

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias, presenta:

Julio César Flores Preciado

TÍTULO DE INVESTIGACIÓN

**CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE PULPA
DENTAL DE DIENTES PERMANENTES.**

Director de Tesis:

Dr. Raúl Rosales Ibáñez

CO- Director de Tesis:

Dra. Mónica Carrillo Beltrán

Mexicali Baja California, Abril de 2013

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Reconocimientos institucionales	7
CAPÍTULO 1. Introducción.	8
1.1. Resumen.	9
1.2. Antecedentes.	10
1.3. Planteamiento del problema.	13
1.4. Hipótesis.	14
1.5. Objetivos.	14
1.5.1. Objetivo general.	14
1.5.2. Objetivo específico.	14
Glosario Capítulo 1	15
CAPÍTULO 2. Fundamentos teóricos.	17
2. Marco teórico	17
2.1. Cavidad Oral	17
2.2. Órgano dentario	17
2.3. Elementos estructurales del diente	18
2.3.1. Esmalte	18
2.3.2. Dentina	19
2.3.3. Pulpa dental	19
2.3.4. Cemento	20
2.4. Elementos accesorios de soporte del diente	20
2.4.1. Periodonto	20
2.5. Células madre	21
2.5.1. Definición y generalidades	21

2.5.2. Células madre de cavidad oral	24
2.5.3. Células madre de pulpa dental (DPSCs)	26
2.5.4. Célula madre de dientes deciduos no exfoliados (SHEDs)	28
2.5.5. Células madre de ligamento periodontal (DPLSCs)	29
2.5.6. Células madre de papila apical (SCAPs)	30
2.5.7. Células madre de folículo dental (DFSCs)	31
2.5.8. Células madre de rugas palatinas	32
2.6. Tejido óseo	34
2.6.1. Composición	34
2.7. Células óseas	35
2.8. Matriz ósea	36
2.9. Estructura ósea	37
2.10 Hidroxiapatita	38
2.11. Ingeniería de tejidos	40
2.11.1. Ingeniería de hueso	42
2.11.2. Ingeniería de cartílago	42
2.11.3. Ingeniería de pulpa dental	43
2.12. Función de los injertos óseos	45
2.13. Células y cultivos celulares en ingeniería de tejidos	46
2.14. Biomateriales	48
2.14.1. Clasificación	51
2.14.2. Biocompatibilidad	51
2.14.3. Aplicaciones de los biomateriales	53
2.15. Bioestructuras	53
2.15.1. Andamios celulares y constructos	53
2.15.2. Andamios biodegradables	59
2.15.3. Caprolactona	66
2.15.4. Agentes osteoinductores	67

2.15.5. Proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs)	69
2.15.6. Efecto de las vitaminas D y K1 como agentes osteoinductores	70
2.16. Defectos óseos craneofaciales	70
2.17. Evaluación de la viabilidad celular en cultivos	73
2.18. Microscopía	76
2.18.1. Microscopía confocal	76
Glosario Capítulo 2	78
 CAPÍTULO 3. Materiales y métodos.	 80
3. Metodología.	80
3.1. Diseño del estudio.	80
3.2. Desarrollo experimental.	80
3.2.1. Obtención de la muestra.	81
3.2.2. Procesamiento de la muestra.	83
3.2.3. Cultivo y desarrollo celular.	86
3.2.3.1. Mantenimiento del cultivo celular	88
3.3. Identificación y diferenciación celular.	89
3.3.1. Inmunomarcaje e inmunofluorescencia	89
3.3.2. Técnica de inmunomarcaje según reacción antígeno-anticuerpo.	90
3.3.3. Técnica de inmunomarcaje según el número de anticuerpos empleados.	91
3.4. Consideraciones para el desarrollo de la técnica.	91
3.5. Técnica de inmunomarcaje.	93
Glosario Capítulo 3	95
 CAPÍTULO 4. Resultados y conclusiones.	 96
4.1. Ensayos de inmunomarcaje y proliferación celular	97
4.1.1. Ensayo de reconocimiento estromal.	97
4.1.2. Inmunomarcaje de células madre de pulpa dental	99

