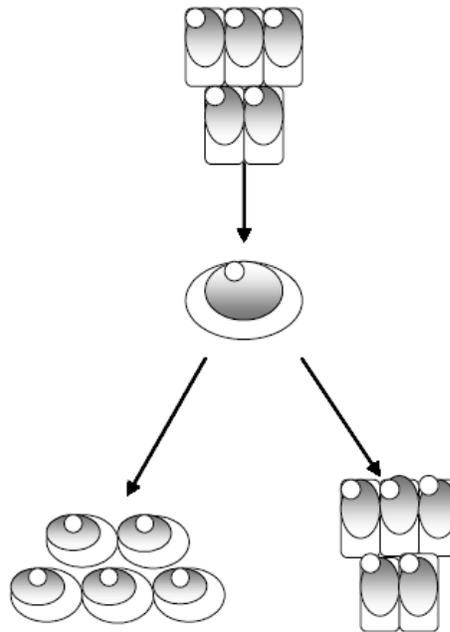
**Figura 15.** Modelo de diferenciación celular para precursores comprometidos.<sup>7</sup>

En el tercer modelo, conocido como trans-diferenciación, las células madre de un tejido particular bajo condiciones de un microambiente diferente al original, adquieren la capacidad de generar células de muy diversos linajes.<sup>7,13</sup> (Fig.16).



**Figura 16.** Modelo de trans-diferenciación<sup>7</sup> . I

El último modelo hace referencia a la capacidad que poseen las células maduras de diferenciarse y re-diferenciarse a células del mismo tejido que le dio origen a un tejido diferente<sup>7,13</sup> (Fig.17).



**Figura 17.** Modelo de diferenciación y re-diferenciación.<sup>7</sup>



### 4.3 Células madre de la pulpa dental.

Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado cinco diferentes tipos de células madre dentales humanas, como lo son: las Células Madre de Pulpa Dental (DPSCs), las Células Madre de dientes deciduos exfoliados (SHEDs), las Células Madre del Ligamento Periodontal (PDLSCs), las Células Madre de la papila apical (SCAPs), y las Células Progenitoras del Folículo Dental (DFPCs).

Estas poblaciones postnatales tienen Células Madre Mesenquimales (MSCs). Estas células poseen dos cualidades; la capacidad de autorrenovarse y el potencial de diferenciarse en diferentes linajes celulares.

Las Células Madre Mesenquimales (MSCs) derivadas de la médula ósea (BMMSCs) son capaces de dar lugar a varios linajes de células, como células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas, miogénicas y neurogénicas. Las células madre derivadas del tejido dental, son aisladas desde tejido especializado con capacidades potentes de diferenciarse en células odontogénicas. Sin embargo, ellas también tienen la capacidad de dar origen a otros linajes celulares similares <sup>14</sup>.

Investigaciones referentes a sus características y a su potencial de diferenciación se han convertido en uno de los tópicos más importantes dentro del campo de la odontología.

Se considera que las células madre dentales son células mesenquimales indiferenciadas presentes en los tejidos de la pulpa dental y caracterizadas por su autoregeneración ilimitada, por su capacidad para formar colonias, y por su diferenciación multipotencial. Las características biológicas de las diferentes DPSCs se resumen en la *Tabla 1* <sup>15</sup>.



Propiedades	Células madre de la Pulpa dental	Células madre de la Papila Apical	Células madre de dientes deciduos exfoliados
Lugar	Pulpa de dientes permanentes	Papila apical de raíz en desarrollo	Pulpa de dientes deciduos exfoliados
Marcadores específicos	No determinado	No determinado	No determinado
Tasa de Proliferación	Moderado	Alto	Alto
Heterogenicidad	Sí	Sí	Sí
Multipotencialidad	Odontoblastos, osteoblastos, condorcitos, miocitos, neurocitos, adipositos, células del epitelio corneo, células de melanoma, célula madre, pluripotente, inducida iPS.	Odontoblastos, osteoblastos, neurocitos, adipositos, iPS.	Odontoblastos, osteoblastos, condorcitos, miocitos, neurocitos, adipositos, iPS.
Posibles contribuciones para enfermedades sistémicas	Regeneración ósea, Degeneración nerviosa central, fibrosis hepática, infarto al miocardio, reconstrucción corneal	Regeneración ósea	Regeneración ósea.
Posibles contribuciones para tejidos dentales.	Dentina, Pulpa.	Dentina, Pulpa y Raíz.	Dentina, Pulpa.

**Tabla 1.** Tipos de células madre en la pulpa dental.<sup>15</sup>



Generalmente, las DPSCs mantienen características comunes de células madre adultas. (a) Las células madre de la pulpa dental están usualmente en un estado de reposo en la pulpa dental, y pueden realizar constantemente divisiones celulares durante lesiones y/o regeneraciones tisulares. (b) Tienen dos tipos de patrones de crecimiento, es decir, la división simétrica y asimétrica. pueden dividirse en dos células madre hijas idénticas por división celular simétrica, o dar origen a una célula madre hija inalterada y una célula madre con capacidad de autorrenovación limitada por división celular asimétrica (c) El crecimiento clonal es otra de las características importantes de las DPSCs. Una sola célula madre puede generar un grupo de células hijas genéticamente idénticas *in vitro*. (d) Durante el paso del cultivo a largo plazo, las DPSCs *in vitro* pueden perder su naturaleza de células madre incluyendo la autorrenovación y la capacidad de diferenciación múltiple. Esto es principalmente porque el medio de cultivo de rutina no puede simular completamente los nichos *in situ* de estas células madre. Además, debido a la capacidad de diferenciación multipotencial, algunos factores de crecimiento en el medio o suero pueden inducir su diferenciación espontánea *in vitro*.

