



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ORGANOIDES: MODELOS ESTUDIO EN PATOLOGÍA.

T E S I N A
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

CIRUJANO_ DENTISTA

P R E S E N T A:
RICARDO XCHEL LONA TÉLLEZ

TUTORA:
Dra. SILVIA MALDONADO FRÍAS

CIUDAD DE MÉXICO

2018



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

A mis padres Ricardo y Angélica, por ser mi soporte día a día y nunca dejarme caer, sin ellos no sería nada de lo que soy ahora, gracias por prepararme para enfrentar la vida.

A mi hermano Gabriel por siempre estar ahí, por ser cómplice de mis travesuras, te amo, nunca lo dudes.

A mis tíos Felipe y José, por apoyarme siempre a pesar de la adversidad.

A mi mejor amiga Tania, quien supo escucharme y darme consejos de manera incondicional, por valorar mi amistad tanto como yo valoro la suya, por ser mi cómplice todos los días. Hemos vivido y compartido cosas juntos y aún faltan demasiadas, espero siempre estés ahí.

A mi pareja Laura, por amarme tanto y estar ahí para mí cada vez, en las buenas y en las malas. A tu lado las cosas son mejores, te amo mi vida.

A mis amigos Iván, Fernando, Oliver, Diana, Trinidad, Karen Jazmín, Mariana e Ileana por apoyarme y escucharme siempre.

A mis profesores Silvia, Daniela, Carlos, Victoria y Jorge por guiarme en el camino, compartir su conocimiento y brindarme su apoyo para convertirme en un buen profesional, les estaré eternamente agradecido.

A mis profesoras Claudia, Mary Thelma y Adriana por enseñarme el valor de la ética profesional, la empatía con los pacientes y la importancia de estudiar



continuamente para no ser sólo un buen odontólogo, también un buen ser humano.

A la máxima casa de estudios, mi universidad, mi segunda casa, por brindarme un espacio para poder desarrollarme personal y profesionalmente, siempre mantendré tu nombre en alto, te agradezco con el corazón UNAM por permitirme ser parte de ti.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVO.....	7
CAPÍTULO 1.- CÁNCER	8
1.1 Signos distintivos del cáncer.....	8
1.2 Cáncer en cavidad oral.....	10
1.3 Teorías de la etiología del cáncer.....	12
CAPÍTULO 2 CÉLULAS TRONCALES.....	15
2.1. Células troncales de la cavidad oral.....	17
2.1.1 Células troncales de la encía.....	18
2.1.2 Células troncales del hueso alveolar.....	18
2.1.3 Células troncales del ligamento periodontal.....	19
2.1.4 Células troncales dentales	20
2.1.4.1 Células troncales de la pulpa dental	21
2.1.4.2 Células troncales de los dientes deciduos exfoliados.....	22
2.1.4.3 Células troncales del germen dental	23
2.1.4.4 Células troncales de la papila apical	23
2.1.5 Células troncales de la papila fungiforme de la lengua	24
2.1.6 Células troncales de las glándulas salivales	24
CAPÍTULO 3 TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE PATOLOGÍA..	26
3.1 PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa)	26
3.2 Inmunohistoquímica	26
3.3 Western Blot	27
3.4 Crispr- Cas9	28
3.5 Cultivo celular primario	28
3.4 Cultivo celular en 3D.....	32
3.4.1 Esferoides	31
3.4.2 Estudios de diferenciación	33
3.4.3 Aplicaciones farmacológicas	34



3.4.4 Biología del cáncer.....	35
CAPÍTULO 4 ORGANOIDES.....	36
4.1 Antecedentes.....	36
4.2 Generalidades.....	37
4.3 Potencial terapéutico.....	37
4.4 Organoides:desarrollo tumoral y estudio farmacológico.....	42
4.4.1 Hígado.....	42
4.4.2 Páncreas.....	43
4.5 Organoides: estudio fisiopatológico.....	44
4.5.1 Hígado	44
4.5.2 Cerebro.....	45
4.5.3 Intestino y pulmón.....	46
4.5.4 Estómago.....	49
4.6 Organoides: estudio genético.....	51
4.6.1 Intestino.....	51
4.6.2 Esófago	51
4.7 Organoides de la cavidad oral.....	52
4.7.1 Glándula salival (método alternativo de generación de estructuras en 3D).....	52
4.7.2 Organoides dentales.....	54
4.7.3 Organoides de lengua	57
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS	
Índice de figuras.....	66





INTRODUCCIÓN

Actualmente la incidencia de enfermedades hereditarias, infecciones virales, bacterianas y otro tipo de patologías incluyendo las neoplásicas han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento que no sean tan radicales, agresivas y que resulten eficaces, esto con la finalidad de un mejor pronóstico y que brinden una mayor calidad de vida y supervivencia a los pacientes. Si es cierto que el desarrollo tecnológico ha crecido en el campo médico, a la fecha existen patologías en la cuales el tratamiento no ha logrado tener un avance significativo en los pacientes, ejemplo de esto es el carcinoma de células escamosas de cavidad oral, en el cual no se ha logrado incrementar la sobrevida de los pacientes, manteniéndose dentro de un rango de 5 años en las últimas décadas.

Por otra parte, la aplicación de los tratamientos actuales para neoplasias malignas, requiere someter a los pacientes a quimioterapia y/o radioterapia, las cuales tienen severos efectos secundarios, presentándose incluso el riesgo de dañar órganos vitales. Además existen casos en lo que el desarrollo del tumor requiere de una intervención quirúrgica, que en algunos de los casos y dependiendo de la magnitud del daño, disminuyen significativamente la calidad de vida de los pacientes.

Recientemente se observa un interés creciente en el estudio, desarrollo y uso de nuevas tecnologías dentro del campo biomédico. El uso de técnicas como PCR, inmunohistoquímica, Western blot, CRISPR-Cas9, etc, tiene la finalidad de obtener un diagnóstico certero y tratamientos exitosos para las diversas patologías que se conocen en la actualidad. Una herramienta valiosa que ha sido partícipe de avances importantes y que es requerida para la utilización de las técnicas antes mencionadas, son los cultivos celulares. Estos se utilizan para el estudio en diversas áreas, siguiendo los estándares



generales en los que las células son tomadas de los tejidos de interés y se someten a procedimientos que permitan tener cultivos celulares in vitro para estudiar e identificar los mecanismos celulares que se llevan a cabo bajo condiciones específicas. En la actualidad los cultivos bidimensionales son los de mayor uso, estos cultivos han sido y siguen siendo de gran utilidad en los avances científicos, sin embargo no se ha logrado mimetizar las características microambientales, estructurales y fisiológicas de los tejidos de origen, por lo que desarrollar metodologías que permitan desarrollar cultivos celulares que cumplan dichas expectativas es de suma importancia.

Los cultivos tridimensionales que incluyen esferoides y organoides; han demostrado poseer características superiores a cultivos bidimensionales, estos son una nueva alternativa para el desarrollo de tratamientos exitosos, así como para observar el comportamiento e interacción de distintos tipos celulares y su microambientes.

La generación de nuevas alternativas de tratamiento que utilizan tecnología de vanguardia ha dado pie al desarrollo de nuevas estructuras que mimetizan las características de los tejidos de estudio, facilitando así el acercamiento a recrear escenarios idénticos al desarrollo in vivo. lo que es y será de suma importancia en el área médico-odontológica.

Los modelos tridimensionales, en este caso, los organoides; brindan una nueva alternativa no solo de tratamiento, sino también de estudio para observar el comportamiento de distintos elementos celulares ante nuevos materiales, nuevos medicamentos incluyendo el estudio de procesos fisiológicos, patológicos de algunas enfermedades y acción de fármacos.



OBJETIVO

Describir la utilidad de los organoides como modelos de estudio en patología y su aplicación en el área odontológica.



CAPÍTULO 1.- CÁNCER

El cáncer es el producto final de la proliferación desmedida de células que resulta del acúmulo secuencial de alteraciones genéticas en una célula precursora (mutación), es una población de células que continúa mutando caracterizada por la secreción permanente de factores de crecimiento y factores angiogénicos (vascularización).¹

El cáncer no es formado por una sola exposición o varias exposiciones en un tiempo corto ya que el DNA es reparado por específicas ADN polimerasas.

Así como los intermediarios formados por la radiación ionizante, éstos toman electrones de los nucleótidos del DNA, dañando así los pares de bases y su secuencia o formando parte del DNA.¹

Para que el cáncer inicie, una célula debe acumular al menos seis mutaciones genéticas, cada una debe pasar a sus células descendientes en la membrana basal la cual retendrá esta mutación como una célula madre cancerosa la cual traspasará la mutación a sus células descendientes; las cuales mediante otros carcinógenos obtendrán otra mutación donde no habrá apoptosis ni inhibición del crecimiento.¹

1.1 SIGNOS DISTINTIVOS DEL CÁNCER

En el año 2000 se consideraban 6 signos distintivos (conocidos como cancer hallmarks) dentro de la fisiología de una célula que conducen al crecimiento maligno: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales de anti-crecimiento, angiogénesis sostenida, evasión de la muerte celular programada, invasión de tejidos acompañado de metástasis y el potencial sin límite de replicación.²

Un reporte en 2017 señala la adición de 4 signos: Inestabilidad genómica acompañada de mutaciones, inflamación promovida por el tumor, falla en la regulación de las reacciones energéticas celulares y evasión de la destrucción por medio del sistema inmune.(fig. 1)³

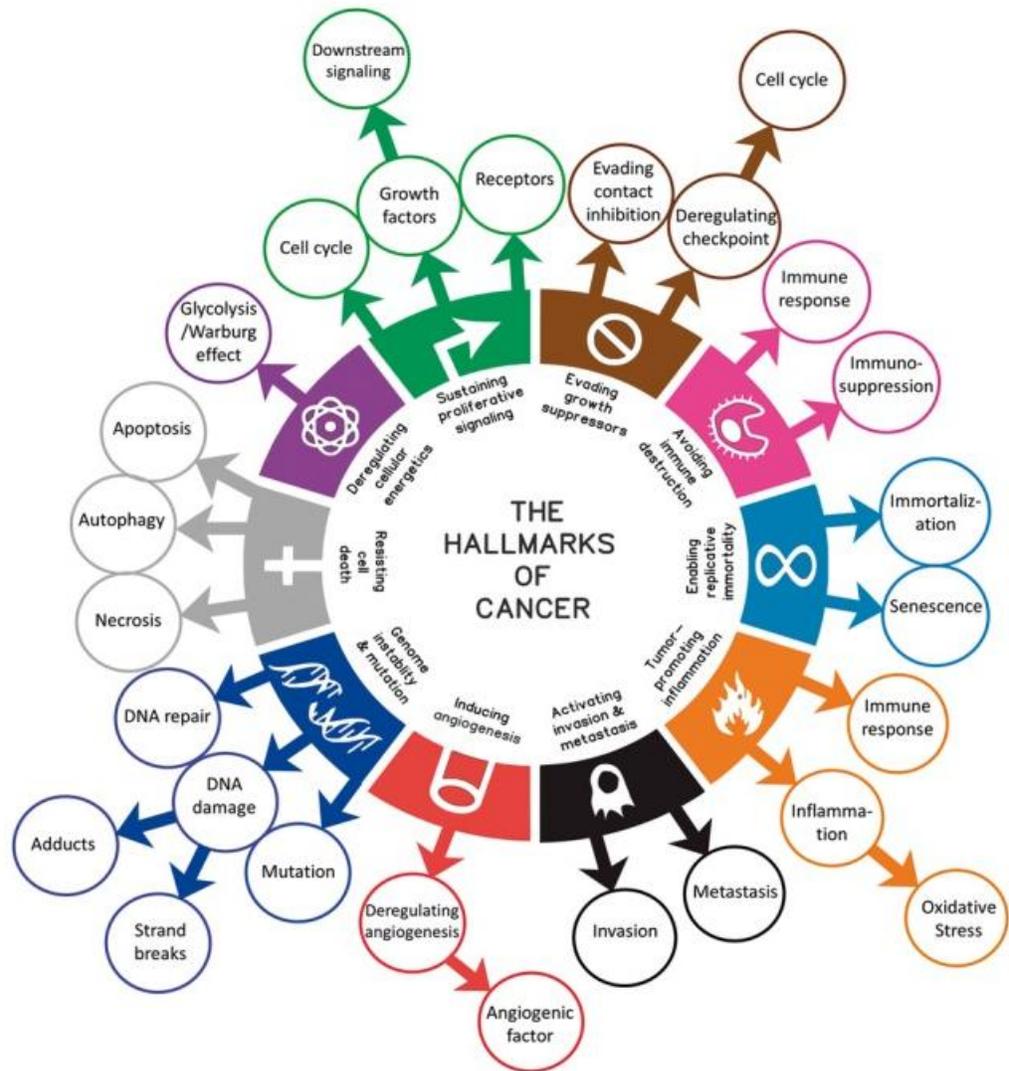


Fig. 1 Esquema que muestra las 10 características celulares que derivan en crecimiento maligno (Hallmarks of cancer).³

Es importante señalar que el orden en que estas características son presentadas varía dependiendo de cada tipo o subtipo de cáncer, sin embargo en algunos tumores alguna lesión genética específica le confiere varias capacidades simultáneamente a las células, por ejemplo, la pérdida de la función de la proteína supresora tumoral p53 confiere automáticamente la



capacidad de angiogénesis y la resistencia a la muerte celular programada dándole así a la célula inestabilidad genómica.²

1.2 CANCER EN CAVIDAD ORAL

En cabeza y cuello los datos reportados a últimas fechas indican que el cáncer oral se presenta comúnmente después de la quinta década de la vida y su incidencia aumenta con la edad, la mayoría de los estudios sugieren que del 4-6% de los cánceres de la cavidad oral ocurren antes de los 40 años.⁴

La Organización Mundial de la salud reporta que el 95% de los cánceres de la cavidad oral son COCEs, GLOBOCAN en 2012 reportaba una incidencia de 300,373 nuevos casos de los cuales los decesos fueron de 145,238. En lo que va del 2018 el estimado es de 354,864 casos nuevos de cáncer en labio y cavidad oral de los cuales se reportan 177,384 decesos, un incremento alarmante. Esta patología está rankeada como el 13^{avo} cáncer más común a nivel mundial, y algo importante de destacar es que no se ha logrado con ningún tratamiento incrementar el tiempo de sobrevida de los pacientes en las últimas décadas, de ahí la importancia de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento y modelos para estudiar su biología. La mayoría de los cánceres orales, particularmente en los países en vías de desarrollo, se presentan en etapas clínicas avanzadas, muy frecuentemente involucrando los nodos linfáticos de la región.⁴⁻⁶