4.2. Conclusiones.	107
4.3. Estudios futuros.	109
Glosario Capítulo 4	110
Bibliografía.	111
Anexos	117
 Lista de figuras.	
Figura 1. Componentes blandos de cavidad oral.	17
Figura 2. Componentes óseos de cavidad oral.	17
Figura 3. Anatomía general del diente.	18
Figura 4. Dentición permanente.	18
Figura 5. Componentes estructurales básicos de soporte del diente.	21
Figura 6. Medios de obtención de células madre dentales.	33
Figura 7. Clasificación microscópica del hueso.	37
Figura 8. Triada tisular en medicina regenerativa	41
Figura 9. Microscopio confocal.	77
Figura 10. Desarrollo experimental del estudio.	80
Figura 11. Criterios de inclusión de la muestra.	81
Figura 12. Técnica de obtención de la muestra.	83
Figura 13. Conservación inicial de la muestra dental	84
Figura 14. Almacenamiento de la muestra dental.	84
Figura 15. Obtención y almacenamiento del tejido pulpar.	86
Figura 16. Materiales y equipo para cultivo celular.	87
Figura 17. Preparación del medio de cultivo.	87
Figura 18. Colocación de explantes pulpares y adición de medio de cultivo.	87
Figura 19. Incubación de la muestra.	88
Figura 20. Valoración de la confluencia del cultivo celular.	89

Figura 21. Mecanismo de reacción antígeno-anticuerpo	90
Figura 22. Resembrado del cultivo primario.	93
Figura 23. Rotulación de caja de pocillos para técnica inmunohistoquímica.	94
Figura 24. Valoración del reconocimiento estromal.	98
Figura 25. Reacción entre el fluoróforo y antígeno específico	98
Figura 26. Reconocimiento estromal positivo.	99
Figura 27. Material empleado para elaboración de laminilla de microscopía.	100
Figura 28. Plano tridimensional confocal de muestra de tejido pulpar.	102
Figura 29. Observación en planos de los filamentos de actina.	102
Figura 30. Observación en planos del citoesqueleto celular.	103
Figura 31. Observación en planos del núcleo celular.	103
Figura 32. Interacción entre fibras del citoesqueleto celular.	104
Figura 33. Valoración de confluencia y actividad celular.	104
Figura 34. Capacidad de adaptación y proliferación.	105
Figura 35. Zona de anclaje y adaptación entre fibras del citoesqueleto.	105
Figura 36. Plano tridimensional de la confluencia celular en la muestra.	106
Figura 37. Imagen tridimensional sobrepuesta de las diferentes estructuras celulares.	106

Lista de tablas.

Tabla 1. Clasificación y características de las células madre dentales.	32
Tabla 2. Diferencias aplicativas entre células madre.	33
Tabla 3. Clasificación de los biomateriales.	50
Tabla 4. Tipos y aplicaciones de los biopolímeros.	60
Tabla 5. Interacción entre biopolímeros y biomateriales.	65
Tabla 6. Clasificación de los agentes osteoinductores.	68

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

La realización del presente trabajo de investigación fue posible gracias a la participación, apoyo, guía, supervisión, pero sobre todo confianza que instituciones y personas que hoy en día forman parte de mi desarrollo personal y profesional, a todos ellos mi agradecimiento y respeto.

Un agradecimiento especial a mis tutores, Dr. Raúl Rosales Ibáñez de la UASLP, por mostrarme el impresionante mundo de la ciencia e investigación, gracias por su confianza, paciencia, conocimientos y disponibilidad, sin duda alguna es un ejemplo a seguir en mi ámbito profesional; a la Dra. Mónica Carrillo Beltrán de la UABC, por confiar en mis habilidades y por transmitirme desinteresadamente sus conocimientos pero sobre todo por mostrarme que en el campo de la salud (odontología) también es posible hacer investigación con otra áreas, como la química e ingeniería, un gran ejemplo de persona y profesionista dedicado y entregado a su trabajo.

Agradezco al Laboratorio de Ciencias Básicas e Ingeniería Tisular de la UASLP por brindarme la oportunidad de trabajar y sacar adelante la investigación, Dr. Raúl y Keila, gracias por confiar, guiarme y transmitirme sus conocimientos. Al Instituto de Ingeniería de la UABC, mi agradecimiento por darme las herramientas de estudio y la confianza en el trabajo diario.