Además de sus aplicaciones potenciales en el tratamiento sistémico de enfermedades, las DPSCs han sido extensivamente estudiadas en el área de regeneración dental y se cree que son supuestos candidatos para ingeniería tisular dental, además de: (a) el fácil acceso quirúrgico a la colección de sitios y la baja morbilidad después de la extracción de la pulpa dental; (b) Las DPSCs autólogas puede ser eficientemente aisladas y amplificadas a partir de un molar impactado o un diente temporal exfoliado.<sup>15</sup>



Las DPSCs pueden generar más tejido dental típico dentro de un periodo corto en comparación con de las células madre no-dentales, que las hace ser más competentes en la formación de un “*bio-tooth*”<sup>16</sup>; (c) La cantidad de dentina recién formada por *ex vivo* de las DPSCs supera por mucho a la matriz de dentina sintetizada durante toda la vida por los odontoblastos *in situ*; (d) Las DPSCs pueden ser criopreservadas con seguridad y recombinadas con muchos entramados. (e) Las DPSCs parecen poseer privilegios inmunitarios y capacidades antiinflamatorias favorables para los experimentos de alotransplante.

Se abordarán cuestiones, como el origen y el aislamiento de estas células madre, como la diferenciación de odontoblastos y las posibles aplicaciones de DPSCs en la elaboración de un “*bio-tooth*”.<sup>17</sup>

#### **4.3.1 Localización y origen de las Células madre de la Pulpa Dental**

Aunque las DPSCs han sido aisladas de tejidos pulpares en diferentes tipos de dientes incluyendo incisivos primarios exfoliados, dientes permanentes, dientes natales, e incluso dientes supernumerarios. El nicho exacto de donde se originan estas células madre aún no está establecido.

En un punto de vista tradicional, la pulpa dental se compone de cuatro capas, es decir, la zona de odontoblastos, una zona libre de células, una zona rica en células, y la zona central.

La zona rica en células esta altamente poblada con células madre/progenitoras que muestran la capacidad de plasticidad y de diferenciación multipotente que sirve de reservorio para la sustitución de los odontoblastos destruidos.<sup>15</sup>



Estudios han demostrado que la expresión de marcadores de células madre (CD146 y STRO-1) en la pulpa dental se limita a las paredes de los vasos sanguíneos, pero están ausentes en el tejido fibroso circundante, en la capa de odontoblastos y perineuro del nervio, lo que indica que las DPSCs son localizadas en la región perivascular del tejido pulpar.

El marcador celular precursor de estroma positivo (STRO-1) de las DPSCs expresa los antígenos vasculares incluyendo el factor de von Willebrand, CD146, actina músculo liso, y un antígeno asociado al pericito, lo que sugiere que estas células madre pueden ser de origen vascular y su localización histológica puede ser relevante para el sistema microvascular en la pulpa dental.

El análisis de “*microarrays*” de ADN demuestra que las DPSCs humanas comparten el perfil de expresión génica similar con células madre mesenquimales (BMMSCs). Ambos pueden expresar una variedad de marcadores asociados con el endotelio, el hueso y fibroblastos, lo que implica que estas células madre pueden provenir de la médula ósea.<sup>18</sup>

Desde el punto de vista del desarrollo biológico, la cresta neural craneal da origen a la mayoría de los tejidos bucales y dentales incluyendo la pulpa dental.

Por lo tanto, es razonable suponer que las DPSCs se derivan del ectomesénquima de la cresta neural craneal. Se demostró que las DPSCs contienen subpoblaciones de células madre primitivas provenientes de la cresta neural. Estas células madre pueden generar las neuroesferas bajo condiciones de cultivos sin suero.



Nuestro estudio ha demostrado que las DPSCs expresan varios marcadores relacionados con la cresta neural y comparten muchas similitudes con las células madre de la cresta neural craneal (CNCSCs) sobre los aspectos de inmunofenotipos y otros comportamientos biológicos.<sup>15</sup>

Tras el inicio y la maduración del germen dental, se cree que las DPSCs experimentan diferentes etapas de desarrollo, como: células madre ectomesenquimales odontogénicas, células madre de la papila dental, células madre de la pulpa dental, células precursoras de la pulpa dental, preodontoblastos y odontoblastos en diferenciación terminal.<sup>15</sup>

#### **4.3.2 Enfoques del asilamiento de las Células Madre de la Pulpa Dental**

El cultivo es un término que hace referencia al crecimiento y mantenimiento de las células en un ambiente controlado fuera de un organismo. Un éxito en el cultivo de las células madre es que mantiene a las células madre sanas, dividiéndose y no especializándose.

El cultivo de células madre es el primer paso en establecer una línea de células madre que es una colección propagada de células genéticamente idénticas, que pueden ser usadas para la investigación y el desarrollo de terapias. Una vez que de las líneas de células madre se ha establecido, las células madre se pueden activar para diferenciarse en tipos celulares especializados.

Las células madre de la pulpa dental pueden ser cultivadas en dos métodos: el primero es el método de digestión enzimática, en el cual el tejido pulpar es recogido bajo condiciones estériles, digeridas con una enzima apropiada.



Posteriormente las suspensiones de las células resultantes son sembradas en placas de cultivo que contienen un medio especial suplementado con aditivos necesarios y encubados .

Finalmente, las colonias resultantes son subcultivadas antes de la confluencia y las células son estimuladas para diferenciarse.<sup>9</sup> El segundo, es el método de la extensión explante, en el cual los tejidos pulpares extruidos son cortados en cubos de 2mm<sup>3</sup> ,anclado a través de microportadores en un sustrato adecuado, y directamente incubados en placas de cultivos conteniendo el medio esencial con suplementos.

Tiempo suficiente (hasta dos semanas) es necesario para permitir un número suficiente de células para migrar fuera de los tejidos. Se comparó dos métodos y se encontró que las células aisladas enzimas digestivas, tienen un alto índice de proliferación.<sup>9</sup>

Hasta ahora, ningún modelo estable se ha creado para aislar y purificar las DPSCs por la falta de marcadores específicos de la superficie celular. La identificación de DPSCs depende principalmente de las características biológicas, como el volumen de células pequeñas, la capacidad proliferativa, la potente clonogenicidad, la auto-renovación y el potencial de multidiferenciación. Varios métodos han sido desarrollados para aislar células madre de la pulpa dental, las descritas a continuación son las más convencionales.<sup>17</sup>

#### **4.3.2.1 Aislamiento por Tamizaje**

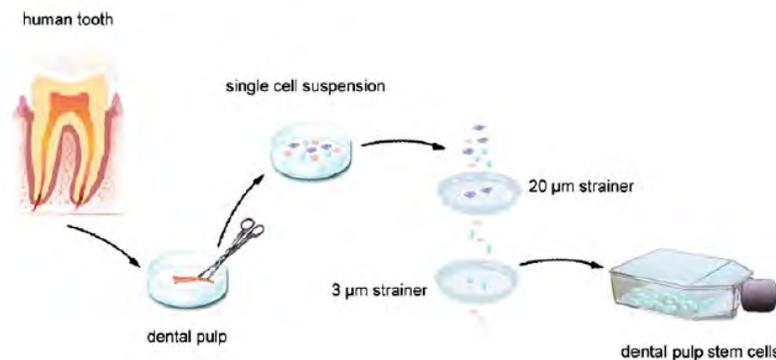
Varios estudios han demostrado que el tamaño pequeño representa una de las características importantes de las células madre adultas.