Otra patología que se describe en cavidad oral son los tumores odontogénicos. La incidencia relativa de estos tumores, indica que de 8364 casos reportados y analizados en 2011, 3387 casos fueron ameloblastomas de los cuales 275 casos fueron reportados en maxilar y 2931 en mandíbula encontrándose que estos tumores se desarrollan frecuentemente en la tercera década de la vida; 73 casos fueron diagnosticados como Tumor Odontogénico Epitelial Calcificante, 40 casos reportados en hombres y 33 en mujeres, de los cuales 26 fueron en maxilar y 46 en mandíbula



desarrollándose con mayor frecuencia en la tercera década de la vida; 1180 casos fueron reportados como Tumor Odontogénico Queratoquístico de los cuales 733 se encontraron en hombres y 446 en mujeres, localizándose 244 en maxilar y 880 en mandíbula; 399 casos fueron de Tumor Odontogénico Adenomatoide, 170 casos fueron presentados en hombres y 238 en mujeres, 217 lesiones fueron encontradas en maxilar y 176 casos en mandíbula; 140 casos fueron reportados de fibroma ameloblástico, 60 en hombres y 80 en mujeres, 32 casos fueron reportados en maxilar y 100 en mandíbula; 1663 casos fueron reportados de Odontomas, 811 en hombres y 852 en mujeres. 841 fueron reportados en maxilar y 793 en mandíbula; 63 casos fueron reportados de fibro-odontoma ameloblástico, 34 en hombres y 29 en mujeres, 22 casos en maxilar y 36 en mandíbula; 274 casos fueron reportados de Tumores Odontogénicos Quísticos Calcificantes, 152 reportados en hombres y 123 en mujeres, 270 reportados en maxilar y 118 en mandíbula; 40 casos reportados de Tumor odontogénico Escamoso, 14 casos en hombres y 26 en mujeres, 23 casos en mandíbula y 15 casos en maxilar; 187 casos reportados de fibroma odontogénico, 89 en hombres y 88 en mujeres, 79 en maxilar y 103 en mandíbula; 592 casos de mixoma odontogénico fueron reportados, 252 en hombres y 340 en mujeres, 297 casos en mandíbula y 268 en maxilar; 118 casos de cementoblastoma reportados, 50 en hombres, 68 en mujeres, 86 en mandíbula y 31 en maxilar; 343 tumores odontogénicos malignos fueron reportados, son entidades muy raras. Pacientes mayores a 60% fueron los que desarrollaron estas lesiones con mayor frecuencia. De este total relativo alrededor del mundo 349 casos fueron reportados en México en el año 1992 y el tumor más frecuente fue el odontoma.⁷

Los tumores odontogénicos por lo general requieren de tratamientos radicales. Los datos descritos con anterioridad nos muestran una incidencia baja de estos en 2011, sin embargo es importante su estudio y el desarrollo



de nuevas estrategias de tratamiento, que brinden una buena calidad de vida a los pacientes.

1.3 TEORÍAS DE LA ETIOLOGÍA DEL CÁNCER

Existen diversas teorías que han tratado de explicar el origen del cáncer, que involucran diferentes paradigmas. Dentro de estas teorías se encuentra la viral, la asociada a oncogenes, la asociada a genes supresores de tumor, la génica, la asociada a microambiente y recientemente el modelo estocástico que involucra a células con características de troncalidad en el desarrollo del cáncer.

La teoría viral fue la primera postulada, tuvo como fundamento el trasplante de un sarcoma de un ave a otra atribuyendo el desarrollo tumoral a un virus, posteriormente se describió que el genoma contenía un oncogén potencialmente responsable de la transformación neoplásica, sin embargo la observación de tumores específicos el retinoblastoma o el tumor de Wilms indicaba que los responsables del desarrollo tumoral eran los genes supresores de tumor. Después de descubrir una larga lista de oncogenes asociados a tumores y a su vez genes supresores de tumores, surgió la teoría génica del cáncer, que engloba ambos fenómenos donde se postulaba que el cáncer era la consecuencia de una cascada de eventos en el ADN que involucra tanto la activación de oncogenes como la delección de genes supresores de tumor, sin embargo el conocimiento respecto a que la transformación neoplásica de una célula no significa el desarrollo de un tumor debido a que las mutaciones normalmente son corregidas por un sistema que se encarga del ADN, se postuló la teoría del microambiente, que indica que la inflamación constituye una estimulación del sistema inmune que altera la matriz extracelular y la interacción entre las células, propiciando el desarrollo de vasos sanguíneos que son esenciales en el desarrollo tumoral.⁸



En la actualidad se describe constantemente que la inmunosupresión y la genética son de los factores más importantes involucrados en el desarrollo del cáncer; la incidencia incrementa en pacientes inmunocomprometidos, para el caso particular de tumores de cabeza y cuello, el carcinoma de labio ha sido reportado en numerosos pacientes con trasplante de riñón que reciben terapia con inmunosupresores, lo mismo que el desarrollo de cáncer oral en pacientes jóvenes VIH positivos. Otro dato descrito refiere que pacientes con polimorfismos tienen mayor riesgo de desarrollar tumores, así como pacientes con la activación de proto-oncogenes como ciclina D1, RAS, MYC, EGR e inactivación de los genes supresores tumorales.⁴

Por otra parte es importante destacar que la mayoría de los tejidos del cuerpo pasan por un proceso de renovación celular en el cual se pierden las células maduras seguidas por la proliferación de las células precursoras jóvenes. Estos datos indican que las células que son producto de las progenitoras se diferencian en tejido maduro que es incapaz de transformarse en cáncer, sin embargo las células troncales y progenitoras no diferenciadas de los tejidos, son vulnerables de sufrir lesiones carcinogénicas en sus propias réplicas del ADN y podrían la principal fuente de la mayoría de los cánceres. ¹

Recientemente se retomó el concepto que se describía hace 150 años, el modelo estocástico, en el cual se indica que el cáncer surge de la transformación de una sola célula progenitora en un clon, que consiste de muchas células descendientes con una acumulación de genes alterados llamados oncogenes y la teoría de las células troncales cancerígenas donde se postula que una pequeña población de células son las encargadas de mantener, producir y provocar la activación de oncogenes.³

Sin embargo aunque las células cancerígenas continúan modificando su comportamiento y propiedades (mutación), las células con un cáncer muy temprano ya son una población heterogénea. El impacto clínico que tiene es



que a través del tiempo y como respuesta hacia los intentos de tratamiento que se realizan el cáncer puede convertirse en una población celular muy resistente. Las células más resistentes y las que proliferan más rápido son las que se convertirán en el tipo celular dominante del tumor; esto se observa en muchos cánceres que pasan de un crecimiento lento y no realizan metástasis a formas de crecimiento rápido, muy invasivos y metastásicos. Lo que distingue un tumor maligno de uno benigno es la capacidad de realizar metástasis de un tumor maligno. Es importante notar que el potencial de realizar metástasis de un tumor está relacionado con la localización y el grado de alteración genética; es independiente del grado histológico de mitosis del tumor. Lo que explica que un COCE bien diferenciado puede producir metástasis en etapas tempranas (T1 y T2) a diferencia de un COCE medianamente diferenciado que producirá metástasis en etapas muy avanzadas. Las células cancerígenas también secretan enzimas, factores de crecimiento, factores de invasión, factores angiogénicos y otra gran cantidad de factores que les dan las propiedades de crecimiento invasivo, división celular independiente y metástasis. Debido a que la letalidad está determinada por la producción de factores de crecimiento y no por la diferenciación ningún método como la microscopía óptica, electrónica o la citometría de flujo pueden predecir el comportamiento preciso del cáncer.¹

CAPÍTULO 2.- CÉLULAS TRONCALES

Son células que tienen la característica de auto renovarse y de dar lugar a células descendentes con capacidad de diferenciarse y dar origen a múltiples estirpes celulares.(fig.2)¹

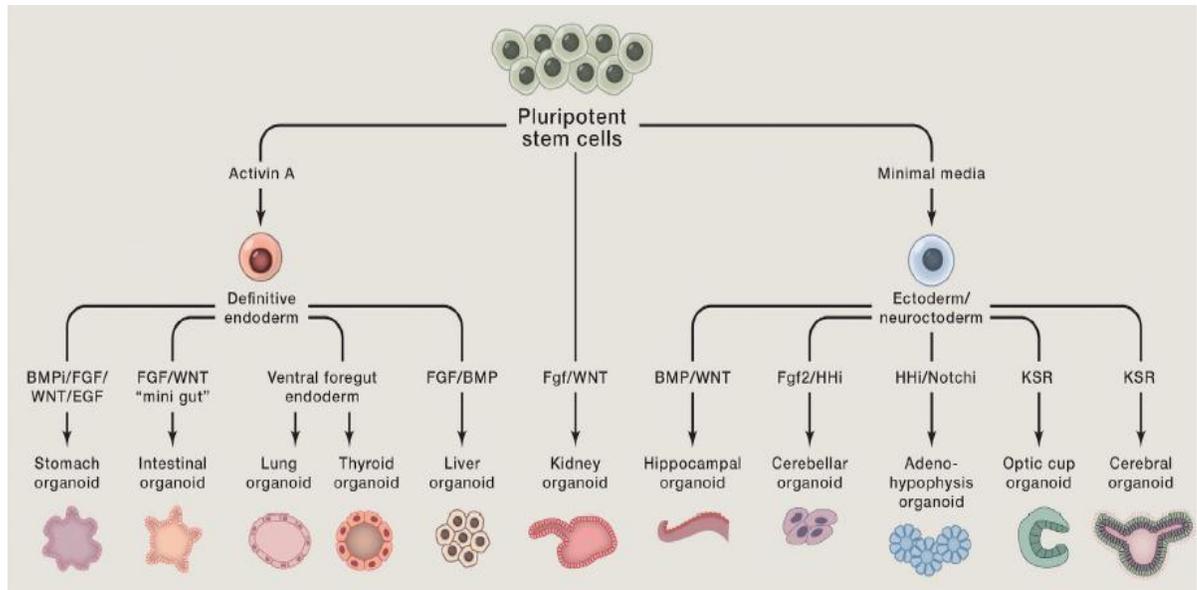


Fig 2. Esquema que muestra la capacidad de diferenciación de las células troncales pluripotenciales.¹

Las células troncales son clasificadas según su origen en: embrionarias, germinales o somáticas (fetales o adultas). Por otra parte según su capacidad para diferenciarse en otros tipos de células, se clasifican como totipotentes, pluripotentes y multipotentes (tabla 1).⁹



Tabla 1. Clasificación de células troncales según su capacidad potencial para formar otros tipos de células⁹

Tipo de célula troncal	Descripción	Ejemplos
Totipotente	Cada célula puede desarrollarse en cualquier tipo de célula	Células de embriones tempranos (1–3 días)
Pluripotentes	Las células pueden formar casi cualquier tejido (más de 200)) tipo de célula	Algunas células de blastocisto (5 a 14 días)
Células multipotentes diferenci	solo en tipos de células específicas	Tejido fetal, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, médula ósea

Las células germinales son las que dan origen a los gametos (ovocito y espermatozoide).¹⁰

Las células troncales somáticas son especies relativamente raras indiferenciadas que se encuentran en gran variedad de órganos y tejidos diferenciados con capacidad de auto-renovación y diferenciación. Su capacidad para diferenciarse varía dependiendo del órgano en el que sean aisladas.¹¹

Las células troncales embrionarias (ESC) se derivan de la masa celular interna de un blastocisto, que se forma unos días después de la fertilización. Durante la embriogénesis, la masa celular interna es capaz de generar el ectodermo primitivo que eventualmente dará lugar a las 3 capas germinales primarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Una característica principal que diferencia éstas células troncales de las demás es su habilidad de proliferar en cultivos a largo plazo manteniendo su naturaleza pluripotencial.⁹

En 2006 un reporte de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés) estableció 3 características principales que deben



tener este tipo de células:

- 1.-Deben adherirse a superficies plásticas cuando se mantienen en condiciones estándares de cultivo.
- 2.-Deben expresar CD105, CD73 y CD90 y ausencia de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79-alfa o CD19 y moléculas de superficie HDLA-DR. Sin embargo este panel no es putativo de todos los linajes celulares.
- 3.-Deben diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos in vitro.¹²

Esta sociedad establece el término en 2006 “Células multipotenciales del estroma mesenquimal” a las células que se adhieren a superficies plásticas y pueden ser aisladas de la membrana basal.¹²

2.1 CÉLULAS TRONCALES DE CAVIDAD ORAL

En la cavidad oral se han aislado diferentes tipos de células con fenotipo mesenquimal, a diferencia de los otros tipos de células troncales, las de los dientes derivan de la cresta neural y están relacionadas con el linaje de células progenitoras de los nervios periféricos lo que les da la posibilidad de regenerar tanto tejido conectivo como nervioso. Se han aislado distintos tipos de células troncales en los dientes: células progenitoras del folículo dental, Células troncales del ligamento periodontal, Células troncales de la papila apical, Células troncales de los dientes prematuramente exfoliados y las células troncales de la pulpa dental que sin duda han sido las más utilizadas para la investigación, además de las que se han logrado aislar del ligamento periodontal, del hueso alveolar y de la encía.¹³

Se han aislado células troncales con capacidad regenerativa también de la glándula parótida, pacientes con cáncer en la región de cabeza y cuello reciben radiación que se ve reflejada en la reducción de la producción de



saliva por lo que se busca regenerar por medio de éstas células la capacidad de salivación.¹⁵

2.1.1 CÉLULAS TRONCALES DE LA ENCÍA

Células con capacidad de autorenovación y capacidad pluripotencial han sido aisladas de la encía humana, éstas células expresan el CD73, 90, 105 y otros más. In vitro tienen la capacidad de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Con el cultivo adecuado expresan también marcadores de las células endoteliales como el CD31 y bajo condiciones de diferenciación neural dan positivo a marcadores neurales como proteína acídica fibrilar, nestina y otros más. In vivo son capaces de formar tejido conectivo con la presencia de células semejantes a los fibroblastos y fibras de colágena. Si éstas células son tratadas con dexametasona, al ser trasplantadas en ratones inmunocomprometidos son capaces de generar tumores mixtos (ectodérmicos y endodérmicos) que incluyen músculo estriado, cartílago, hueso y tejido epitelial, lo que da indicios que son capaces de generar tejidos que se desarrollan de la cresta neural durante la embriogénesis.¹⁶

2.1.2 CÉLULAS TRONCALES DERIVADAS DEL HUESO ALVEOLAR

Éstas células expresan los marcadores superficiales CD73, CD90, CD105 y STRO-1.¹²

In vitro muestran la capacidad de diferenciación hacia linajes osteoblásticos, condrogénicos y adipogénicos, bajo condiciones adecuadas en el cultivo se puede inducir la osteogénesis.