A mi familia: padres y hermanos porque al estar al pendiente de mí e interesarse en mi trabajo, me dieron el empuje extra que en ocasiones necesitaba para seguir adelante y a mis amigos del Instituto y del Laboratorio de Biopelículas les agradezco su amistad y le reitero que cuentan siempre conmigo.

A todos muchas gracias, no tengo palabras para decirles cuanto les admiro y aprecio.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1.1. RESUMEN.

En la actualidad existe un gran interés en la aplicación terapéutica de las células madre para la regeneración de tejidos, siendo éste un tema de interés científico global.

Los reportes actuales sobre células madre indican que es posible aislar a partir de ellas varias células de diferentes tejidos adultos, incluyendo médula ósea, tejido neural, músculo, piel, retina, córnea, entre otros. Respecto al empleo de células de origen dental, se reporta que a partir de las mismas, tanto las que tienen su origen en la pulpa dental como las presentes en el ligamento periodontal y otras regiones mucosas de cavidad oral, es posible la formación de estructuras pertenecientes a los complejos pulpa-dentina y ligamento periodontal-cemento radicular. Asimismo se reporta la capacidad que tienen en la estimulación de la nueva formación de hueso, por lo que tienen posible aplicación en la regeneración ósea craneofacial.

Una de las principales ventajas que ofrece el aislamiento de células madre de origen dental sobre otros medios de obtención, son la accesibilidad y el fácil manejo de las muestras, así como también las técnicas poco invasivas e indoloras, comparada con las obtenidas de médula ósea.

Debido a su carácter multipotencial, las células madre de origen dental son una rica fuente de complejos celulares que mediante técnicas de activación e inducción específica tienen la capacidad de diferenciarse en otros complejos celulares, que en un determinado momento pueden emplearse en el tratamiento de afecciones bucodentales y orgánicas.

Todas las investigaciones recientes sobre células madre, resaltan el gran potencial que dichas tienen en la regeneración de tejidos *in vitro* e *in vivo*, abriéndose un gran panorama en su utilización de forma terapéutica en la regeneración tisular e ingeniería de tejidos.

1.2. ANTECEDENTES.

La terapia celular puede ser utilizada prácticamente en todos los campos de la medicina y la odontología regenerativa, los avances logrados en la investigación con tratamientos basados en la utilización de células y la ingeniería de tejidos, indican la existencia de una gran variedad de posibilidades existentes en el uso de células madre de los tejidos dentales, como fuente de regeneración y reparación de éstos mismos y otros tejidos corporales.

El término célula madre se utiliza para describir una gran variedad de células de diferentes orígenes. Ellas pueden ser divididas en dos categorías: embrionarias y adultas. En ambas categorías, nos referimos a células inmaduras, no especializadas, capaces de auto renovarse y, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, pueden convertirse en células especializadas de algunos tejidos, como pueden ser muscular, nervioso, conectivo especializado y sanguíneo.

Frente a las diversas dificultades en la obtención de células madre, el reconocimiento que en los tejidos dentales existen varias poblaciones celulares con propiedades de células troncales, otorga a estos órganos una gran ventaja en la terapia celular regenerativa, debido a su capacidad de crecimiento, expresión genética y línea de diferenciación.

En los últimos años el término “célula madre” toma gran importancia en la terapéutica médica. La medicina regenerativa es una disciplina médica basada principalmente en los conocimientos recientes sobre células madre y su potencial de diferenciación en células de diferentes tejidos. Una célula madre, hoy en día es considerada como una célula genérica la cual puede hacer copias exactas de sí misma de forma indefinida.

El concepto de trasplante celular se mantuvo en espera en el campo de investigación y culminó con el primer trasplante de médula ósea humana en 1970. Para este tiempo las

investigaciones sobre el uso de materiales y aparatos combinados con los conceptos biológicos celulares, crearon un nuevo campo de estudio, llamado *Ingeniería Tisular*.