Las células de pequeño diámetro tienen una mayor viabilidad, capacidad proliferativa y regenerativa que las de mayor diámetro.

El aislamiento por tamizaje de células madre derivada de la médula ósea pueden diferenciarse en hueso, tejido adiposo, cartílago y células neurales. Durante la diferenciación odontoblástica de las DPSCs, el volumen celular incrementó significativamente con un proceso celular largo, implicando que las DPSCs indiferenciadas son poblaciones celulares de diámetro pequeño. La Fig.18 muestra el protocolo de aislamiento por tamizaje para el aislamiento de células madre.<sup>15</sup>

En resumen, todo el tejido de la pulpa dental es ligeramente separado de los tejidos dentales duros y es digerido en una solución de colagenasa tipo I al 3% por 1 hora a 37 °C.

La suspensión de células aisladas es filtrada a través de un colador de 20  $\mu\text{m}$  para eliminar células grandes diferenciadas. A continuación, estas pequeñas células son sembradas en un tamiz poroso de 3  $\mu\text{m}$  para recolectar las células grandes. Esas células en la superficie superior de la placa de 3  $\mu\text{m}$  con un diámetro entre 3  $\mu\text{m}$  y 20 $\mu\text{m}$  son obtenidas para ser cultivadas y amplificadas . Partiendo de este enfoque, las poblaciones de células de tamaño pequeño contienen un alto porcentaje de células madre y pueden aislarse de la suspensión de células aisladas, y por lo tanto DPSCs pueden ser preliminarmente purificadas.<sup>1</sup>



**Figura 18.** Diagrama esquemático de la aislamiento por Tamizaje.<sup>15</sup>

#### 4.3.2.2 Cultivo de la colonia de células madre

El cultivo de colonias es un método clásico para la purificación de células madre a partir de la mezcla celular heterogénea. El cultivo de colonias puede iniciarse desde una suspensión celular disgregada que se realiza directamente a partir de tejidos o células subcultivadas.

Las DPSCs humanas de una colonia celular aislada ha sido extensivamente estudiada, manifestando capacidad de autorrenovación y diferenciación multipotencial<sup>18</sup>. En la siguiente imagen se muestra el protocolo del aislamiento de las DPSC por cultivo de colonias <sup>15</sup> (Fig.19).



**Figura 19.** Cultivo de la colonia de células madre. <sup>15</sup>

Primero, el tejido de la pulpa dental es digerido para preparar la suspensión de células asiladas. A continuación, la suspensión celular es diluida a 100 células/mL y las células de la suspensión se colocan dentro de 96-well de 0,1 mL/well.



Las placas son presembradas con células alimentadoras que puede proporcionar la suficiente densidad celular, nutrición, factores de crecimiento, y la matriz extracelular necesaria para la formación de colonias.

Después de la incubación *in vitro* a 37 ° C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 1-2 semanas, el grupo de colonias aisladas que contienen 50 o más células se digieren y se amplifican para nuevos experimentos.

Las colonias de células madre, particularmente las que se inician directamente a partir de tejidos, son a menudo diferentes en los aspectos de la morfología de la colonia, el tamaño y la densidad celular.

Estas diferencias entre las colonias están asociadas con los tipos de células, las interacciones celulares, el potencial de diferenciación, pasajes de la célula, la composición del medio, los tipos de conexión celular, y las condiciones de cultivo. Además, el cultivo de colonias celulares a partir de una sola célula lleva un tiempo prolongado debido a la velocidad limitada el crecimiento celular.<sup>15</sup>

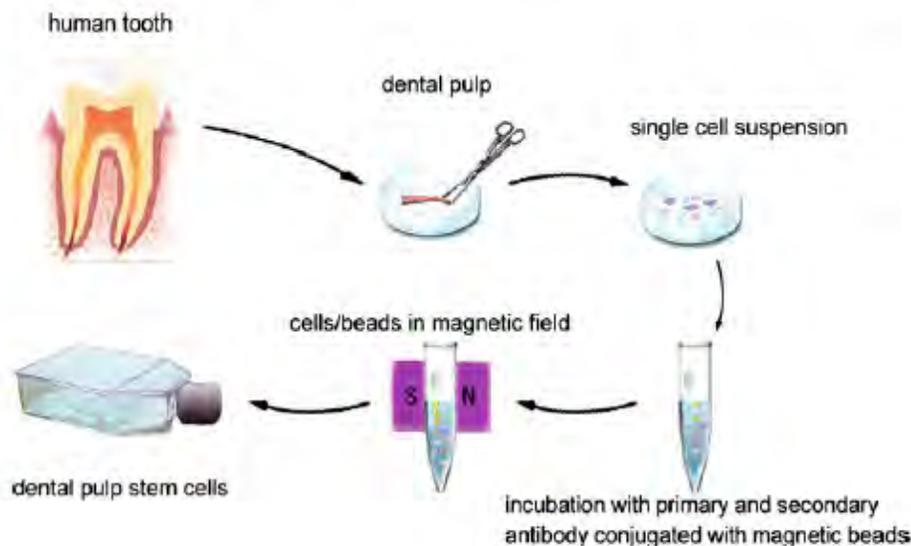
#### **4.3.2.3 Clasificación magnética de células activadas**

La clasificación magnética de células activadas (MACS) es un método de inmunomagnética basado en antígenos de la superficie (CD271, STRO-1, CD34, CD45 y c-Kit) que es utilizado para separar poblaciones de células madre.<sup>18</sup>

Este enfoque ha sido ampliamente utilizado para el aislamiento de muchos tipos celulares diferentes, incluyendo linfocitos, células dendríticas, células fetales en la sangre materna, granulocitos, células megacariocíticas, células asesinas naturales, células T, células tumorales, células epiteliales y células madre hematopoyéticas.