In vivo inducen la formación significativa de hueso en ratones inmunocomprometidos, en este tejido neoformado se pueden observar osteoblastos y osteocitos.¹⁶



2.1.3 CÉLULAS TRONCALES DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.

Las terapias convencionales enfocadas al periodonto humano se enfocan a la regeneración del tejido por medio de la eliminación de la placa dentobacteriana, el cálculo de las zonas afectadas y por medio de distintos injertos, pero no ha sido posible restaurar completamente la función debido a la complejidad del sistema.¹⁷

Se ha identificado que el ligamento periodontal contiene poblaciones de células progenitoras y de células con características de troncalidad capaces de diferenciarse en adipocitos, células productoras de colágeno y células semejantes a los cementoblastos dependiendo de las características del cultivo.¹⁷

Como dato importante las células troncales pueden ser aisladas no solo del ligamento periodontal sano, también del tejido inflamado y aún así conservan su capacidad de formar cemento y otros tejidos relacionados con el ligamento periodontal, lo que lo hace una ventaja puesto que no se necesita la extracción dental para obtener dichas células.¹⁷

In vivo expresan una amplia gama de marcadores asociados con dentina, hueso, músculo, tejido neural y forman nódulos calcificados, tienen la capacidad de diferenciarse en células osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas dependiendo de la característica del cultivo, en ratones inmunocomprometidos son capaces de generar tejido similar al cemento y regenerar el ligamento periodontal.¹⁷

Estudios recientes han demostrado que células troncales del ligamento periodontal aisladas de la superficie del hueso alveolar mostraron mayor diferenciación hacia células osteogénicas y adipocitos a comparación de las que se pueden aislar de la raíz dental lo que sugiere que este tipo de células



troncales tienen diferentes características dependiendo del sitio de donde sean aisladas.¹⁶

2.1.4 CÉLULAS TRONCALES DENTALES

Este tipo de células troncales pueden ser aisladas satisfactoriamente en diferentes grupos de diversas edades. Está demostrado que la capacidad pluripotencial y de regeneración está relacionada con el momento en que son aisladas las células respecto a la edad del paciente, el potencial decrece en cuanto la edad aumenta.

Estas células han sido aisladas tanto en dientes permanentes como deciduos sin alguna diferencia característica relacionada con los marcadores que expresan o la diferenciación, sin embargo las células aisladas de dientes permanentes tienen mayor capacidad de formación de tejido semejante al cemento.

Hasta el momento se han identificado células troncales del ligamento periodontal, de la papila apical, de los dientes deciduos exfoliados, células troncales del folículo dental y células troncales de la pulpa dental.(fig. 3)^{13,14}

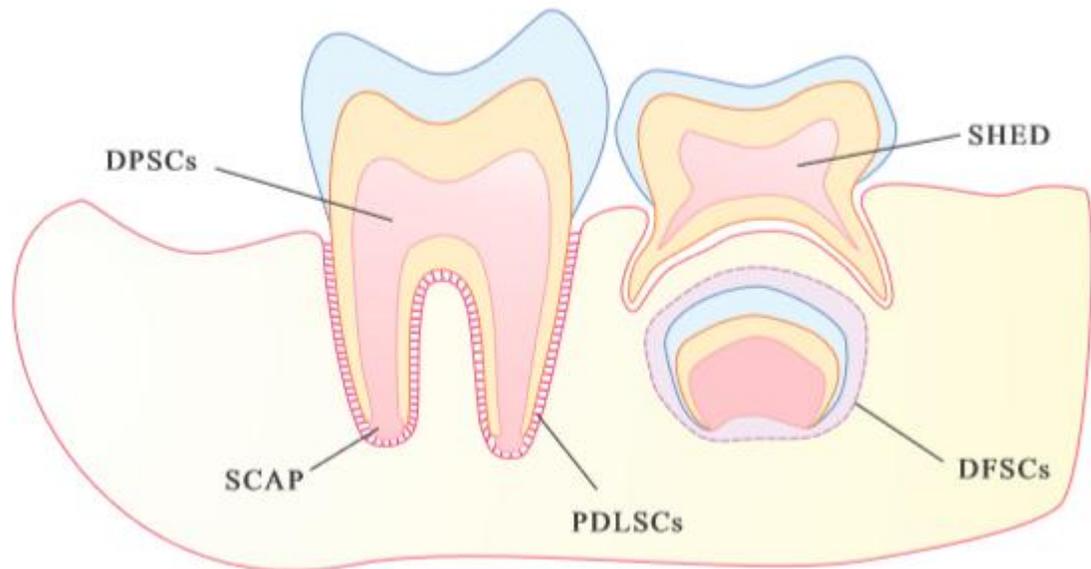


Fig. 3 Esquema que muestra la ubicación de las células troncales identificadas en los tejidos dentales, todas por sus siglas en inglés: Células troncales de la pulpa dental (DPSCs), Células troncales de la papila apical (SCAPs), células troncales de dientes humanos primarios exfoliados (SHEDs), células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs), células troncales del folículo dental (DFSCs).¹⁴

2.1.4.1 CÉLULAS TRONCALES DE LA PULPA DENTAL

Estas células expresan varios marcadores superficiales tales como CD73, 90 y 105.¹²

Éstas células pueden desarrollarse *in vitro* para formar adipocitos, células neurales, además de tener la capacidad para diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, miocitos, cardiomiocitos, neuronas activas, melanocitos y células semejantes a los hepatocitos.¹⁶

In vivo pueden formar nódulos mineralizados en la superficie de dentina humana, con los materiales adecuados de andamiaje (fosfato de calcio, ácido poliláctico, etc.) se pueden generar estructuras similares a las de la dentina.¹⁶

También se ha observado que pueden diferenciarse en adipocitos, células endoteliales y fibras musculares y mejorar la vascularización.¹³



Recientemente un estudio específico demostró que las células troncales de la pulpa dental al ser inyectadas con puramatrix y colágeno tipo 1 en los canales radiculares de un premolar in vivo son capaces de regenerar el tejido pulpar y de diferenciarse en odontoblastos funcionales productores de dentina.¹³

La combinación de células troncales dentales de ratón con células troncales mesenquimales está demostrado que forman órganos dentarios funcionales, en 2011 se desarrollaron e implantaron órganos dentales en ratones que se adaptaron adecuadamente e incluso funcionalmente, mostrando adecuada dureza del esmalte y dentina, adecuada estructura, función del ligamento periodontal y adecuada función ósea ante los movimientos ortodóncicos.¹³

2.1.4.2 CÉLULAS TRONCALES DE LOS DIENTES DECIDUOS EXFOLIADOS

Éstas células tienen una tasa de proliferación más alta que las de la pulpa dental adulta, su población es el doble y tienen la capacidad de formar estructuras esféricas.¹⁶

In vitro muestran tendencia a la osteogénesis, odontogénesis y adipogénesis dependiendo de la característica del cultivo. En un cultivo para diferenciación hepática muestran producir proteínas específicas del hígado y adquirir la morfología de un hepatocito. También han mostrado diferenciación hacia células endoteliales cuando se cultivan en una porción de dentina.¹⁶

In vivo continúan expresando marcadores neurales al ser trasplantadas al hipocampo de ratones inmunocomprometidos. También inducen la formación de hueso por medio de las células osteogénicas del huésped por lo que pueden estar relacionadas con la formación de hueso durante la erupción de los dientes permanentes.¹⁶



2.1.4.3 CÉLULAS TRONCALES DEL GÉRMEN DENTAL

Estas células se han aislado del folículo dental de los terceros molares humanos.¹⁶

In vitro muestran la capacidad de diferenciación en células osteogénicas, cementoblastos y células hepáticas.

In vivo éstas células combinadas con un andamio de cerámica porosa y al ser trasplantadas en ratones inmunocomprometidos producen tejido similar al hueso con células semejantes a los osteocitos.¹⁶

2.1.4.4 CÉLULAS TRONCALES DE LA PAPILA APICAL

La papila apical es el tejido blando que se encuentra en los ápices de los dientes en desarrollo, de la cual se identificaron poblaciones de células troncales. Éstas células muestran una tasa de proliferación más alta que las de la pulpa dental y también expresan los marcadores CD73, 90, 105 y STRO-1.^{12,16}

In vitro pueden diferenciarse en células adipogénicas y osteogénicas.

In vivo pueden formar estructuras similares a la dentina, aparentemente son la fuente principal de la formación de la dentina radicular. En combinación con las células troncales del ligamento periodontal son capaces de formar un complejo biológico similar al de la raíz dental.¹⁶

2.1.5 CÉLULAS TRONCALES DE LA PAPILA FUNGIFORME DE LA LENGUA

Se conoce que la localización de las células progenitoras de la papila fungiforme de la lengua se encuentran en los brotes del sentido del gusto o en la epidermis circundante, se han aislado este tipo de células en ratones, las cuales, con un cultivo adecuado se pueden inducir para formar estructuras esferoidales (fig. 4) con este tipo de células que expresan diferentes marcadores.¹⁸

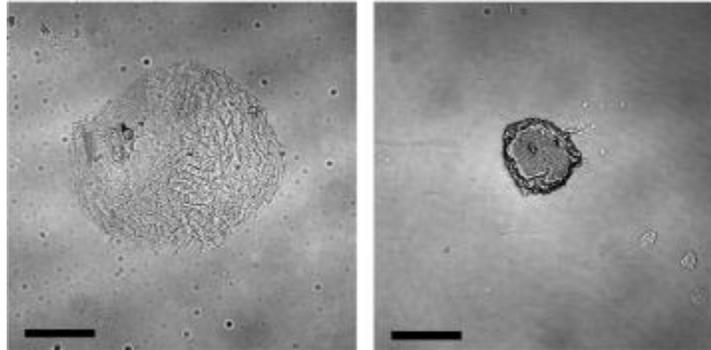


Fig. 4 Imagen de microscopio de contraste de fase mostrando la agrupación esferoidal de las células de la papila fungiforme.¹⁸

2.1.6 CÈLULAS TRONCALES DE LAS GLÀNDULAS SALIVALES

La población de células troncales en las glàndulas salivales tanto en ratones como en humanos responden al marcador específico c-Kit y se ha demostrado que la mayor cantidad de células que expresan este marcador (funcionales para el desarrollo e investigación) se encuentran principalmente en los conductos más amplios, nuevamente la exigencia de nuevas alternativas de tratamiento e incluso el rediseño de tratamientos radicales como la radioterapia en pacientes con càncer nos obligan a la investigación acerca de èstas células progenitoras.

Las células pueden ser aisladas e inducidas a formar estructuras esferoidales (fig. 5) , pueden ser tanto de la porción interna como externa de la glàndula, estas células al ser aisladas pueden inducirse a la formación de organoides, sin embargo esta función se ve comprometida si las células han recibido alguna dosis de radiación.¹⁵

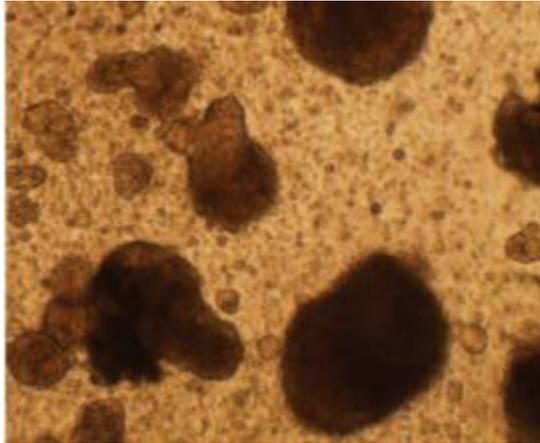


Fig. 5 Micrografía que muestra la agrupación esferoidal de las células de una glándula salival.¹⁵



CAPÍTULO 3.- TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE PATOLOGÍA

3.1 PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa)

Es un método basado en la habilidad de la enzima DNA polimerasa para sintetizar nuevas hebras de DNA complementario a partir del DNA modelo. Esta enzima puede añadir nucleótidos sólo a un grupo 3'-OH preexistente por lo que necesita de un primer al cual pueda añadir el primer nucleótido, esto hace posible delimitar la región específica que se quiere amplificar. Al final del PCR se acumularán billones de copias de la secuencia específica (amplicon).

Un estudio actual muestra su importancia en el diagnóstico de enfermedades como la lepra, el reporte muestra que el PCR puede ser el estudio principal para el diagnóstico de esta enfermedad al examinar muestras de piel, incluso más importante que la microscopía, además se reporta que con el uso de más de un marcador se aumenta su efectividad. Si este estudio se logra consolidar para muestras de sangre u orina en el futuro podría evitar la toma de biopsias, un procedimiento que puede llegar a ser sumamente invasivo para los pacientes.^{19,20}

3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Es un método utilizado para la detección de antígenos en porciones de tejido por medio de sus anticuerpos específicos. Su ventaja más importante sobre los métodos convencionales de detección de proteínas es la habilidad de relacionar la presencia del antígeno con su localización en el tejido o la célula. Es muy importante para el estudio de la función celular en condiciones normales y patológicas.

Inicialmente se utilizaba para la detección de un sólo antígeno, actualmente hay kits de detección que permiten la identificación de al menos dos antígenos utilizando dos enzimas como etiqueta (peroxidasa y fosfatasa alcalina).²¹



Su importancia en el diagnóstico e identificación de elementos es de suma importancia, un estudio en 2014 muestra su eficacia en la detección del gen HER-2 (receptor de factor de crecimiento epidérmico humano por sus siglas en inglés) que está presente en la mayoría de los cánceres de mama primarios, la importancia de la detección de este gen radica en la terapia farmacológica, sin la presencia del HER-2 la terapia es diferente y por medio de la técnica inmunohistoquímica es posible detectar su presencia y localización.^{21,22}

3.3 WESTERN BLOT

Es una técnica de suma importancia utilizada en biología celular y molecular. Sirve para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células.