A mediados de la década de 1980, los científicos comprendieron que las células eran los elementos fundamentales y básicos que mantenían el buen funcionamiento del organismo, y que dichas células se encargaban de generar otras células. La historia de las células madre se inicia, cuando se logró obtener un cultivo a partir de embriones de ratones. En 1988, científicos de la Universidad de Wisconsin consiguieron obtener por primera vez células madre embrionarias humanas. Desde entonces son utilizadas las terapias con células madre provenientes del cordón umbilical para el tratamiento de diversas enfermedades.

A finales de 1998, las células madre se hicieron célebres por todo el planeta, cuando los medios de comunicación anunciaron que científicos estadounidenses las habían cultivado con éxito, obteniendo hueso, músculo, piel y otros tejidos. Desde ese momento, la posibilidad de crear toda clase de recambios humanos se puso al alcance de la ciencia. Sin embargo, a pesar del enorme potencial terapéutico de este logro, aquella noticia también generó una polémica considerable, ya que las células se habían extraído de embriones humanos.

Para 1999 William Haseltine, quien después fue fundador y científico de las Ciencias del Genoma Humano, acuñó el término de *Medicina Regenerativa*, conjuntando todas las áreas y definiéndolas en un solo campo de estudio.

En el 2000, se da el descubrimiento de las células madre adultas de pulpa dental (DPSC) en los terceros molares, dando paso al descubrimiento de una nueva población de células madre en cavidad oral. Para el 2003, aparecen las células madre de dientes exfoliados deciduos (SHED) y posteriormente las células madre de la papila apical (SCAP), las células madre del ligamento periodontal (PDLSC), las células madre del folículo dental (DFSC), hasta la actualidad con el descubrimiento de las células madre de rugas palatina.

Investigaciones recientes se han enfocado en la regeneración del tejido dental con nuevos métodos para lograr un reemplazo dental biológico; tales como, la estimulación de la formación de una tercera dentición, la fabricación de *constructos tisulares* utilizando medios biológicos, como *andamios celulares* para producir primordios dentales embrionarios de las poblaciones celulares cultivadas.

Para el 2005 y 2007 se iniciaron experimentos para la formación de órganos dentarios por medio de la utilización de células mesenquimales de origen no dental a partir de gérmenes dentales de ratones, dando como resultado la formación de coronas dentarias completas. En el 2008 se determinó la biología genética y molecular de la formación dentaria con el reconocimiento de las moléculas de señalización expresadas durante este proceso.

Recientemente, en el 2009 el grupo de investigación de Tsuji, desarrolló una técnica para la elaboración de un órgano dentario completo y funcional, a partir de células epiteliales de ratones normales y de células mesenquimales de ratones transgénicos en etapas embrionarias. Sin embargo, el órgano dentario formado resultó de menor tamaño, esto debido a que aún no es posible regular sus patrones de crecimiento.

Sin duda alguna desde sus orígenes hasta la actualidad la terapia celular, así como ha aumentado en su empleo, también lo ha hecho en el perfeccionamiento de las diversas técnicas de obtención y sobre todo de aplicación. Hoy en día la aplicación de esta terapia se sustenta, en la administración de células indiferenciadas con potencial de diferenciación o bien en el reemplazo de las células dañadas por células sanas, para la reparación de los tejidos afectados, mediante mecanismos similares a los que de forma natural emplea el organismo para la renovación de las poblaciones celulares.

Debido a los grandes avances en el empleo de células madre, es muy probable que en un futuro no muy cercano, cuando una persona necesite un trasplante de un órgano, los ingenieros

de tejidos puedan fabricarle un órgano bioartificial con sus propias células para su posterior implantación.

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los tejidos del cuerpo a lo largo de la vida sufren un desgaste, del que se protegen, y desarrollan una capacidad de auto renovarse. Hoy en día el tratamiento con células madre es considerado uno de los mayores avances en lo que a terapia regenerativa se refiere. Su aplicación ha venido a proporcionar un método muy prometedor en la terapia celular regenerativa en diferentes enfermedades o padecimientos que con la terapéutica convencional no tenían una recuperación total o los resultados de la misma eran muy limitados.