En la siguiente figura se muestra el protocolo de MACS típica para el aislamiento de DPSC <sup>19</sup> (Fig.20).

En primer lugar, la pulpa dental es aislada y la suspensión de células individuales es preparada. En segundo lugar, la suspensión se incubó en el tubo de ensayo con anticuerpos primarios monoclonales contra la superficie molecular de la membrana específica, y subsecuentemente, con partículas inmunomagnéticas.



**Figura 20.** Clasificación magnética de célula activada. <sup>15</sup>

Estas partículas magnéticas se cubren con el anticuerpo secundarios monoclonales necesarios para la búsqueda y la unión a las células blanco. A continuación, la mezcla de células y partículas es colocada en el concentrador magnético de partículas, y las células específicamente vinculadas a las partículas se adhieren a la pared del tubo de ensayo en el campo magnético.



Las células de cordón libre en el sobrenadante se descartan. Por último, las células blanco ligadas a los partículas son recogidas selectivamente al pasar por el campo magnético. Las células resultantes se vuelven a suspender y se cultivan para otros experimentos.

Hasta la fecha, incluyendo varias subpoblaciones de STRO-1<sup>+</sup> y CD271<sup>+</sup> DPSC se han aislado con éxito por el método de MACS.<sup>15</sup>

En términos generales, MACS es técnicamente simple, de bajo costo y capaz de manejar un gran número de células, que proporciona una vía práctica para la selección de linaje específico de células madre progenitoras. Sin embargo, el grado de pureza de células madre no es muy alto, a su vez, puede comprometer la eficiencia de las células madre utilizadas en investigaciones posteriores.<sup>15</sup>

### **4.3.3 Elementos clave para la Ingeniería Tisular**

#### ***4.3.1 Factores de crecimiento***

Los factores de crecimiento son señales secretadas extracelularmente que regulan: la morfogénesis y organogénesis durante las interacciones epitelio-mesenquimal, la división o especialización de las células madre para los deseables tipos celulares, y modulan los eventos celulares clave para la regeneración tisular incluyendo la proliferación celular, quimiotaxis, diferenciación y síntesis de la matriz.

Muchos factores de crecimiento bastante versátiles, simulan la división celular en numerosos tipos celulares, mientras otros son más específicos.<sup>9</sup>



Algunos factores de crecimiento son usados para incrementar la cantidad de células madre, como es el caso del factor de crecimiento derivado de la placenta (PDGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor simulador de colonias (CSF) y el factor de crecimiento epidermal (EGF). Otros modulan la respuesta inmune celular y humoral (Interleucinas 1-13) mientras otros son importantes reguladores de la angiogénesis, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)<sup>19</sup> otros son importantes para la cicatrización de heridas y regeneración e ingeniería tisular, como lo es el factor de crecimiento transformador  $\alpha$  y  $\beta$ . Una familia distinta de factores de crecimiento implicada en el desarrollo y regeneración dental, son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) conocidas por su capacidad para inducir la formación de hueso y cartílago.<sup>9</sup>

#### 4.3.2 Proteínas morfogenéticas óseas

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son factores de crecimiento multifuncionales que corresponden a la superfamilia de factores de crecimiento transformantes  $\beta$ . Las primeras BMPs fueron originalmente identificadas por su capacidad para inducir formación ósea ectópica cuando se implantaron bajo la piel de roedores.

A la fecha, cerca de 20 miembros de la familia de BMPs han sido identificadas y caracterizadas. Ellas tienen diferentes perfiles de expresión, diferentes afinidades para receptores y por lo tanto actividades biológicas únicas *in vivo*.

Durante la formación de los dientes, las BMPs dictan la iniciación, la morfogénesis, la citodiferenciación, y cuándo ocurrirá la secreción de la matriz ósea.



Sin la familia de factores de crecimientos de la BMP, el órgano del esmalte no podría ser formado, y sería poco probable que los dientes se desarrollaran. Las BMPs así como otros factores de crecimiento, han sido usados exitosamente para el recubrimiento pulpar directo. Esto ha animado la adición de factores de crecimiento a las células madre para conseguir el reemplazo de los tejidos enfermos del diente.

Existen dos estrategias para el uso de la BMP para regenerar dentina. La primera es la terapia *in vivo*, donde los genes BMPs o BMP son directamente aplicados a la exposición o amputación de la pulpa. La segunda terapia es *ex vivo*, que consiste en el aislamiento de las DPSCs, su diferenciación en odontoblastos con genes recombinantes BMPs o BMP, y finalmente su transplatación autógena para la regeneración dentinaria.<sup>9</sup>

El papel desempeñado por la BMP-2 es crucial como una herramienta biológica para la regeneración dentinaria. La BMP-2 humana recombinante estimula la diferenciación de célula madre de la pulpa adulta en células similares a odontoblastos en cultivos, aumentando la actividad de la fosfatasa alcalina y acelerando la expresión del gen de la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) de genes *in vitro*, y mejora la formación de los tejidos duros *in vivo*. Además, la transplatación autógena de BMP-2 tratados en cultivos sobre pulpa amputada estimula la formación de dentina reparativa.

Efectos similares han sido demostrados por la BMP-7, también conocida como proteína-1 osteogénica, que promueve la dentinogénesis reparativa y la mineralización de la pulpa en varios modelos de animales. Recientemente, se han generado un BMP-7 expresando un vector adenoviral que induce la expresión de BMP-7 principalmente en cultivos de células humanas de la pulpa dental.



Esta expresión dio lugar a un aumento significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina e indujo la expresión de DSPP, sugiriendo que la BMP-7 <sup>20</sup> puede promover la diferenciación de células de la pulpa humana a células similares a odontoblastos y promover la mineralización *in vitro*.