Esta técnica utiliza tres elementos importantes:

- Separación por tamaño
- Transferencia a un soporte sólido
- Marcaje de la proteína diana utilizando un anticuerpo primario y uno secundario para poder visualizarla.

Un estudio reciente muestra su aplicación en el análisis de producción de factores melanogénicos asociado a exposición ultravioleta; la enzima SOD3 es un antioxidante que sirve para regular las especies reactivas de oxígeno, sin embargo, en el estudio se describe su función inhibidora de factores melanogénicos al ser utilizada en células productoras de melanina expuestas a radiación UV. Las proteínas como ET-1, EDNRA, Wnt7 y SCF inducen la formación de melanina en las células productoras expuestas a radiación UV, al ser tratadas con SOD3 se observa su baja expresión, la cuantificación de estas proteínas se realizó por medio de Western blot.^{23,24}



3.4 CRISPR- Cas9

Es un sistema que permite crear rupturas de las dobles hebras en el DNA para que después se reparen; estas rupturas solo pueden ser reparadas por recombinación homóloga durante la fase S/G2 del ciclo celular o en células que acaban de realizar mitosis.

Un estudio en 2016 muestra la combinación de este sistema de modificación genética con terapia farmacológica y su efectividad en Tirosinemia hereditaria tipo 1 en ratones; ésta enfermedad es causada por la deficiencia de fumarylacetoacetato hidrolasa que se encarga del paso final en el catabolismo de la tirosina lo que lleva a su acumulación y la de metabolitos tóxicos en la sangre. Después de tratar a los ratones con CRISPR-Cas9 y los fármacos se demostró un decremento en los niveles de tirosina en plasma mostrando la efectividad del sistema, lo que podría ser una alternativa de tratamiento para la especie humana en el futuro.²⁵

3.5 CULTIVO CELULAR

El cultivo es el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células in vitro, manteniendo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. El tipo de cultivo más utilizado es el primario. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Al cabo de un tiempo hay que trasplantar las células a un nuevo soporte.²⁶

Cultivos en monocapa: las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio). El anclaje al sustrato es un prerrequisito para la



proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células excepto para las hematopoyéticas.²⁶

Cultivos en suspensión: las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje. Este tipo de cultivo se restringe a las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes.²⁶

Las células del cultivo primario en monocapa se dispersan por métodos enzimáticos y se pasan a un nuevo frasco de cultivo. En el caso de células en suspensión, sencillamente se diluyen en un medio fresco. Los sucesivos cultivos así formados se denominan una línea celular.

La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica que:

- aumenta el número de células obtenidas
- acaban predominando uno o dos tipos celulares: los que tienen mayor tasa de crecimiento
- la población celular se hace uniforme y homogénea
- sus características se conservan durante las sucesivas generaciones y, si se conservan en nitrógeno líquido, de forma indefinida.

Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar (supuestamente por el acortamiento de los telómeros) y mueren. Sin embargo, algunas células (como las de roedores y las tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación.²⁶



3.4 CULTIVO CELULAR EN 3D

Muchos tipos celulares han podido ser cultivados desde el aislamiento de las primeras células (HeLa), lo que se ha logrado por medio de herramientas como la perfilación del DNA y los estudios citogenéticos que sirven para identificar caracterizar las diferentes líneas celulares.

La importancia de los cultivos en 3D radica en que las líneas celulares nos proveen de un material homogéneo de estudio, el hecho de que se organicen y agrupen en estructuras tridimensionales las induce a comportarse de una manera similar a las condiciones naturales. A la fecha el cultivo en 3D ha servido para estudiar alrededor de 380 especies celulares, las características del cultivo varían dependiendo de las necesidades de cada línea celular.

Las ventajas del cultivo en 3D sobre el de 2D radican en lo siguiente:

- Susceptibilidad real a los fármacos lo que permitirá estudiar sus interacciones, el descubrimiento de nuevos fármacos y la reducción en la experimentación con animales.
- Permite el estudio de las señalizaciones celulares y los mecanismos de expresión genética, potencial de estudio para mutagénesis y biología de la radiación.
- Permite el estudio de los mecanismos de control, de los factores de transcripción y perfiles metabólicos, adecuados para el estudio/descubrimiento de biomarcadores y estudios relacionados con la biología del cáncer.
- Sirven como excelentes modelos de desarrollo en el área de bioingeniería de tejidos que puede tener aplicación en áreas regenerativas y otras áreas terapéuticas.²⁶

Una importante contribución que nos acerca al estudio del comportamiento in vivo de los cultivos en 3D son las matrices y materiales estructurales utilizados, entre ellos principalmente agarosa, colágeno, fibronectina, gelatina, laminina y fibronectina, a la fecha más de 100 matrices diferentes



están siendo utilizadas, el material dependerá del tipo celular a desarrollar.

La matriz de colágeno tipo 1 es la más utilizada debido al costo, la facilidad de procesarse y la facilidad para la manipulación celular.

Los materiales sintéticos también pueden ser utilizados para emular el ambiente extracelular como porosidad, fibrosidad, permeabilidad y estabilidad mecánica, esta micro estructura une la reacción bioquímica y biofísica de las células adheridas para una mayor expresión in vitro.

La función de la matriz 3D es proveer un ambiente biológicamente activo para las células que les permita proliferar, diferenciarse y secretar específicas matrices extracelulares que tendrán potencial para diferentes aplicaciones.²⁶

3.4.1 ESFEROIDES

Los esferoides son un modelo de cultivo 3D que aprovecha la tendencia natural a agregarse que muestran muchos tipos celulares, para crear masas multicelulares de forma esférica, que son objeto de cultivo in vitro. En la práctica, este modelo puede ser utilizado en cualquier tipo de investigación biomédica, debido a que, si se dan las condiciones adecuadas, se pueden formar esferoides con cualquier tipo de célula. Los esferoides se han utilizado con éxito en importantes campos científicos, tales como el de la Biología Celular (adhesión, migración o morfogénesis), la Virología (aislamiento, propagación y cuantificación de virus, interacción célula-virus); la Farmacología (evaluación de fármacos); la Inmunología (producción de vacunas, uso de moduladores inmunitarios); la Cirugía (comportamiento de células de diferentes tejidos, como las de hueso y cartílago en diferentes medios o frente a diferentes materiales); la Oncobiología y la Cancerología (recreación de tumores, estudios de quimiocinas en células cancerosas, o terapia basada en anticuerpos); la Biología del Desarrollo y de la Fertilización (desarrollo de embriones).²⁷

Un método sencillo para generar esferoides consiste en crear gotas de una suspensión celular (“método de la gota colgante”) sobre la cara inferior de una superficie de vidrio o plástico (placa de Petri).(fig. 6) ²⁷



Fig. 6 Fotografía que muestra el método de la gota colgante.²⁷

En cada gota así creada, las células se desplazan hacia el fondo de la misma, donde forman un agregado, para originar finalmente una masa de forma esferoidal o esferoide.(fig. 7)²⁷

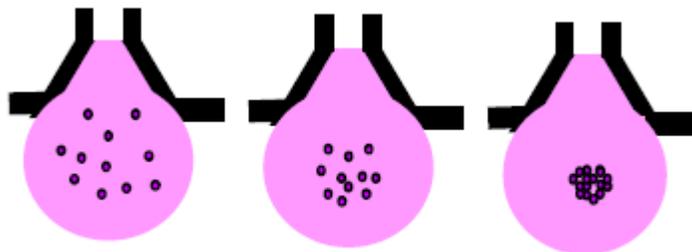


Fig. 7 Esquema del desplazamiento celular para la formación de una estructura esferoidal en el método de gota colgante.²⁷

Dependiendo del número de tipos celulares presentes en el esferoide, se pueden crear esferoides en forma de cultivo simple (esferoide monocelular) o como co-cultivos (esferoide multicelular). Una vez creadas las gotas



pendientes de su soporte, conteniendo cada gota un esferoide, el soporte es llevado a un incubador. ²⁷

Otro método importante para crear esferoides es a través de nanopartículas, este método será descrito más adelante.

3.4.2 ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN

Los cultivos en 3D han sido usados para muchos estudios en el área de células troncales y estudios de diferenciación, las células troncales son ampliamente usadas como fuente principal para los modelos en 3D, esto se debe principalmente a los avances en matrices y materiales estructurales. Los cultivos en 3D nos dan la posibilidad de extender la investigación celular básica hacia su aplicación terapéutica.

Estudios han mostrado que los sistemas en 3D son útiles para entender los mecanismos de la diferenciación de osteoblastos hacia osteocitos y para entender su función en la metástasis ósea y su aplicación en la ingeniería tisular. Según la descripción de Farrel en 2007 es posible lograr la osteogénesis utilizando células troncales mesenquimales de ratón utilizando colágeno tipo 1, según Hosseinkhani se muestra el aumento de la expresión de marcadores osteogénicos como osteonectina, fosfatasa alcalina, colágeno tipo 1, etc, durante la diferenciación de las células troncales de la médula ósea en ratones.

Los cultivos en 3D mostraron incremento en la diferenciación de células troncales embrionarias de ratón hacia células precursoras hematopoyéticas en comparación con sus cultivos en 2D.

La condrogénesis y expresión de genes específicos de los condrocitos a partir de células humanas del estroma de la médula ósea fue posible mediante el uso de sistemas de cultivo en 3D.

Los cultivos celulares en 3D son incluso una excelente fuente para obtener continuamente una dotación de células específicamente diferenciadas, por



ejemplo las células troncales pluripotenciales inducidas y las células troncales embrionarias humanas proveen una fuente ilimitada de hepatocitos humanos debido a su indefinida capacidad de auto renovación y sus propiedades pluripotenciales. La supervivencia prolongada de las células diferenciadas en modelos tridimensionales es una gran ventaja en la ingeniería tisular que puede volverse la alternativa a probar fármacos en animales facilitando el descubrimiento de fármacos, la terapia genética, el estudio de la biología del cáncer y avances en medicina regenerativa.²⁶

3.4.3 APLICACIONES FARMACOLÓGICAS

Hasta 1980 los modelos animales eran ampliamente utilizados para el descubrimiento y prueba de nuevos fármacos pero con el tiempo y debido a las necesidades la práctica en animales se volvió demasiado costosa y poco ética.

Los cultivos en 3D tienen mayor potencial de identificar la toxicidad de los fármacos, sustancias no efectivas en etapas tempranas del descubrimiento de fármacos que las pruebas clínicas o animales además de reducir la controversia del uso de modelos animales y disminuir el costo de las complejidades experimentales que estos representan; los cultivos en 3D y la manera en que las células se desarrollan en estos modelos es importante para la respuesta farmacológica que puedan tener.

Modelos tridimensionales mostraron diferencia (a comparación de los modelos 2D) en la eficacia para predecir la hepatotoxicidad fármacoinducida. Modelos tridimensionales de hepatocitos fueron menos susceptibles que los 2D al metotrexato lo que acerca más a la realidad sobre la prueba de fármacos, también mostraron incrementada resistencia a la sustancia en cultivos 3D de hepatocitos de roedor.²⁶



3.4.4 BIOLOGÍA DEL CÁNCER

Muchos tipos celulares de tumores cultivados en esferoides tridimensionales muestran 3 capas, la capa central necrótica, la interna y la externa proliferativa, estas capas imitan el microambiente de los tumores sólidos en los humanos. Varias características de los tumores in vivo han sido mostradas por los esferoides in vitro.

La utilidad de estos cultivos en 3D incluye el estudio de las vías de señalización, comunicación celular, diferencia en las tasas de proliferación celular y sus patrones además de estudios acerca de biomarcadores en cáncer, invasión, metástasis y angiogénesis tumoral.

Hay muchas características similares de las células cancerosas cultivadas en 3D que son paralelas a los tumores in vivo, particularmente en etapas tempranas del crecimiento tumoral antes de que aparezca vascularización.

Los núcleos necróticos de los tumores in vivo pueden ser vistos en los cultivos 3D, aunado a esto los índices proliferativos de las células tumorales son bajos en este tipo de modelos.

También hay reportes diferenciales del metabolismo de las células tumorales entre los cultivos en monocapa y los modelos 3D, cuando son comparados con los de 2D las células cancerosas mostraron una sensibilidad disminuida a la apoptosis inducida por quimio y radioterapia además de que la sensibilidad celular a la quimioterapia basada en citotoxicidad es significativamente baja en modelos 3D.^{26,28,29}

CAPÍTULO 4.- ORGANOIDES

4.1 ANTECEDENTES

Científicos como Wilson, Holtfreter y Weiss realizan los primeros experimentos de disociación-reagregación en animales como ranas y embriones de pollo.

1907-1960

1961 y 1964

Científicos como Pierce, Verney y Steinberg realizan los primeros trabajos sobre diferenciación tanto embrionaria como celular in vitro.

La década de los 80's fue muy significativa, Evans establece las primeras células troncales de ratón, 6 años más tarde Bisell y colegas muestran la organización 3D del epitelio del pecho.

1981 y 1987

1998

Thompson aisla y cultiva la primera línea celular embrionaria humana a partir de blastocitos

Sasai y colegas generan tejido de corteza cerebral a partir de células troncales pluripotentes, 1 año más tarde Clevers y colegas generan organoides intestinales, los primeros organoides ya establecidos.

2008 y 2009

4.2 GENERALIDADES

Los organoides se derivan de células pluripotenciales o de precursoras de órganos, que se organiza independientemente a través de la diferenciación celular para formar una estructura no muy diferente del órgano in vivo. (7)

Debido a la capacidad de diferenciación de las células troncales pluripotenciales estas pueden regenerar virtualmente cualquier tipo de célula. Los organoides derivan de las células troncales pluripotenciales o de células progenitoras que se diferencian para formar tejido, exhibiendo diferentes tipos de células que se agrupan para formar estructuras parecidas a un órgano. Hay varias características con las que un organoide debe de cumplir, que son propias de un órgano:

- Debe tener más de un tipo celular del órgano que modela
- Debe mostrar alguna función específica de dicho órgano (filtración, excreción, etc...)
- Las células deben estar agrupadas espacialmente y similar al órgano emulado.³⁰

4.3 POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS ORGANOIDES

El modelo de estudio de las enfermedades es uno de los principales objetivos de los organoides, puede ir hasta desórdenes del desarrollo, cáncer, enfermedades infecciosas y degeneración.