Actualmente la reparación de los defectos óseos en sus diversas afecciones constituye un gran reto. Las necesidades de regeneración ósea incluyen no solamente los *defectos postraumáticos* sino también los causados por otras patologías como tumores, enfermedades inflamatorias y defectos óseos relacionados con técnicas quirúrgicas.

La población de células madre en pulpas dentales resultan muy evidentes, la característica más representativa, es su capacidad elevada de regeneración tanto del *complejo dentino-pulpar*, como el elevado marcador osteogénico que poseen, lo cual permite tratar, mejorar y reparar defectos óseos, utilizables en procesos reconstructivos postraumáticos, tumorales o congénitos. Esta situación está mediada por la sinergia entre áreas de estudio, en este caso la medicina y la bioingeniería tisular.

La *bioingeniería tisular o ingeniería de tejidos* es un campo multidisciplinario creado por la unión de la ingeniería con la biología molecular, que tiene como fin principal la regeneración

de tejidos y órganos, además que desarrolla sustitutos biológicos capaces de restaurar, mantener o mejorar la función tisular.

Los grandes avances que se han producido en la ingeniería tisular han dado lugar a la aparición de nuevas técnicas para tratar tales afecciones, por medio de la utilización de agentes biológicamente activos u osteoinductores y más recientemente con el implante de células aisladas o en soportes combinados para el tratamiento de estos defectos óseos. Es aquí donde entra el sumamente importante papel de la aplicación de células madre de origen pulpar debido a su gran capacidad de diferenciación de forma natural, aunque también se ha demostrado que en determinadas ocasiones, tienen la capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes.

1.4. HIPÓTESIS.

Por medio del uso de dientes permanentes es posible cultivar, aislar e identificar células madre de pulpa dental, con capacidad de multiplicación y diferenciación celular.

1.5. OBJETIVOS.

1.5.1. OBEJETIVO GENERAL.

Aislamiento y cultivo de células madre de pulpa dental de dientes permanentes.

1.5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.

- Identificar las células aisladas y cultivadas mediante la técnica de inmunomarcaje.
- Evaluar la viabilidad celular

- Evaluar la multipotencialidad de las células madre de pulpa dental.
- Evaluar la proliferación, crecimiento y división celular de las células madre de pulpa dental aisladas.

Glosario **CAPÍTULO 1**

Andamio Celular: Estructuras tridimensionales utilizadas en la ingeniería de tejidos para el crecimiento celular de manera organizada.

Complejo Dentino-pulpar: Sistema organizado de tejidos que trabajan como una sola estructura y donde cada uno se mantiene en función del otro, este complejo está formado por dos componentes principales que son: la dentina y la pulpa.

Constructo Tisular: Estructura formada por los tres componentes necesarios para configurar un tejido artificial (células, andamios e inductores) y la disposición arquitectural que adoptan en relación con su ubicación en el organismo.

Defecto Postraumático: Alteración parcial o permanente como resultado de una alteración estructural o funcional de una determinada zona corporal derivada de un padecimiento patológico o acto quirúrgico.

DFSC: (Dental Follicle Stem Cells) Células madre de folículo dental.

DPSC: (Dental Pulp Stem Cells) Células madre de pulpa dental.

Ingeniería Tisular: Área científica interdisciplinaria cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular, creación de sustitutos biológicos y su implantación en el organismo para su posterior implantación.

Medicina Regenerativa: Disciplina médica impulsada fundamentalmente por los nuevos conocimientos sobre las células madre y en su capacidad de convertirse en células de diferentes tejidos.

PDLSC: (Periodontal Ligament Stem Cells) Células madre de ligamento periodontal.

SCAP: (Stem Cells from Apical Papilla) Células madre de papilla apical.

SHED: (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) Células madre de dientes deciduos exfoliados.

CAPÍTULO 2
FUNDAMENTOS
TEÓRICOS

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 CAVIDAD ORAL.

La cavidad oral o boca, es un espacio anatómico corporal conformado por regiones o componentes blandos (Figura 1), como el paladar, piso de boca, labios, carrillos o mejillas, lengua y mucosas de revestimiento (encías); regiones o estructuras rígidas (Figura 2), como los componentes óseos representados por el maxilar y la mandíbula, la ATM o *Articulación Temporomandibular*, así como también el órgano dentario y sus componentes accesorios (glándulas salivales), conformando en su totalidad al *aparato estomatognático*.