Sin embargo, un nuevo papel ha sido sugerido por la BMP-4, que es secretada por las células mesenquimales, en la regulación de la vaina epitelial de Hertwing (HERS) durante el desarrollo de la raíz mediante la prevención de la elongación y el mantenimiento de la proliferación celular. Por lo tanto esta ha sido utilizada como un agente para regular la formación radicular de una variedad de aplicaciones empleadas en la ingeniería tisular. <sup>9</sup>

### **4.3.3 Entramado**

Los entramados tienen el potencial para proporcionar un ambiente propicio para el crecimiento de tipos celulares específicos. Un entramado puede ser implantado solo o en combinación con células madre y factores de crecimiento para proveer un microambiente tridimensional biológico y fisicoquímico o la construcción de tejido para el crecimiento y la diferenciación celular.

#### **4.3.3.1 Requerimientos ideales para un entramado**

- a) Ser poroso para permitir la colocación de células y factores de crecimiento.
- b) Permitir el transporte efectivo de nutrientes, oxígeno y residuos.
- c) Ser biodegradable, sin dejar subproductos tóxicos.
- d) Ser reemplazado por tejido regenerativo mientras mantiene la figura y la forma de la estructura del tejido final.
- e) Ser biocompatible.
- f) Tener una fuerza física y mecánica adecuada. <sup>9</sup>



#### 4.3.3.2 Tipos de entramados

##### - *Entramados Biológicos-naturales*

Estos entramados consisten en polímeros naturales como el colágeno y el glicosaminoglicano, que ofrece buena biocompatibilidad y bioactividad. El colágeno es el componente principal de la matriz extracelular que provee gran fuerza de tracción a los tejidos. Como un andamio, el colágeno permite el fácil reemplazo de células y factores de crecimiento, así como el reemplazo de tejidos naturales después de someterse a la degradación. Sin embargo, ha sido reportado que las células de la pulpa en matrices de colágeno experimentan marcada contracción, lo que podría afectar a la regeneración del tejido pulpar.<sup>20</sup>

##### - *Entramados Artificiales*

Estos son polímeros sintéticos con características físico-químicas controladas, tales como la velocidad de degradación, microestructuras y fuerza mecánica.<sup>9</sup>

Por ejemplo:

- Ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y sus copolímeros, ácido poliláctico co-glicólico.
- Hidrogeles sintéticos incluyendo polímeros basados en glicol polietileno.
- Los entramados son modificados con péptidos de adhesión de la superficie celular, como arginina, glicina, y ácido aspártico, que mejoran la adhesión celular y la síntesis de matriz dentro de la red tridimensional.



- Los entramados contienen compuestos inorgánicos como hidroxiapatita, fosfato tricálcico, y polifosfato cálcico, que son usados para mejorar la conductividad ósea y han demostrado ser muy efectivos para la ingeniería tisular de las DPSCs
- Micro cavidades llenas de entramados que mejoran la adhesión celular.
- Informes acumulados han mostrado que las células de la pulpa pueden ser aisladas, multiplicadas en cultivos, y sembradas en una matriz de entramado donde las células cultivadas forman un nuevo tejido similar al de la pulpa nativa.<sup>20</sup>

Al igual que la familia BMP, la DMP1 ha demostrado ser crucial en la formación de los dientes. En un reciente estudio utilizando un modelo de rata, la DMP1 ha demostrado actuar como un factor de crecimiento en células mesenquimales indiferenciadas presentes en el complejo dentino-pulpar.

Estas células diferenciadas tenían el potencial para regenerar tejidos similares a dentina, que fue confirmado por la presencia de una matriz de colágeno, marcadores específicos de odontoblastos (DSP y PPD) y depósitos calcificados. La matriz de colágeno que es observada cuando el tejido similar a la dentina es formado, imita la estructura de la dentina primaria con fibras de colágeno tipo I ordenadas perpendicular en la capa de odontoblastos, e imita también las proteínas no colágenas (DSP, DPP, y DMP1)<sup>9, 15, 19</sup>.

Las fibras proporcionan una fuerza a la dentina mineralizada y se considera que las proteínas no colágenas tienen capacidad regulatoria de mineralización. La porción mineralizada (depósitos calcificados) de la matriz de la dentina viene de células similares a odontoblastos (células post-mitóticas que se diferencian a partir de las DPSCs)<sup>20</sup>.



Gronthos demostró que era posible inducir la formación de dentina a partir de las DPSC colocadas por vía subcutánea en ratones<sup>15,21</sup>. En un estudio más reciente, se demostró que la colocación subcutánea de tejido pulpar humano en ratones promovió la vascularización del tejido pulpar y la angiogénesis en la zona.<sup>15</sup>

En 2003, un estudio demostró la importancia de los factores de crecimiento (en particular, BMP) en ingeniería tisular<sup>21</sup>. También se mostró que la DMP1 fue un regulador muy importante en la biomineralización de los dientes y el hueso. Desde el mismo laboratorio en 2004, se encontró que la DMP1 es más específica para la unión a colágeno tipo 1, y que la mineralización no ocurrirá a menos que DMP1 esté presente. Mediante la siembra DMP1 en un entramado de colágeno y la realización de procedimientos pulpares directos en un modelo de rata, Almushayt y otros colaboradores fueron capaces de inducir la diferenciación de DPSCs en odontoblastos y demostrar la formación del tejido duro, similar a la dentina.<sup>22</sup>

#### **4.3.4 Diferenciación de las Células Madre de la pulpa dental en odontoblastos**

La diferenciación celular se refiere a la especialización progresiva de la morfología celular y la función que lleva a la formación de células especializadas, tejidos, y órganos, acompañada con la expresión diferencial de genes específicos.

Por lo general, brinda las variaciones en el volumen celular, la aparición de nuevos marcadores de superficie, las modificaciones de actividad enzimática, e incluso los cambios en la composición de proteínas celulares.



Las DPSC pueden ser reprogramadas en múltiples linajes celulares (Tabla 1) e incluso inducidas a células madre pluripotenciales (iPS)<sup>23</sup>. La diferenciación de las DPSC a un linaje celular específico es determinado principalmente por los componentes del microambiente local, incluyendo factores de crecimiento, moléculas receptoras, moléculas de señalización, factores de transcripción y proteínas de matriz extracelular.