Las células troncales pluripotenciales humanas serán una herramienta muy valiosa en el futuro del modelo de estudio de las enfermedades. Recientemente los organoides de riñón fueron generados a partir de células troncales pluripotenciales inducidas de un paciente con enfermedad poliquística del riñón lo que es una gran herramienta para el estudio de esta y otras condiciones genéticas.³¹

Los organoides cerebrales tienen en particular un potencial muy grande, pueden ser utilizados para modelar desórdenes neurológicos que a la fecha ha sido muy difícil o imposible modelar en animales. En el futuro los organoides cerebrales pueden tener el potencial de modelar desórdenes tales como autismo, esquizofrenia, epilepsia e incluso enfermedades neurodegenerativas propias de edades avanzadas como el Alzheimer.

Los organoides también tienen el potencial de ser usados para probar la eficacia y toxicidad de los componentes de los fármacos. Lo que puede ser aplicado en el mismo campo de estudio del modelaje de enfermedades degenerativas lo que sería una gran ventaja y uno de los principales avances, el dejar de usar animales para hacer pruebas, únicamente cuando se requiera un estudio de un organismo completo. Para esto los organoides de hígado serán de gran relevancia ya que éste órgano es el encargado de metabolizar los fármacos de manera distinta a los animales, incluso la creación de metabolitos tóxicos sería estudiada en humanos y no en animales, los brotes de hígado ya creados han mostrado producir metabolitos específicos de la especie humana lo que sugiere que este tipo de organoides son esenciales para el descubrimiento de nuevos fármacos.(7,8)

Finalmente los organoides tienen el potencial de proveer acercamientos enfocados al reemplazo celular e incluso de órganos, pueden volverse una fuente autóloga de trasplante de tejidos, por ejemplo, los organoides renales tienen un gran potencial terapéutico ya que el riñón es el órgano con la tasa más alta de falla en etapas terminales y lo vuelve el más solicitado en la lista de trasplantes. Actualmente ya se logró trasplantar organoides renales

debajo de la cápsula renal en ratones adultos lo que llevó a la revascularización, un paso muy prometedor en las estrategias de remplazo de órganos (fig. 8,9).^{30,32}

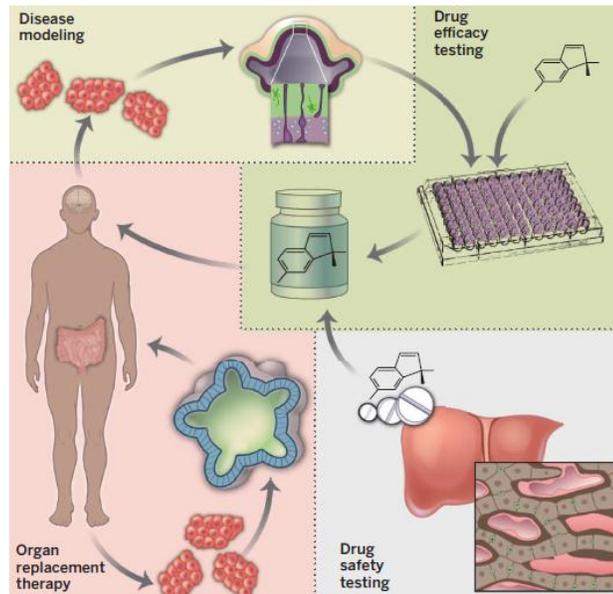


Fig. 8 Esquema que muestra el potencial terapéutico de los organoides.³⁰

Sin embargo aunque es importante conocer el potencial terapéutico de los organoides también es importante conocer sus limitaciones, por ejemplo la incompleta caracterización y maduración de los sistemas como sucede en los organoides retinales donde los fotorreceptores no se ha logrado que maduren para ser sensibles a la luz o los organoides cerebrales que emulan etapas tempranas del desarrollo cerebral pero han fallado en madurar hacia etapas avanzadas como la formación de las capas corticales. El aspecto de maduración parece ser un contratiempo en común en el desarrollo de los organoides, lo que afecta su potencial terapéutico y de investigación, sin embargo organoides como los intestinales han mostrado características de maduración como la producción de células troncales adultas LGR5. Otros organoides han mostrado maduración una vez trasplantados.³⁰⁻³²



Finalmente la vascularización ha sido un inconveniente para el desarrollo de organoides in vitro ya que debido a la falta de irrigación y de nutrientes tienen un potencial de crecimiento limitado, lo que también afecta su maduración; varios avances han sido realizados para solucionar esto como el uso de biorreactores giratorios que pueden proveer una cantidad de nutrientes permitiéndoles un mayor crecimiento aunque sea milimétrico.

De manera alternativa el cultivo con células endoteliales puede generar estructuras similares a las redes vasculares, sin embargo la solución más efectiva ha sido el trasplante de estos tejidos como se ha realizado en los organoides de hígado y riñón lo que estimula la invasión de la red vascular del huésped.³⁰

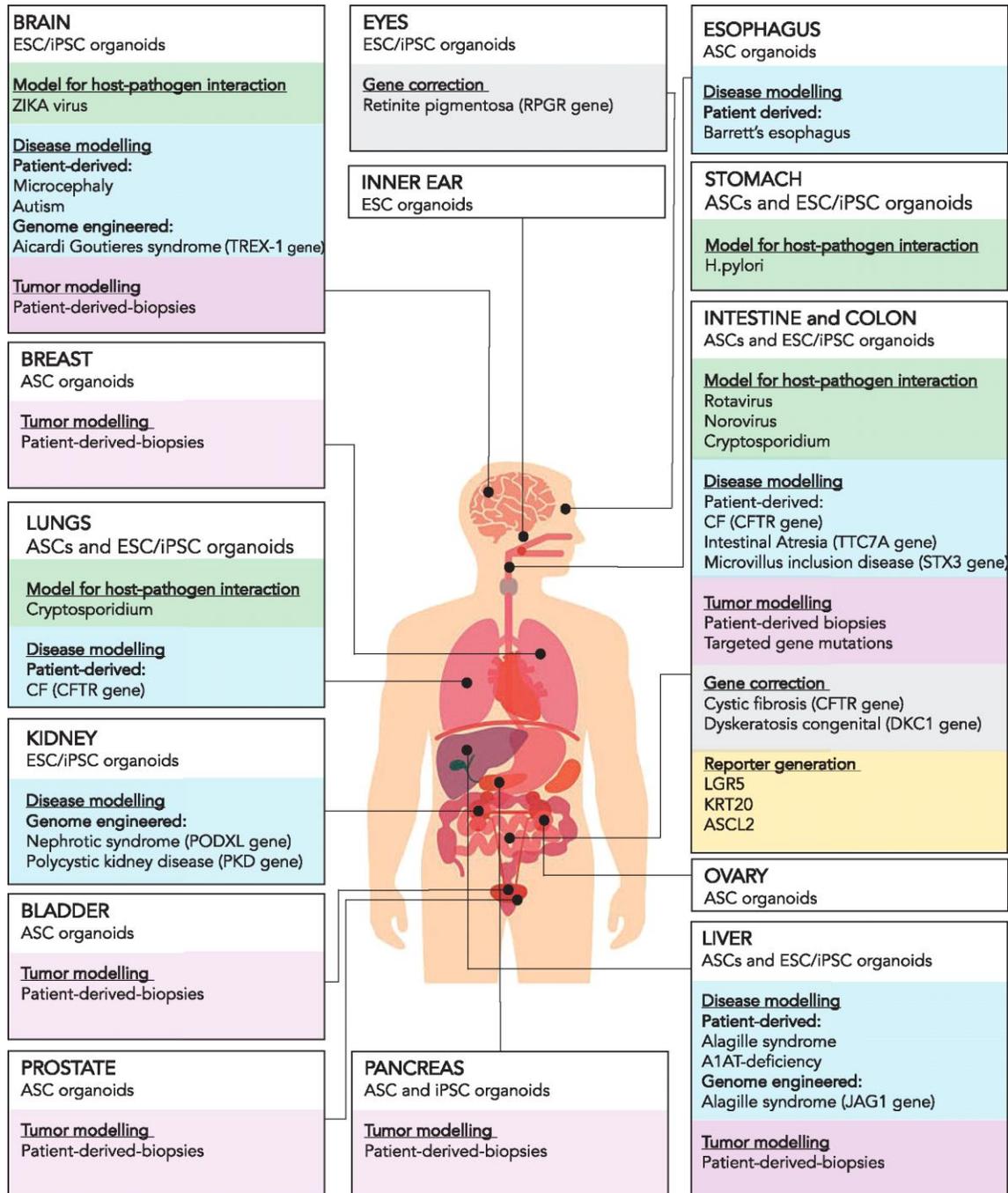


Fig. 9 Esquema que muestra la aplicación actual de los organoides.³²



4.4 ORGANOIDES: DESARROLLO TUMORAL Y ESTUDIO FARMACOLÓGICO

4.4.1 HÍGADO

El cáncer primario de hígado es la segunda entidad maligna más letal a nivel mundial, de ahí la importancia de su estudio.

Tres tipos de cáncer primario hepático son los más comunes: Carcinoma Hepatocelular (CH), Colangiocarcinoma (CC) y un mixto llamado Colangiocarcinoma Hepatocelular (CHC).

El cultivo de organoides se realiza a partir de células troncales o células progenitoras sanas, para el estudio tumoral se realiza a partir de células cáncergenicas.

Este tipo de células cultivadas en 3D de los tres tipos principales de cáncer primario hepático (CH, CC y CHC) son capaces de imitar las características principales del tumor incluyendo:

- La expresión de marcadores característicos del cáncer primario hepático lo que podría ser de utilidad para el pronóstico de los pacientes.
- Los organoides derivados de las células tumorales mantienen las alteraciones genéticas del tumor del paciente (mutaciones somáticas, aneuploidía, etc.)
- Son capaces de replicar las características histológicas del tumor primario y de realizar metástasis in vivo, está reportado que este cáncer realiza metástasis principalmente a los pulmones y a los nodos linfáticos portales, al ser trasplantados los organoides del tumor en ratones inmunocomprometidos estos mostraron tener metástasis pulmonar.
- Son capaces de mostrar sensibilidad farmacológica específica del paciente del que son desarrollados²⁸

Un estudio en 2017 hecho por Broutier et al. muestra el desarrollo de 6 organoides derivados de tumores de pacientes con diferentes cánceres



hepáticos, se observó lo siguiente:

- El fármaco taselisib funcionó como un inhibidor de crecimiento en 5 de los 6 modelos.
- El fármaco dasatinib suprimió la formación del organoide únicamente en células de un modelo de colangiocarcinoma.
- El organoide de colangiocarcinoma hepatocelular fue sensible al fármaco AZD8931 inhibiendo este su crecimiento.²⁸

4.4.2 PÁNCREAS

El adenocarcinoma ductal pancreático es la entidad maligna más letal a nivel mundial y la de peor pronóstico y esperanza de vida para los pacientes debido a su diagnóstico tardío y a su limitada respuesta al tratamiento.

Mediante el desarrollo de organoides derivados de las células de este tumor se han logrado identificar características importantes del tumor primario como la poca vascularización que tiene lo que explica el inconveniente de la correcta distribución del fármaco, además de mantener la misma arquitectura histológica y el estatus de diferenciación específico de cada paciente del que se desarrollan los organoides, también se logró identificar la relación que existe entre TP53 y el SOX9, es importante ya que en otros cánceres como el de mama la presencia de SOX9 en el citoplasma es de mal pronóstico, en el adenocarcinoma ductal pancreático con expresión de TP53 el gen SOX9 está en el citoplasma.^{29,33}

Una de las razones más importantes del desarrollo organoides derivados de tumores primarios tales como el adenocarcinoma ductal pancreático radica en poder establecer una terapia farmacológica personalizada, el desarrollo de estos modelos en 2015 permitió conocer las siguientes características:

- Insensibilidad al fármaco A366 (inhibidor de la histona metiltransferasa G9a)
- Pobre respuesta a la gemcitabina (Fármaco quimioterapéutico)
- No todos organoides tratados mostraron decremento de la proliferación al



ser tratados con gemcitabina y UNC1999 (Inhibidor de la EZH2)

-Sólo algunos de los organoides mostraron supresión en la proliferación celular al ser tratados con UNC1999 únicamente (lo que sugiere su dependencia de la EZH2)²⁹

4.5 ORGANOIDES: ESTUDIO FISIOPATOLÓGICO

4.5.1 HÍGADO

Entre los años 2013 y 2015 se desarrollaron modelos tridimensionales y organoides a partir de células troncales hepáticas de ratones, humanos, felinos y canes. Los organoides de hígado se han propuesto como modelo de estudio para varias enfermedades hepáticas genéticas tales como deficiencia de alfa1-antitripsina, Síndrome de Alagille y enfermedad canina de almacenamiento de cobre, sin embargo muchas enfermedades hepáticas no tienen una etiología monogenética, tienen una compleja fisiopatología. Una de las enfermedades metabólicas más comunes en humanos es la esteatosis hepática, conocida comunmente como hígado graso, de igual manera varios tipos de esteatosis ocurren en los felinos. Tanto en felinos como en humanos con esteatosis los hepatocitos se sobrecargan de lípidos por el aumento de ácidos grasos libres que llegan al hígado, lo que puede resultar en la degeneración e inflamación de los hepatocitos que al final derivará en fibrosis hepática y carcinoma hepatocelular.

El desarrollo de organoides felinos de hígado con esteatosis en 2017 permitió estudiar la fisiopatología de la enfermedad (fig. 10).³⁴

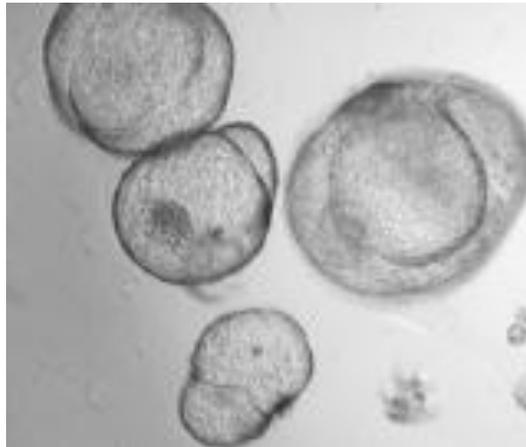


Fig. 10 Imagen de microscopio de contraste de fases mostrando la formación de organoides de hígado felinos.³⁴

Para estudiar el desarrollo de esteatosis se aumentó la cantidad de ácidos grasos libres en el medio para comparar la retención de los organoides felinos (enfermos) con los de las otras especies (sanos). Se encontró que los organoides derivados del hígado graso felino retenían una mayor cantidad de lípidos.³⁴

4.5.2 CEREBRO

El desarrollo cerebral in vivo muestra un grado muy importante de regionalización y heterogenicidad así como la interdependencia de ciertas regiones. Los análisis histológicos sugieren que los organoides cerebrales humanos pueden mostrar similarmente regiones heterogéneas por lo que se realizan pruebas de marcadores específicos de diferentes regiones precursoras del cerebro, revelando así la presencia de varias regiones tales como el hipocampo, sin embargo no se han logrado organizar para formar las estructuras que se aprecian in vivo.