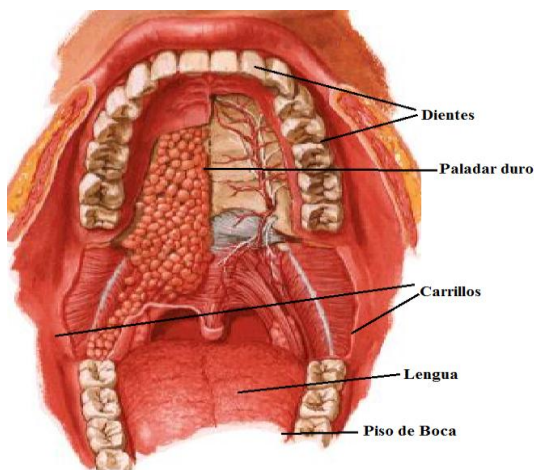


Figura 1. Componentes blandos y accesorios de cavidad oral.

© Sistema Digestivo. Google Sites.

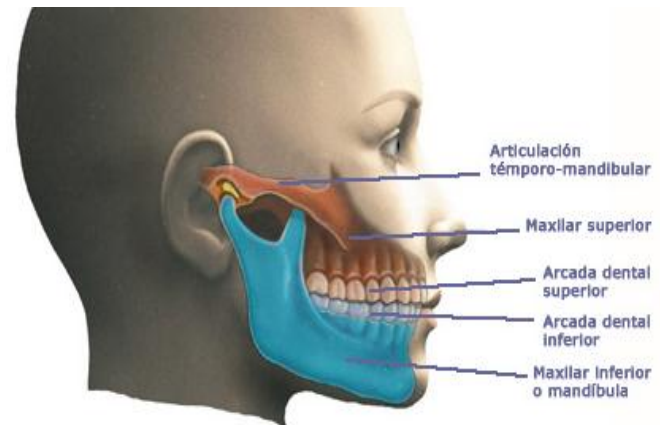


Figura 2. Componentes óseos de la cavidad oral

© <https://site.google/a/uabc.edu.mx>

2.2 ÓRGANO DENTARIO.

Los dientes son estructuras rígidas altamente mineralizadas e incluidas en una porción ósea (maxilar o mandíbula) por medio de los alveolos dentarios y estableciendo una articulación fija o *gónfosis* con el tejido óseo y sistema ligamentoso adyacente. Los componentes minerales principales que conforman al diente y le brindan su dureza y rigidez son el fósforo y calcio, representado por los *cristales de hidroxipatita*.

Básicamente se consideran tres regiones anatómicas en el diente: la corona o región externa, el cuello o zona media y la raíz o zona incluida dentro del hueso alveolar (Figura 3).

En cuanto a su distribución en número y regiones se clasifican en: incisivos centrales, incisivos laterales, caninos, primeros y segundo premolares, primeros molares, segundos molares y terceros molares, tanto superiores como inferiores (Figura 4).

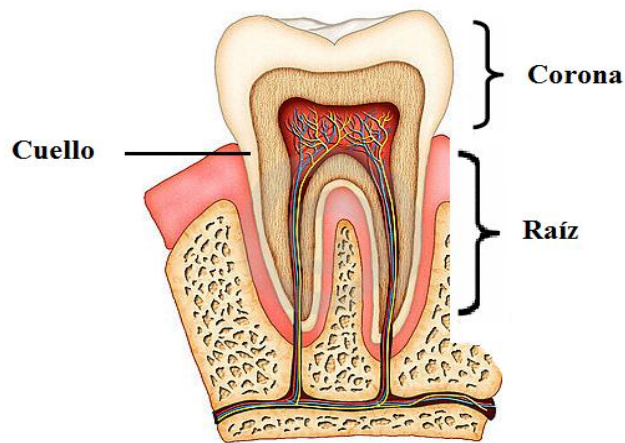


Figura 3. Anatomía general del diente.