Han sido demostrado que la sinergia de la señalización de “Notch-Delta 1” y los factores de diferenciación inducida (DIFs) pueden conducir a las DPSC humanas a linaje odontoblástico. También se han demostrado que la proteína de matriz dentinaria (DMP1, es una proteína de matriz extracelular no-colágena, extraída de la dentina) puede promover significativamente la diferenciación odontoblástica de las DPSC y la formación de dentina reparativa sobre el tejido pulpar expuesto.

Durante la diferenciación odontoblástica, el factor alfa-1 de unión nuclear (CBFA1) puede sobre-regular la expresión de genes DMP1 y contribuir al patrón de expresión espacio-temporal de DMP1.<sup>15</sup>

Además, las DPSC pueden ser inducidas a linaje odontoblástico cuando se tratan con el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) solo o en combinación con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2). La simvastatina (coenzima A 3-hidroxi-3-metilglutaril-reductasa)<sup>20</sup> y péptidos derivados del DMP1 tienen la capacidad para activar la diferenciación de DPSC en odontoblastos. Algunas otras moléculas incluyendo EphB/ephrin-B y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) también juegan un papel fundamental durante la migración perivascular hacia la superficie dentinaria y la diferenciación odontoblástica de DPSC.



Aunque muchos factores aislados pueden inducir la diferenciación de DPSC, el microambiente *in situ* de las DPSCs es muy complicado, ya que involucra a muchos componentes de la matriz, iones minerales y factores de crecimiento.

La diferenciación odontoblástica inducida por solo uno o dos factores de crecimiento pueden causar cambios biológicos indeseables en DPSC diferenciadas. Las células del germen dental mantienen toda la información morfogenética necesaria para el desarrollo de un “*bio-tooth*”, el medio condicionado extraído desde células del germen dental ha sido utilizado para imitar el microambiente de los factores de crecimiento que efectivamente pueden iniciar la diferenciación odontoblástica de las DPSCs.<sup>15</sup>

Algunos factores físicos (por ejemplo, la gravedad cero, el estrés y trauma) también influyen en la diferenciación de DPSCs. En la práctica clínica, la calcificación pulpar causada por la fuerza de masticación anormal puede atribuir a las modificaciones funcionales en las DPSC.

Cuando las DPSCs *in vitro* están sometidas a la presión hidrostática dinámica (HSP), su capacidad de adhesión y la viabilidad son significativamente comprometidas, mientras que su capacidad de mineralización y su potencial de diferenciación odontoblástica son notablemente mejorada.<sup>23</sup>

Cuando el gen exógeno *Gdf-11* es importado a las DPSCs por el método de transferencia eléctrica, esto puede desencadenar la diferenciación odontoblástica de estas células madre y lograr la formación de estructuras similares a la dentina. Los genes relacionados con la diferenciación odonto/osteoblástica (*Alp*, *Ocn*, *Col-1*, *BsP*, y *Dspp*) pueden ser sobre-regulados cuando el gen *Bmp-2* es transferido a STRO-1<sup>+</sup> DPSC.



Por otra parte, las iPS pueden ser creadas por ingeniería genética, cuando cuatro genes (*c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2* o *Lin28/Nanog/Oct4/Sox2*) son introducidos en DPSC.

Estas células iPS dentales tienen múltiples funciones de células madre embrionarias, como es la generación de cuerpos embrionarios *in vitro* y teratomas *in vivo*, y pueden reemplazar a las células madre embrionarias para la fabricación de diversos tejidos y órganos.<sup>15</sup>

#### **4.3.5 Regeneración del complejo dentino- pulpar por Células Madre de las Pulpa dental.**

En el proceso del desarrollo de un diente, la dentina y pulpa dental derivan de la papila dental embrionaria. Histológicamente, la dentina se encuentra fuera de la pulpa dental, y existe una estrecha relación entre cada una.

Funcionalmente, las células de la pulpa dental pueden regenerar la dentina, y aportarle oxígeno, nutrición e inervación, mientras que la dentina puede proteger los tejidos blandos de la pulpa dental. Ellas juntas mantienen la integridad de la forma y la función dental. Cualquier reacción fisiológica o patológica que ocurra en una parte, como es la abrasión, la caries, y la preparación cavitaria, afectará a las demás.<sup>9</sup>

También actúan como un complejo dentino-pulpar, y participan simultáneamente en diversas actividades biológicas del diente. Muchos estudios han demostrado que las DPSC desempeñan un papel primordial en la regeneración tisular del complejo dentino-pulpar.



Han sido recombinadas las DPSC humanas con fosfato tricálcico de hidroxiapatita (HA-TCP) en polvo de cerámica, y trasplantadas por vía subcutánea en ratones.

Los tejidos recuperados contienen estructuras dentinarias, rodeadas por células similares a los odontoblastos con procesos citoplásmicos largos en la matriz mineralizada. También se observan estructuras dentales similares a la pulpa que contienen vasos sanguíneos y pueden ser observadas alrededor de la matriz dentinaria.<sup>15</sup>

La formación similar a la dentina puede ser detectada en SHEDs *in vivo* recombinados con entramados HA-TCP<sup>16</sup>. Por otra parte, las DPSC pueden producir complejos dentino-pulpares en el entramado y una estructura similar a la dentina reparativa en la superficie de la dentina.

Nuestro estudio anterior ha demostrado que las células mesenquimales dentales en etapas finales de desarrollo pueden reexhibir la dentinogénesis en ausencia de interacciones epitelio-mesenquimales y forman el complejo dentino-pulpar típico constituido por odontoblastos, predentina, dentina y los túbulos dentinarios. Después de la inducción en un medio condicionado para células del germen dentario, las DPSC trasplantadas en las cápsulas renales pueden convertirse regularmente en complejo dentino-pulpar.<sup>20</sup>

Estos hallazgos sugieren que las células dentales mesenquimales incluyendo las células madre pueden realizar la dentinogénesis de forma independiente, sin la existencia de componentes epiteliales dentales. Desde que las DPSC tienen la capacidad dentinogénica potencial, pueden ser utilizadas para la terapia pulpar vital.<sup>15</sup>



Cuando las DPSC son transplantadas solas o en combinación con BMP2 en la cavidad pulpar, estas células madre pueden promover significativamente la reparación y la reconstrucción del complejo dentino-pulpar. Prescott ha colocado tres componentes principales: las células madre de la Pulpa dental (DPSCs), un entramado de colágeno y las proteínas de la matriz dentinaria<sup>1</sup> (DMP1) en los sitios con perforaciones simuladas en capas dentinarias, y posteriormente se transplantó la recombinación subcutáneamente en un ratón.<sup>15</sup>

Después de 6 semanas de incubación, los tejidos similares a la pulpa bien organizados pueden ser detectados en el sitio de la perforación. Se han demostrado que recombinaciones de SHEDs/“andamios” preparados en capas de dientes humanas pueden tener el potencial para formar estructuras similares a la pulpa.