Debido a que los desórdenes de desarrollo que afectan al cerebro humano han sido difíciles de recapitularse en modelos animales, se espera que los



organoides sirvan como modelo de estudio.

Su utilización como modelo de estudio de microcefalia es un paso importante, se desarrollaron modelos a partir de células tomadas de un paciente con el padecimiento, en particular alteradas por mutación en la proteína CDK5RAP2.

Los organoides derivados del paciente mostraron distintas características a los del grupo de control tales como la formación escasa de tejido neuro epitelial, diferenciación prematura resultando en sobreproducción neuronal y una orientación diferente en el huso radial de la glia, siendo horizontal el de los grupos de control y oblicuo el derivado del paciente, se requiere una distribución específica horizontal para la expansión normal de las células neurales lo que da como conclusión que la falta de CDK5RAP2 resulta un cerebro más pequeño.

Se espera que con el paso del tiempo este tipo de organoides sirvan como modelo de estudio para otro tipo de alteraciones del desarrollo en el cerebro y otros desórdenes.³⁵

4.5.3 INTESTINO Y PULMÓN

La cryptosporidosis es una parasitosis que normalmente no se desarrolla en humanos inmunocompetentes pero que representa un peligro para los pacientes inmunosuprimidos (Px con Sida, niños con malnutrición, pacientes mayores) por lo que el uso de organoides para estudiar el desarrollo de la cryptosporidosis es un modelo adecuado.

Por medio de microinyección se infectan dos tipos de organoides intestinales (diferenciados y en desarrollo) con *C. parvum* (especie más común responsable de parasitosis en humanos) y se cuantifica la presencia del parásito en diferentes tiempos. La propagación e infección del parásito fue más efectiva en los organoides diferenciados que en los que estaban en desarrollo apuntando a que el *C. parvum* principalmente se dirige hacia células diferenciadas.

Se utilizó un anticuerpo para identificar las etapas del ciclo de biológico del parásito por lo que se puede determinar que el estudio del desarrollo de esta parasitosis es viable mediante el uso de organoides ya que el ciclo fue completado. Para comprobar la nueva formación de ooquistes durante la etapa de desarrollo del parásito se aislaron las formas inmaduras y se inyectaron en organoides diferenciados los cuales después de 72h mostraron la nueva formación de ooquistes.

Mediante microscopía electrónica de transmisión se identificó que en los organoides diferenciados el parásito mostró infectar a los enterocitos maduros. (fig. 11) ³⁶

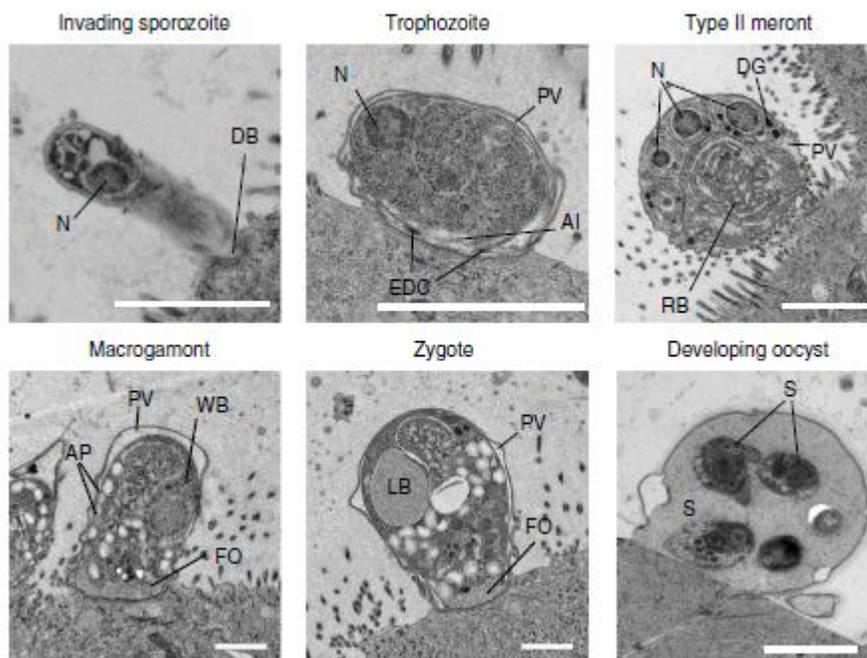


Fig. 11 Imagen de MET mostrando las etapas del ciclo biológico del *C. parvum* en organoides diferenciados de intestino de humano.³⁶

Reportes han mostrado que el *C. parvum* también causa infecciones respiratorias pero la fisiopatología de este parásito en el tracto respiratorio aun es desconocida casi en su totalidad por lo que el desarrollo de

organoides del epitelio de la vía aérea que emulan la vía aérea bronquial humana para modelar el desarrollo de la infección es de suma importancia. El organoide pulmonar se compone de células basales, células ciliadas, células caliciformes y células de la clara, para observar que el ciclo biológico se completó se inyectaron ooquistes de *C. parvum* en los organoides, la cuantificación mostro el incremento del parásito en 24h después de la inyección similar al crecimiento en un organoide intestinal. Se identificó que el parásito puede infectar tanto células secretoras como no secretoras en los organoides pulmonares, también se pudo observar la neoformación de ooquistes 6 días después de la infección por lo que se concluye que en los organoides pulmonares el ciclo biológico de *C. parvum* se logró completar.(fig. 12)³⁶

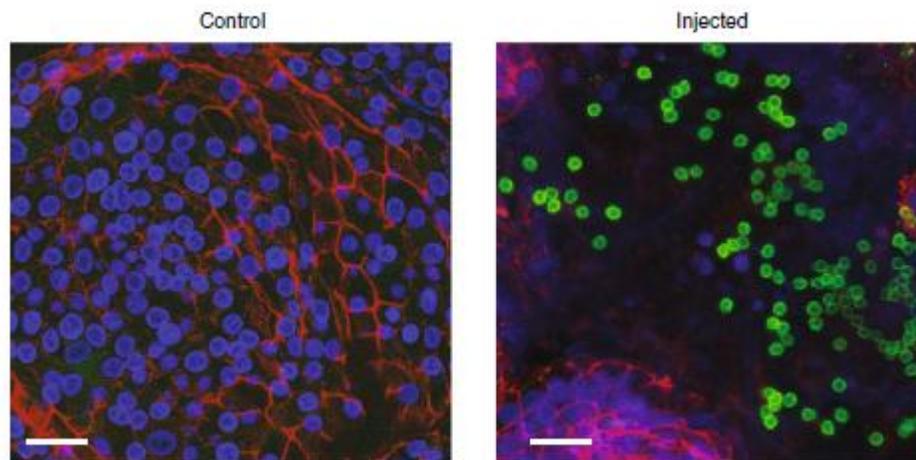


Fig. 12 Imagen de microscopía por inmunofluorescencia mostrando la nueva formación de ooquistes en organoides pulmonares³⁶.

4.5.4 ESTÓMAGO

Las enfermedades gástricas incluyendo la úlcera péptica y el cáncer gástrico afectan al 10% de la población mundial y se debe en gran parte a infección crónica por *Helicobacter pylori*.

Los organoides de estómago forman glándulas gástricas primitivas (fig. 13), zonas proliferativas con células que expresan LGR5, células superficiales, de la mucosa antral y diversidad de células gástricas endócrinas, que en conjunto ayudan a estudiar el desarrollo de la infección por *H. pylori*.³⁷

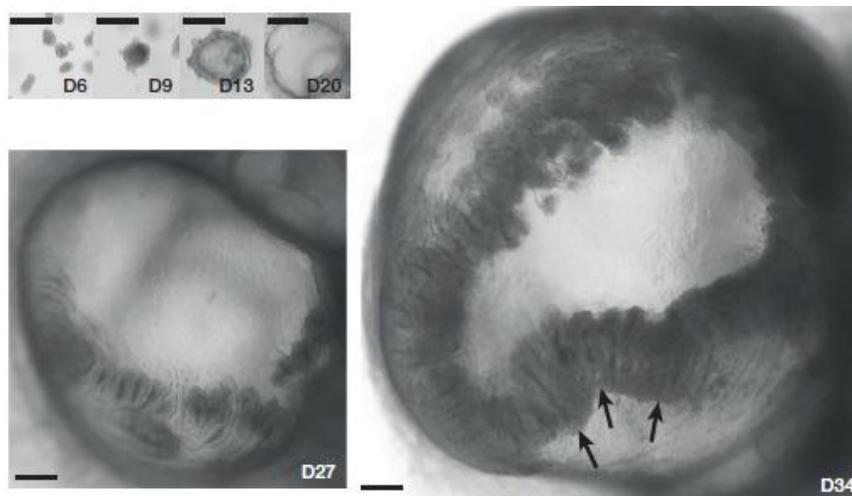


Fig. 13 Micrografía que muestra el desarrollo de los organoides de estómago hasta formar estructuras complejas similares a las glándulas gástricas.³⁷

Para estudiar el desarrollo de la infección se realiza la microinyección de *H. pylori* en la luz de los organoides (fig.14) , se comprueba que esta bacteria induce la activación del oncogén c-Met mediante el factor de virulencia CagA.³⁷

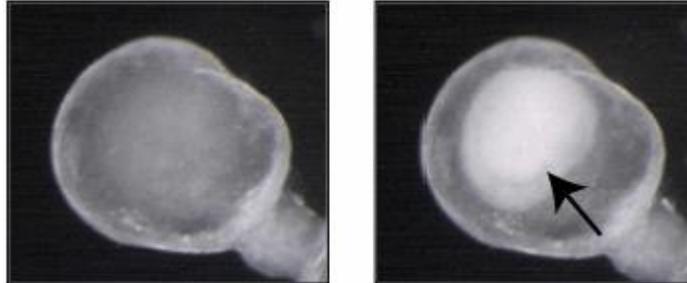


Fig. 14 Micrografía que muestra la microinyección de *H. pylori* en la luz del organoide gástrico.³⁷

El *H. pylori* se adhirió a la superficie apical del epitelio del organoide (fig. 15), 24 horas después de la inyección mostró un incremento doble de la tasa de proliferación en las células del epitelio dependiente de CagA.³⁷



Fig. 15 Micrografía que muestra la adherencia del *H. pylori* a la superficie de una célula epitelial de organoide.³⁷



4.6 ORGANOIDES: ESTUDIO GENÉTICO

4.6.1 INTESTINO

Otra aplicación viable para el desarrollo de nuevas terapias es el estudio de las mutaciones celulares en distintas condiciones, tales como la fibrosis quística (FQ), enfermedad que causa el acúmulo de mucosidad viscosa en los pulmones y el tracto gastrointestinal lo que vuelve susceptible al paciente de infecciones bacterianas, inflamación aberrante y malnutrición por lo que su esperanza de vida no sobrepasa los 40 años. La FQ es causada por la mutación del gen CFTR, utilizando organoides intestinales se descubrió que la forskolina induce una rápida hinchazón de las células dependiente de CFTR en los organoides con FQ. Se detectó la restauración de la proteína mutante CFTR utilizando bajas temperaturas o químicos específicos además de que la respuesta a los fármacos restaurativos de la CFTR era variable entre los distintos organoides lo que puede ayudar a facilitar el diagnóstico, realización de estudios funcionales, desarrollo de fármacos y medicina personalizada en FQ.³⁸

Esto puede ser utilizado para identificar y estudiar factores celulares asociados con fenotipos clínicos y permitir el análisis de nuevos fármacos desarrollados, así como fármacos que traten los síntomas, o el desarrollo de un tratamiento de por vida mediante la hiperactividad de la CFTR, además de estudios de homeostasis electrolítica en general.³⁸

4.6.2 ESÓFAGO

El esófago de Barret es el mayor factor de riesgo para desarrollar adenocarcinoma esofágico.

Se sabe que la transformación maligna del epitelio en el esófago de Barret es dependiente de la señalización de Wnt.

Para estudiar el desarrollo de la neoplasia en este tipo de esófago se desarrollaron organoides genéticamente modificados con el sistema



CRISPR-Cas9 que tuvieran activada la señalización del Wnt.