© A.D.A.M. Health Education Solutions

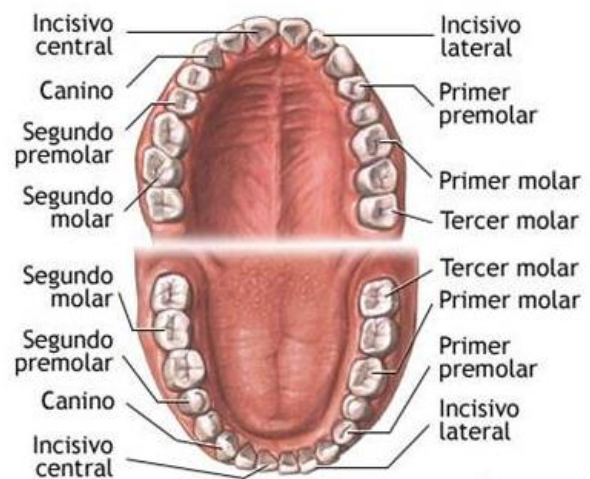


Figura 4. Dentición permanente.

© A.D.A.M. Health Education Solutions

El órgano dentario o diente, está conformado por dos grupos funcionales y organizacionales, representados por los elementos estructurales propios y los elementos accesorios o de soporte.

2.3. Elementos estructurales básicos del diente.

2.3.1. ESMALTE.

Tejido superficial y de recubrimiento del diente, con alto grado de dureza y rigidez, de naturaleza acelular, compuesto por un 96 % de materia inorgánica y representada por los

cristales de hidroxiapatita, y un 4% de materia orgánica y agua. Su alto contenido en materia inorgánica, lo hace propenso a la desmineralización, por lo cual puede verse afectado por caries dental. Se encuentra localizado a nivel de la corona o porción externa del diente, variando su espesor máximo de entre 2 a 2.5 mm en dientes anteriores y de hasta 3 mm en dientes posteriores. Embrionariamente, es originado por complejos celulares llamados [ameloblastos] que son los encargados de su formación y síntesis aunque al alcanzar su grado de madurez no tiene la capacidad de regenerarse. Tiene una única y principal función, la de protección por medio del recubrimiento de la pieza dentaria.

2.3.2. DENTINA.

Es un tejido intermedio de origen celular, sintetizado por medio del *odontoblasto*, localizado en la pulpa dental. En su configuración estructural posee un gran número de túbulos interpuestos o túbulos dentinarios originados desde la pulpa dental, los cuales albergan en su interior líquido intracelular o dentinario en el cual se albergan ramificaciones nerviosas de la pulpa dental, con lo cual posee un cierto grado de sensibilidad a estímulos como el frío, calor y tacto. Está compuesta por un 70% de matriz inorgánica, representada por cristales de hidroxiapatita y un 30 % de matriz orgánica, representada por complejos protéicos y fibras de colágenas y elásticas.

2.3.3. PULPA DENTAL

Es un tejido conjuntivo laxo formado por complejos celulares, sustancia fundamental y fibras de colágena y reticulina. Los complejos celulares están representados por los fibroblastos, que tienen como función la síntesis de colágena y mucopolisacáridos de la sustancia fundamental; así mismo también por odontoblastos que tienen como función principal la *dentinogénesis* y matriz dentinaria.

Dentro de la estructura funcional de la pulpa, se localiza un complejo vital, encargado del mantenimiento de la integridad e inervación del diente, el denominado, paquete vasculonervioso, conformado por una fibra nerviosa, un capilar arterial, venoso y linfático, encargados del aporte sanguíneo y de nutrientes al diente, el retorno de productos metabólicos y primordialmente la inervación o aporte sensitivo al diente.

2.3.4. CEMENTO.

Es un tejido conectivo celular, de recubrimiento exclusivo de la raíz dental, comparable con el hueso desde el punto de vista estructural, debido a su dureza y composición química. Está conformado por un 55% de hidroxiapatita cálcica y un 45% de agua y es sintetizado por un complejo celular denominado, *cementoblastos*. El cemento carece de vascularización e inervación propia y no tiene la capacidad de remodelado, por lo que es susceptible a procesos inflamatorios e infecciosos adyacentes.