Se ha reportado que el complejo dentino-pulpar con vascularización bien establecida puede ser regenerada de nuevo en el espacio vacío del conducto radicular, tanto por DPSCs como por SHEDs<sup>22</sup>.

Estas investigaciones proporcionan un nuevo enfoque para la preservación del tejido pulpar, y una opción innovadora del tratamiento biológico de las enfermedades pulpares.<sup>1</sup>

### **6.3.5 Reconstrucción de un “*Bio-tooth*” a partir de las células madre de la Pulpa Dental.**

La pérdida de dientes es una enfermedad común que se produce con frecuencia en el envejecimiento de la población y que afecta negativamente la eficiencia masticatoria, la función del lenguaje, la estética facial y la salud psicológica.



En los países desarrollados, se estima que el 7% de las personas han perdido a uno o más dientes a los 17 años. Después de los 50 años de edad, han perdido un promedio de 12 dientes se han perdido.<sup>24</sup>

En la Organización Mundial de la Salud (OMS), los bancos de datos demuestran que la caries dental aún prevalece en la mayoría de los países del todo el mundo (100% de incidencia en algunas poblaciones), se estima que las enfermedades periodontales graves tienen como resultado la pérdida de dientes y afectan de un 5 a 20% de la población más adulta, y la incidencia de edentulismo total se ha estimado entre el 7% y 69% a nivel internacional.

Para tratar estos dientes que faltan, los enfoques actuales se centran principalmente en los materiales artificiales o en los implantes biológicos que inevitablemente puede reducir la calidad de vida debido a sus funciones fisiológicas limitadas y provocan a veces un rechazo inmunológico.<sup>15</sup>

Los “*Bio-tooth*” son pensados como una especie de diente biológico que pueden re-integrarse en la mandíbula y realizar las funciones normales de un diente natural, incluyendo la capacidad regenerativa en caso de lesión. Utilizando el principio de las interacciones epitelio mesenquimales para guiar la regeneración dental se ha convertido en una estrategia común en la ingeniería de tejidos dentales.<sup>24</sup>

Muchos estudios han demostrado que el “*bio-tooth*” puede ser reconstruido por células dentales recombinadas con o sin entramados, por células dentales pre-post natales, e incluso por las células no dentales.



Han demostrado que la bioingeniería de los gérmenes dentales pueden ser reconstituidos utilizando completamente células epiteliales y células mesenquimales dentales en un gel de colágeno en tres dimensiones. Esta bioingeniería de dientes germinales pueden replicar la organogénesis dental embrionaria y desarrollar un incisivo completo *in vitro* o en el alveolo dental de un ratón adulto.<sup>15</sup>

Además, han demostrado que estos “*bio-teeth*” en el hueso alveolar puede desempeñar las funciones de un diente natural incluyendo la erupción, la oclusión y la masticación, lo que pone de manifiesto una perspectiva nueva de “*bio-tooth*” en futuras aplicaciones clínicas. Han propuesto la regeneración de “*bio-root*” basado en células madre mediante la integración de varios enfoques juntos, incluyendo técnicas de células madre, biomateriales, y la restauración de la corona dental.

Las recombinaciones entre SCAPs/HATCP y las células madre del ligamento periodontal (PDLSCs) puede dar lugar a la formación de complejos “*bio-root*”/periodontal, que pueden soportar una corona de porcelana para restaurar las funciones normales de la masticación y la estética.

El trabajo previo ha revelado que las DPSCs reasociadas con células de la yema apical de ratas adultas, pueden formar una estructura típica de la corona *in vivo* que contiene capas de ameloblastos distintivas, esmalte, dentina, predentina y una capa de odontoblastos. Este estudio tiene implicaciones generales en la reconstrucción de un “*bio-tooth*” con células madre adultas dentales.<sup>24</sup>

Otros estudios indican que la proporción de células epiteliales y mesenquimales es mucho más importante en la regulación de la morfogénesis normal de la corona.



Sin embargo, no se ha observado estructuras similares al conducto radicular durante la regeneración dental de las DPSC, debido al complejo mecanismo inherente en el desarrollo de la raíz.<sup>23</sup>

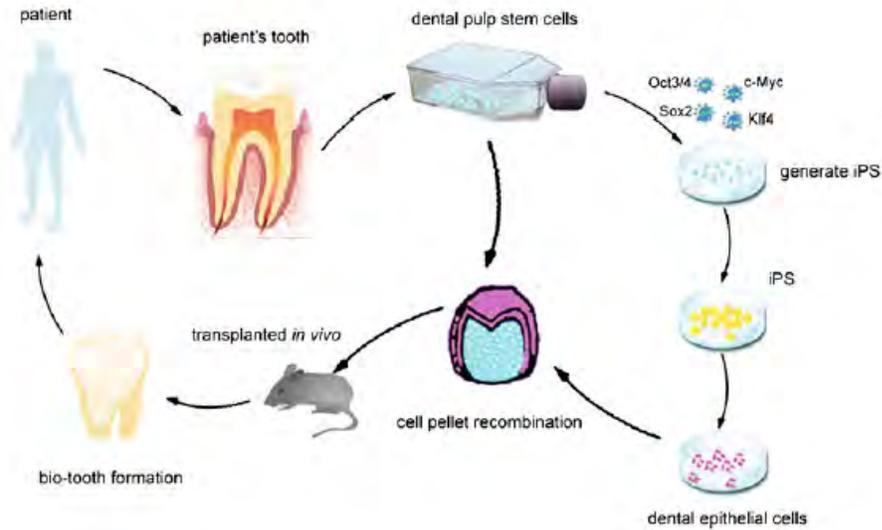
Recientemente, muchos tipos de células incluyendo DPSC, SHEDs, y SCAPs han sido exitosamente reprogramadas en células iPS, que tienen una gran promesa para la medicina regenerativa. Estas células dentales iPS expresan los genes marcadores que caracterizan a las células madre embrionarias, y mantienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en derivados de las tres capas germinales primarias.<sup>24</sup>