Es importante para conocer el desarrollo de la neoplasia para poder implementar nuevas terapéuticas ante esta enfermedad.³⁹

4.7 ORGANOIDES DE CAVIDAD ORAL

4.7.1 GLÁNDULA SALIVAL (MÉTODO ALTERNATIVO DE GENERACIÓN DE ESTRUCTURAS EN 3D)

Sin duda los cultivos en tercera dimensión tienen ventajas importantes sobre los de 2D, pero también tiene dificultades, la limitación de los materiales de andamiaje para la creación de estructuras tridimensionales es un inconveniente. Un estudio muestra la formación de organoides de una glándula salival a partir de estructuras tridimensionales formadas sin una estructura de andamiaje por medio de un método de bio-impresión.⁴⁰

Para facilitar la biofabricación de estos tejidos/organoides se utiliza una bioimpresión magnética en 3D para formar esferoides en menos de 24 hrs. (fig. 16), no solo se reduce el tiempo de formación de la estructura si no también se facilita el manejo, la transferencia y la facilidad de obtención de análisis e imágenes. Las células de la monocapa se magnetizan con un coctel de nanopartículas específicas tales como oro, óxido de hierro y poli-L-lysina, después son organizados en una estructura en 3D utilizando fuerzas magnéticas. Desde aquí a las células se les permite crear su propio microambiente tridimensional y matriz extracelular, las nanopartículas magnéticas utilizadas en el cultivo promueven la proliferación celular y el metabolismo sin incrementar el estrés oxidativo o inflamatorio y han mostrado ser biocompatibles y no tener respuesta inmunológica al ser trasplantados. Estas estructuras esferoidales formadas por nanopartículas magnéticas mostraron tener epitelio acinar y ductal, imitando la unidad secretora de una glándula.⁴⁰

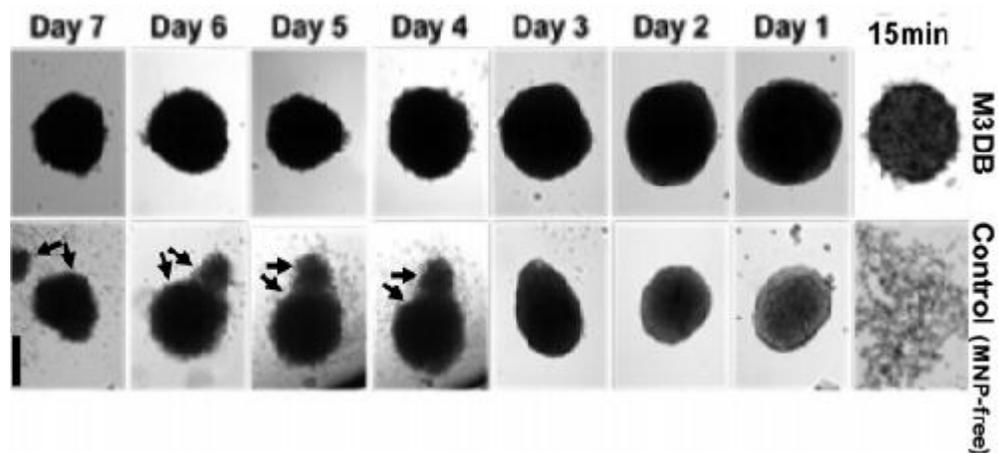


Fig. 16 Imagen de microscopio de contraste de de fases mostrando estructuras 3D con y sin nanopartículas magnéticas.⁴⁰

Después de trasplantar los organoides en el área excretora ductal de roedores estos mostraron rescatar el crecimiento epitelial en los modelos irradiados y en los sanos estimularon el crecimiento epitelial de las glándulas. El crecimiento neuronal es indispensable para mantener/ reparar las células del epitelio secretor y restablecer el flujo salival después de la radioterapia, este crecimiento no es posible utilizando materiales convencionales de andamiaje.⁴⁰

Los esferoides derivados de las células de la glándula salival son capaces de formar esferoides secundarios que a su vez dan origen a estructuras similares a las glándulas salivales en roedores. (fig. 17)¹⁵

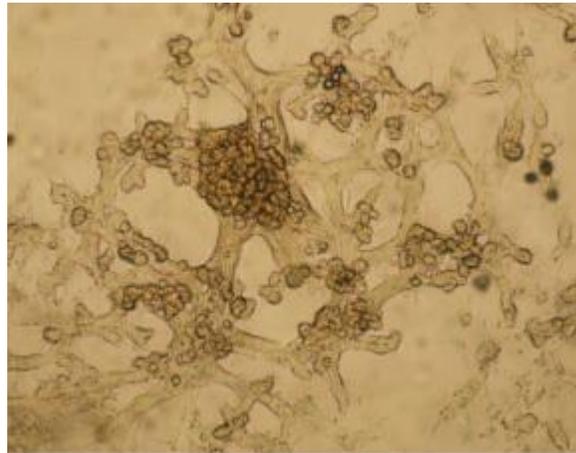


Fig. 17 Micrografía que muestra la formación de estructuras semejantes a conductos excretores (organoide).¹⁵

4.7.2 ORGANOIDES DENTALES

Los organoides dentales pueden ser generados a partir de células troncales del germen dental mediante el trasplante del cultivo a la cápsula subrenal de ratones inmunocomprometidos, 4 a 8 semanas después se puede observar el desarrollo de una estructura que muestra las características de una corona dental incluyendo dentina, esmalte y tejido pulpar, el equivalente a un diente natural (Fig. 18).⁴¹

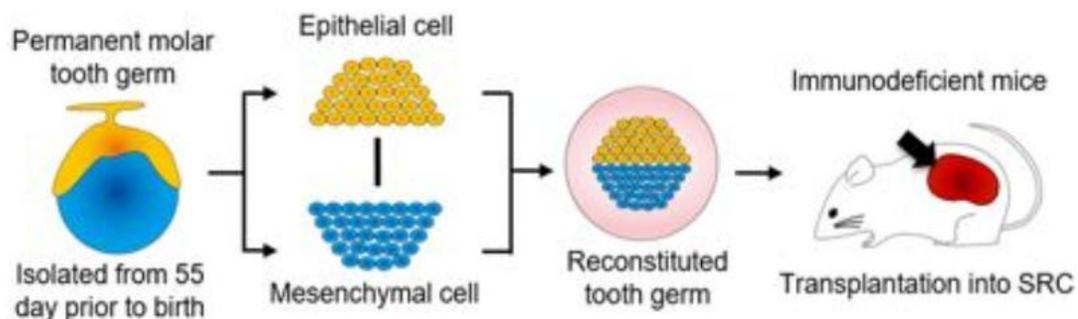


Fig. 18 Esquema que muestra el desarrollo de un germen dental y el trasplante a la cápsula subrenal de un ratón inmunocomprometido.⁴¹

Un estudio reporta el desarrollo de gérmenes dentales caninos a partir de células epiteliales y mesenquimales, que, al mantenerlas 2 días en un cultivo adecuado y al ser trasplantadas pueden generar un órgano dental capaz de erupcionar, para comparar el desarrollo, el grupo de control fueron gérmenes de premolares permanentes que se extrajeron y se reimplantaron de manera autóloga junto con los gérmenes biodesarrollados (fig. 19).⁴¹

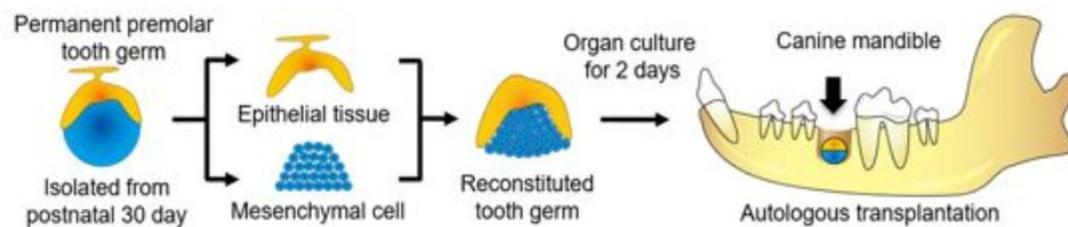


Fig. 19 Esquema que muestra el desarrollo e implantación de un germen dental canino a partir de células mesenquimales y epiteliales de un germen dental permanente.⁴¹

180 días después se mostró tanto la erupción de los gérmenes naturales como los biodesarrollados; mediante MEB se logró analizar que la ultraestructura de los tejidos duros de éste germen era correcta.(fig. 20)⁴¹

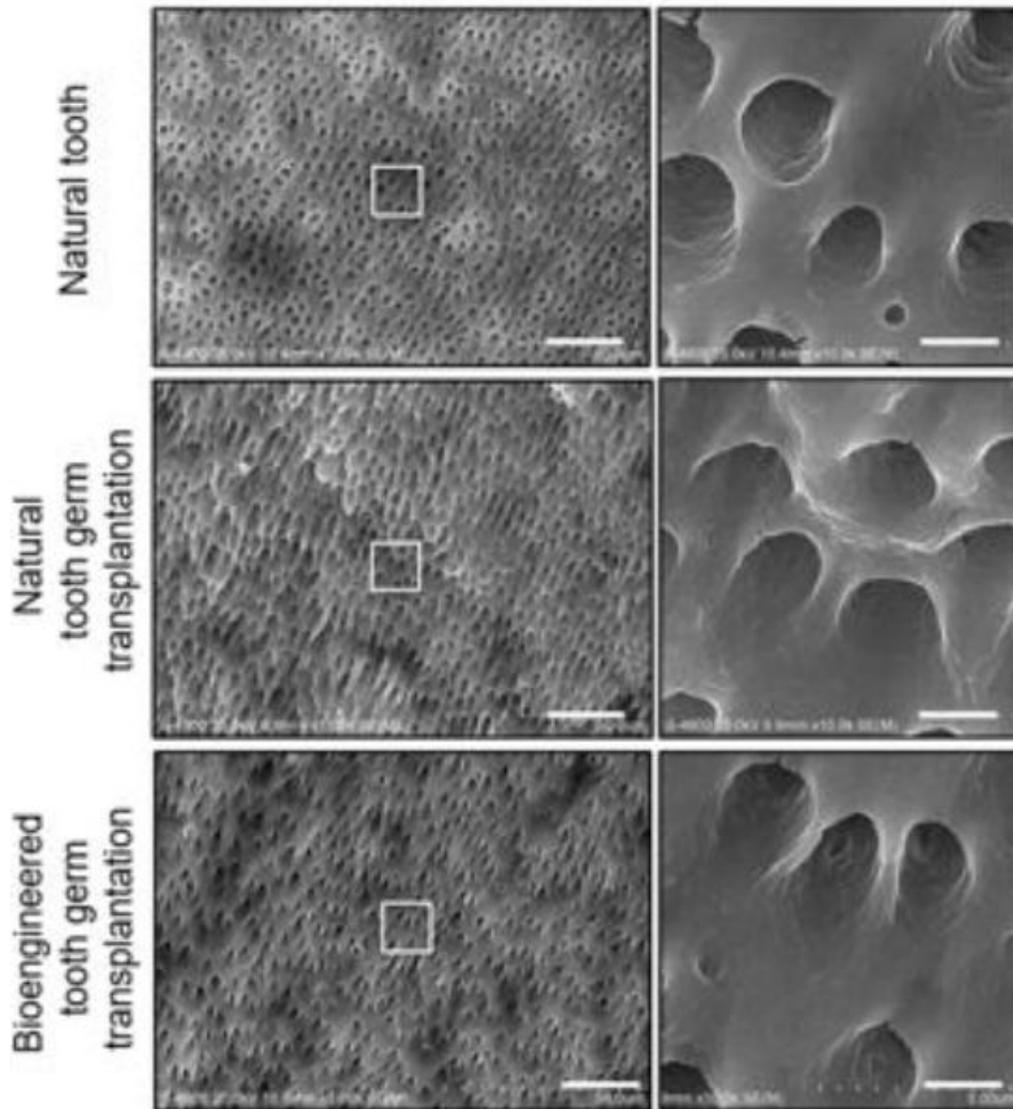


Fig. 20 Imagen de MEB que muestra la estructura dentinaria de un diente canino natural, de un diente autotrasplantado y de un diente biodesarrollado.⁴¹

Para evaluar la función del ligamento periodontal se utilizó un sistema para realizar movimientos ortodóncicos (fig. 21) tanto en los dientes naturales como en el biodesarrollado, ambos mostraron movimiento y una respuesta similar a la fuerza aplicada lo que mostró que el ligamento del gérmen cultivado medió adecuadamente el movimiento en respuesta al estrés mecánico, no mostró ninguna evidencia de anquilosis.

El desarrollo autólogo de los gérmenes que serán implantados es el indicado para evitar una reacción inmunológica del huésped.⁴¹

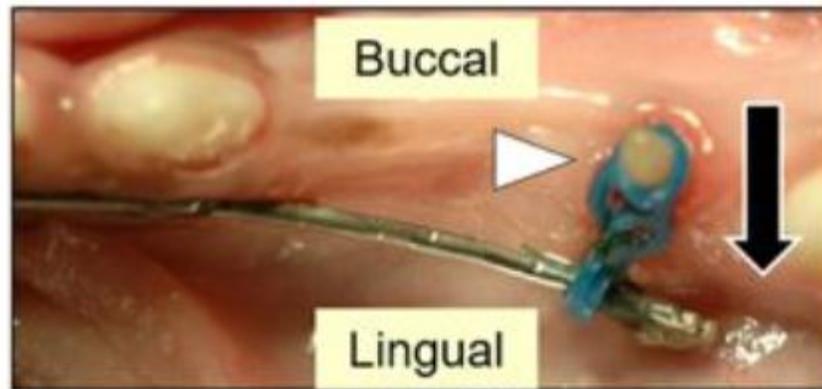


Fig. 21 Imagen que muestra un sistema utilizado para aplicar fuerzas ortodóncicas sobre el diente canino biodesarrollado, la flecha blanca muestra el diente y la negra la dirección de la fuerza.⁴¹

4.7.3 ORGANOIDES DE LENGUA

El cáncer de células escamosas de la lengua es una de las entidades de mayor malignidad en el mundo, de ahí la importancia de entender el mecanismo de mantenimiento del epitelio lingual ya que ha mostrado ser el origen del cáncer de lengua. Por otra parte las células troncales de la lengua no han sido identificadas a la fecha.⁴²

Un estudio en 2013 reporta la generación de organoides de lengua a partir de células progenitoras epiteliales de la lengua en ratones. Este organoide contiene las características de la papila filiforme de los ratones; posee un estrato córneo, epitelio estratificado queratinizado y formaciones concéntricas celulares. A pesar de éstas características los organoides permanecían en su forma inmadura (fig. 22).⁴³

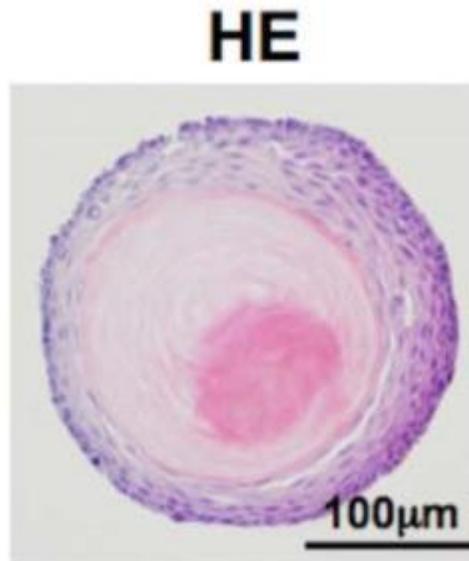


Fig. 22 Corte histológico teñido con Hematoxilina y Eosina que muestra la morfología concéntrica del organoide formado a partir de células troncales epiteliales de la lengua de un ratón.⁴³

Después de ser cultivados 3 días los organoides alcanzaron su etapa de maduración al ser trasplantados a la región subepitelial del dorso de la lengua de roedores, una semana después mostraron formar estructuras de epitelio estratificado y estratos córneos manteniendo así su potencial de proliferación lo que indicó el paso a su estado de maduración.(fig. 23)⁴³

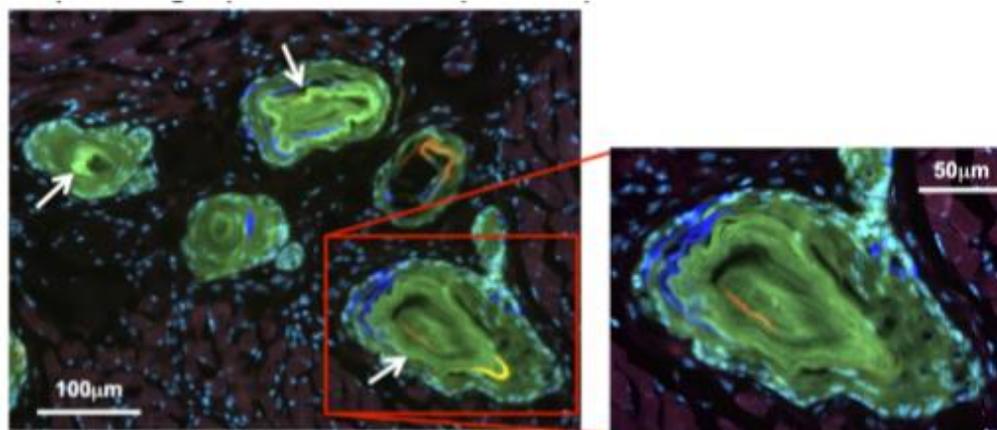


Fig. 23 Imagen de fluorescencia que muestra los organoides en la lengua receptora 1 semana después de ser trasplantados. Los organoides mostraron mayor tamaño y proliferación epitelial además del estrato córneo (flechas blancas).⁴³

El estudio reporta que no todos los organoides generados mostraron la formación de un estrato córneo por lo que se puede deducir que algunos se desarrollaron de células progenitoras que no pertenecen a la papila filiforme, concluyendo que aún falta investigación para la correcta identificación de las células troncales epiteliales de la lengua.