Los datos no publicados revelan que los genes marcadores de linajes ameloblastos (ameloblastina y amelogenina) son sobrerregulados en las células iPS derivados de las DPSC, según lo indicado por los análisis de RT-PCR en tiempo real. Por lo tanto, la utilización de estas células dentales iPS para hacer un “*bio-tooth*” esta aún llena de incertidumbre y desafíos.

En la siguiente figura se muestra la estrategia viable para la construcción de un “*bio-tooth*” utilizando células iPS dentales, en donde todas las células dentales son autólogas.<sup>15</sup> En primer lugar, los DPSCs autólogos son aislados de la pulpa dental del propio paciente y se amplifica *in vitro*. En segundo lugar, las células iPS son generadas por la conducción cuatro genes (c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2)<sup>24</sup> en las DPSC (Fig.24).

Estas células iPS dentales pueden dar origen a las células epiteliales dentales en condiciones adecuadas debido a sus propiedades pluripotentes. Entonces, estas iPS derivadas de las células epiteliales dentales son reasocian con DPSC autólogas y posteriormente trasplantadas en vivo para la incubación temporal para producir un “*bio-tooth*”.

Por último, el germen del “*bio-tooth*” o “*bio-teeth*” completos pueden ser trasplantados en los maxilares del paciente para el crecimiento continuo y erupción.<sup>15</sup>



**Figura 24.** Diagrama que ilustra la realización de un “*bio-tooth*” usando las células dentales.<sup>15</sup>



## 5. CONCLUSIONES

La regeneración de tejidos dentales ofrece una atractiva alternativa a las terapias tradicionales con restauraciones sintéticas . Se espera que los tejidos derivados de poblaciones celulares de cada paciente puedan ser usados para reemplazar funcionalmente los tejidos integrales del diente.

El desarrollo de estos dientes en tubos de ensayo requiere una regulación precisa de los eventos regenerativos con el fin de lograr un adecuado tamaño y forma de los dientes. Así como el desarrollo de nuevas tecnologías para facilitar estos procesos. En un futuro se prevee que el desarrollo y la regeneración de los tejidos aprovechará las células madre recolectadas de la pulpa dental o de fuentes no-DSC como las IPS o las DSC inducidas.



## 6. Referencias

- <sup>1</sup> Collins F., McKusick V. Implications of the human genome project for medical science. *Jama*. 2001; 285: 540-544
- <sup>2</sup> Collins F., Patrinos A, Jordan E. New goals for the. Human Genome Project: *Science*.1998;282:43-46.
- <sup>3</sup> Gómez de F. Ma., Campos Muñoz A. *Histología y Embriología bucodental*. 2º edición, España: Editorial Medica Panamericana, 2003.p 85-102.
- <sup>4</sup> Inoki R. Kudo T, Olgart M. *Dynamic Aspects of Dental Pulp, molecular biologym pharmacology and phatophysiology*. 1º edición, Cambridge: Editorial Chapman and Hall; 1990 p 51-61
- <sup>5</sup> Garant P. *Oral Cells and Tissue*. 1º edición, Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc; 2003. P 25-45
- <sup>6</sup> Geneser F. *Histología*. 3ª edición, España: Editorial Medica Panamericana;2003. p. 117.
- <sup>7</sup> Rodríguez Pardo M.,Células Madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación. 2005; 10(1): 5-14.
- <sup>8</sup> Weissman I.L., Anderson DJ., Cage F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments and Transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 387-403.
- <sup>9</sup> Shehab E. Tissue engineering in endodontics. *Oral Science*, 2009 Octubre 51(4): 495-507.



- <sup>10</sup> Rimondini L., Mele S., Stem Cell Technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol.* 2009;58:483-99.
- <sup>11</sup> Verfaillie CM., Pera A., Lansdorp PM. Stem cells: Hype and Reality. *Hematology.* 2002: 369-387
- <sup>12</sup> Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., Schwartz RE., Keene CD., Ortiz González XR., Reyes M., Lenwik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells derived from Adult Marrow. *Nature.* 2002, 418: 41-49
- <sup>13</sup> Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004,116;639-48
- <sup>14</sup> Huang J., 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 September; 88(9): 792–806.
- <sup>15</sup> Ming Y., Yan Y., Guangdong Z., Chunbo T., Jinhua Y. A Journey from Dental Pulp Stem Cells to a Bio-tooth. *Stem Cell Rev and Rep* 2010 Mayo; 10: 210-215
- <sup>16</sup> Yu, J., Wang, Y., Deng, Z., Tang, L., Li, Y., Shi, J., et al. (2007). Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biology of the Cell*, 99, 465–474.
- <sup>17</sup> Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in Vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13625–13630.



- <sup>18</sup> Huang G., Gronthos, Shi. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res.* 2009 September ; 88(9): 792–806.
- <sup>19</sup> Giannobile W. Engineering by growth factors. *Bone* 19, Suppl. 2009;23-37
- <sup>20</sup> Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potencial use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* ;16:369-376
- <sup>21</sup> Odorico JS., Kaufman D., Thomson J. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells.* 2001, 19:193-204.
- <sup>22</sup> Wagers AJ., Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* . 2004, 116: 639 – 48.
- <sup>23</sup> Rutenberg MS., Hamazaki T, Singh AM. Stem cell plasticity, beyond alchemy. *Int J Hematol.* 2004; 79: 15 – 21.
- <sup>24</sup> Körbling M. Estrov Z. Adult Stem Cells for Tissue Repair a new Therapeutic Concept. *N Eng1J Med.* 2003, 349:570-582.