Es importante el continuo desarrollo e investigación con éstos modelos para poder avanzar en el campo de la medicina regenerativa.



CONCLUSIONES

Los organoides son sistemas complejos que tratan de emular el desarrollo de múltiples órganos in vitro, las características del cultivo son específicas dependiendo del órgano a desarrollar y del propósito que se le de.

En la actualidad estos modelos han servido para estudiar la fisiopatología de algunas enfermedades de las cuales su estudio en animales es muy complejo, tales como la cryptosporidiosis y la fibrosis quística.

El continuo desarrollo de éstos modelos ha permitido dar un paso hacia adelante en diferentes campos como el cáncer o la medicina regenerativa ya que por medio de esta clase de cultivos se han podido desarrollar modelos de células tumorales para entender un poco más la biología del cáncer, también se han podido desarrollar organoides que promuevan la regeneración como es el caso de las glándulas salivales en los pacientes que han recibido radioterapia y se ve reflejado en la disminución de su producción de saliva.

Claro está que este modelo no está aislado de los demás, en diferentes casos se ve relacionado con otros como la inmunohistoquímica cuando se buscan diferentes marcadores en las células cancerígenas o el CRISPR-Cas9 para modificar genéticamente las células y desarrollar organoides de desórdenes como el esófago de Barret.

Respecto a la cavidad oral se han logrado ya desarrollar organoides dentales que fisiológicamente son similares a los dientes naturales, sin embargo aún están lejos de ser 100% funcionales, lo mismo que los organoides de lengua, por otra parte los de la glándula parótida en pruebas de laboratorio en ratones han mostrado tener gran avance puesto que ya se han trasplantado y han mostrado tener capacidad regenerativa.



La mayoría de estos modelos en 3D han sido implementados en la medicina general, en el área odontológica hace falta la profundización de esta clase de investigaciones y desarrollo de modelos, sin embargo cabe señalar que el modelo más concluyente, funcional y con respuesta biológica idéntica a su homólogo natural reportado en este trabajo fue el organoide dental.

Hace falta su aplicación para modelar el estudio de los tumores odontogénicos así como sus transformaciones malignas, al igual que el desarrollo de organoides que busquen regenerar las zonas afectadas por esta clase de patologías ya que muy frecuentemente la resección quirúrgica es implementada en el tratamiento.

Hay dos razones principales que la mayoría de todos estos modelos desarrollados señalan:

- 1.- Dejar de utilizar animales para el desarrollo de estos modelos, lo que nos indica que la ética está de por medio.
- 2.- Brindar una nueva alternativa de tratamiento y medicina especializada a los pacientes.

Sin duda los pacientes que desarrollan cualquier tipo de cáncer o neoplasia (incluyendo tumores odontogénicos) se someten a procedimientos que afectan su calidad de vida y aún así no se garantiza su supervivencia, el continuo estudio y desarrollo de organoides ha contribuido aportando avances que en el futuro serán mejores alternativas para tratar a los pacientes, concluyendo así que los organoides se volverán una herramienta fundamental para el continuo desarrollo de la medicina, tanto general como en odontología.



10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diane Stern REM. Oral and Maxillofacial Pathology , A rational Diagnosis and treatment. 2.^a ed. Vol. 1. China: Quintessence Publishing Company; 2012.
2. Douglas Hanahan RAW. The Hallmarks of Cancer. Cell. 7 de enero de 2000;100:57-70.
3. A digital manual for the early diagnosis of oral neoplasia [Internet]. [citado 9 de octubre de 2018]. Disponible en: https://screening.iarc.fr/atlasoral_list.php?cat=B2&lang=1
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries: Global Cancer Statistics 2018. CA Cancer J Clin [Internet]. 12 de septiembre de 2018 [citado 9 de octubre de 2018]; Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
5. Multani S, Saranath D. Genotypic distribution of single nucleotide polymorphisms in oral cancer: global scene. Tumor Biol. 1 de noviembre de 2016;37(11):14501-12.
6. Avelar RL, Primo BT, Pinheiro-Nogueira CB, Studart-Soares EC, de Oliveira RB, Romulo de Medeiros J, et al. Worldwide Incidence of Odontogenic Tumors: J Craniofac Surg. noviembre de 2011;22(6):2118-23.
7. Medawar PB. La etiología del cáncer Vigencia de cinco paradigmas sucesivos. 2003;4.
8. Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem Cells: Promises Versus Limitations. Tissue Eng Part B Rev. marzo de 2008;14(1):53-60.
9. Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. diciembre de 2004;18(6):827-42.
10. Glossary | stemcells.nih.gov [Internet]. [citado 18 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://stemcells.nih.gov/glossary.htm#somaticsc>
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F., Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.



12. Aurrekoetxea M, Garcia-Gallastegui P, Irastorza I, Luzuriaga J, Uribe-Etxebarria V, Unda F, et al. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Front Physiol.* 2015;6:289.
13. Cui D, Li H, Wan M, Peng Y, Xu X, Zhou X, et al. The Origin and Identification of Mesenchymal Stem Cells in Teeth: from Odontogenic to Non-odontogenic. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 27 de diciembre de 2017 [citado 9 de octubre de 2018];13(1). Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/155562/article>
14. van Luijk P, Pringle S, Deasy JO, Moiseenko VV, Faber H, Hovan A, et al. Sparing the region of the salivary gland containing stem cells preserves saliva production after radiotherapy for head and neck cancer. *Sci Transl Med.* 16 de septiembre de 2015;7(305):305ra147.
15. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, et al. Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: An Overview of Human Dental Tissue-Derived MSCs. *STEM CELLS.* marzo de 2015;33(3):627-38.
16. Chamila Prageeth Pandula PK, Samaranayake LP, Jin LJ, Zhang C. Periodontal ligament stem cells: an update and perspectives. *J Investig Clin Dent.* mayo de 2014;5(2):81-90.
17. Mii S, Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM. Comparison of nestin-expressing multipotent stem cells in the tongue fungiform papilla and vibrissa hair follicle. *J Cell Biochem.* junio de 2014;115(6):1070-6.
18. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internet]. [citado 9 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
19. Tatipally S, Srikantam A, Kasetty S. Polymerase Chain Reaction (PCR) as a Potential Point of Care Laboratory Test for Leprosy Diagnosis—A Systematic Review. *Trop Med Infect Dis.* 1 de octubre de 2018;3(4):107.
20. Ramos-Vara JA. Principles and Methods of Immunohistochemistry. En: Gautier J-C, editor. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [citado 9 de octubre de 2018]. p. 83-96. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_5
21. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol.* 25 de abril de 2008;21(S2):S8-15.



22. Yang P-C, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci.* 2012;4(9):429.
23. Kim H-Y, Sah SK, Choi SS, Kim T-Y. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci.* octubre de 2018;210:201-8.
24. Pankowicz FP, Barzi M, Legras X, Hubert L, Mi T, Tomolonis JA, et al. Reprogramming metabolic pathways in vivo with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. *Nat Commun.* 30 de agosto de 2016;7:12642.
25. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol.* enero de 2015;230(1):16-26.
26. Broutier L, Mastrogiovanni G, Verstegen MM, Francies HE, Gavarró LM, Bradshaw CR, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med.* diciembre de 2017;23(12):1424-35.
27. Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med.* noviembre de 2015;21(11):1364-71.
28. Meseguer J, Esteban MÁ, Mulero V. Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. :6.
29. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science.* 18 de julio de 2014;345(6194):1247125.
30. Artegiani B, Clevers H. Use and application of 3D-organoid technology. *Hum Mol Genet.* 1 de agosto de 2018;27(R2):R99-107.
31. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 14 de mayo de 2009;459(7244):262-5.
32. Boj SF, Hwang C-I, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell.* 15 de enero de 2015;160(1-2):324-38.



33. Kruitwagen HS, Oosterhoff LA, Vernooij IGWH, Schral IM, van Wolferen ME, Bannink F, et al. Long-Term Adult Feline Liver Organoid Cultures for Disease Modeling of Hepatic Steatosis. *Stem Cell Rep.* 11 de 2017;8(4):822-30.
34. Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 19 de septiembre de 2013;501(7467):373-9.
35. Heo I, Dutta D, Schaefer DA, Iakobachvili N, Artegiani B, Sachs N, et al. Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids. *Nat Microbiol.* julio de 2018;3(7):814-23.
36. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature.* 18 de diciembre de 2014;516(7531):400-4.
37. Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med.* julio de 2013;19(7):939-45.
38. Liu X, Cheng Y, Abraham JM, Wang Z, Wang Z, Ke X, et al. Modeling Wnt signaling by CRISPR-Cas9 genome editing recapitulates neoplasia in human Barrett epithelial organoids. *Cancer Lett.* 1 de noviembre de 2018;436:109-18.
39. Adine C, Ng KK, Rungarunlert S, Souza GR, Ferreira JN. Engineering innervated secretory epithelial organoids by magnetic three-dimensional bioprinting for stimulating epithelial growth in salivary glands. *Biomaterials.* octubre de 2018;180:52-66.
40. Ono M, Oshima M, Ogawa M, Sonoyama W, Hara ES, Oida Y, et al. Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model. *Sci Rep.* 16 de marzo de 2017;7:44522.
41. Hisha H, Tanaka T, Ueno H. Lingual Epithelial Stem Cells and Organoid Culture of Them. *Int J Mol Sci.* 28 de enero de 2016;17(2):168.
42. Hisha H, Tanaka T, Kanno S, Tokuyama Y, Komai Y, Ohe S, et al. Establishment of a Novel Lingual Organoid Culture System: Generation of Organoids Having Mature Keratinized Epithelium from Adult Epithelial Stem Cells. *Sci Rep [Internet].* diciembre de 2013 [citado 11 de octubre de 2018];3(1). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/srep03224>

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema que muestra las 10 características celulares que derivan en crecimiento maligno (Hallmarks of cancer).

Fig 2. Esquema que muestra la capacidad de diferenciación de las células troncales pluripotenciales.

Fig 3. Esquema que muestra la ubicación de las células troncales identificadas en los tejidos dentales, todas por sus siglas en inglés: Células troncales de la pulpa dental (DPSCs), Células troncales de la papila apical (SCAPs), células troncales de dientes humanos primarios exfoliados (SHEDs), células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs), células troncales del folículo dental (DFSCs).

Fig. 4. Imagen de microscopio de contraste de fase mostrando la agrupación esferoidal de las células de la papila fungiforme.

Fig. 5 Micrografía que muestra la agrupación esferoidal de las células de una glándula salival.

Fig. 6 Fotografía que muestra el método de la gota colgante.

Fig. 7 Esquema del desplazamiento celular para la formación de una estructura esferoidal en el método de gota colgante. Tomado de Meseguer J, Esteban MÁ, Mulero V. Esferoides y esferas líquidas.

Fig. 8 Esquema que muestra el potencial terapéutico de los organoides.

Fig. 9 Esquema que muestra la aplicación actual de los organoides.

Fig. 10 Imagen de microscopio de contraste de fases mostrando la formación de organoides de hígado felinos.

Fig. 11 Imagen de MET mostrando las etapas del ciclo biológico del *C. parvum* en organoides diferenciados de intestino de humano.

Fig. 12 Imagen de microscopía por inmunofluorescencia mostrando la nueva formación de ooquistes en organoides pulmonares.

Fig. 13 Micrografía que muestra el desarrollo de los organoides de estómago

hasta formar estructuras complejas similares a las glándulas gástricas.

Fig. 14 Micrografía que muestra la microinyección de *H. pylori* en la luz del organoide gástrico.

Fig. 15 Micrografía que muestra la adherencia del *H. pylori* a la superficie de una célula epitelial de organoide.

Fig. 16 Imagen de microscopio de contraste de fases mostrando estructuras 3D con y sin nanopartículas magnéticas.

Fig. 17 Micrografía que muestra la formación de estructuras semejantes a conductos excretores (organoide).

Fig. 18 Esquema que muestra el desarrollo de un germen dental y el trasplante a la cápsula subrenal de un ratón inmunocomprometido.

Fig. 19 Esquema que muestra el desarrollo e implantación de un germen dental canino a partir de células mesenquimales y epiteliales de un germen dental permanente.

Fig. 20 Imagen de microscopía electrónica de barrido que muestra la estructura dentinaria de un diente canino natural, de un diente autotrasplantado y de un diente biodesarrollado.

Fig. 21 Imagen que muestra un sistema utilizado para aplicar fuerzas ortodóncicas sobre el diente canino biodesarrollado, la flecha blanca muestra el diente y la negra la dirección de la fuerza.

Fig. 22 Corte histológico teñido con Hematoxilina y Eosina que muestra la morfología concéntrica del organoide formado a partir de células troncales epiteliales de la lengua de un ratón.

Fig. 23 Imagen de fluorescencia que muestra los organoides en la lengua receptora 1 semana después de ser trasplantados. Los organoides mostraron mayor tamaño y proliferación epitelial además del estrato córneo.