2.4. Elementos accesorios o de soporte del diente.

2.4.1. PERIODONTO.

Está conformado por todos aquellos tejidos extra dentarios, que rodean al diente y está constituido por la encía, el ligamento periodontal y hueso alveolar, distribuidos a la periferia del diente y que funcionan como un sistema de adaptación y ajuste del diente con la porción ósea o *alveolo* dentario donde está incluida la raíz (Figura 5).

La encía es un tipo de mucosa bucal, clasificada como mucosa masticatoria que rodea al cuello del diente y los rebordes alveolares u óseos. Está conformada por tejido epitelial y conectivo, pudiendo estar presente en forma libre (a nivel del cuello del diente) e insertada (adherida al proceso óseo).

El hueso alveolar o dentario, es la parte del hueso maxilar o mandibular que aloja las raíces de los dientes superiores e inferiores respectivamente. La zona ósea en la cual se encuentran incluidas y articulan con el hueso las raíces dentales, se denomina alveolo, por medio del cual se establece la articulación a partir de las fibras periodontales radiculares.

El ligamento periodontal es un tejido fibroso, con un alto componente colágeno que sirve de anclaje al diente con el alveolo, de alta densidad celular, representada principalmente por fibroblastos que conforman fibras paralelas diferenciadas, elásticas y resistentes.

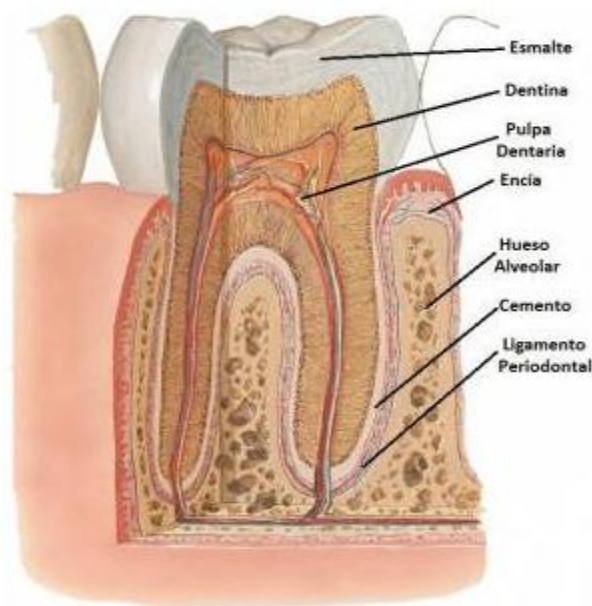


Figura 5. Componentes estructurales básicos y de soporte del diente.

© A.D.A.M. Health Education Solutions

2.5. CÉLULAS MADRE.

2.5.1. Definición y generalidades.

Una célula madre, es una célula formadora, no especializada, con la capacidad de auto renovarse (es decir, producir más células madre), mediante división celular; pudiendo llevar a cabo una diferenciación celular específica continuando una vía o guía de diferenciación

autónoma o inducida, y, por lo tanto, ser capaz de formar células de uno o más tejidos; maduras, funcionales, específicas y diferenciadas.

Es posible clasificar a este grupo celular, en dos rangos principales:

- **Según el origen o medio de obtención:**

Células madre embrionarias (ESC: Embryonic Stem Cells)

Derivan de la masa celular interna del embrión en el estadio de *blastocisto* (7-14 días de desarrollo embrionario). Tienen la capacidad de generar cualquier tipo de célula de tejidos del cuerpo humano.

Células madre adultas u órgano específicas.

Derivan de las divisiones celulares de las mismas células madre embrionarias, encontrándose en órganos o tejidos adultos y son capaces de generar células específicas para un tejido u órgano. En este grupo celular, podemos encontrar:

- Células madre de cordón umbilical,
- Células madre hematopoyéticas o sanguíneas (médula ósea), y
- Células madre mesenquimatosas indiferenciadas, las cuales están representadas por:
 - a. Células madre presentes en pulpa dental, en dientes temporales y permanentes, y
 - b. Células madre presentes en el periodonto.
 - c. Células madre presentes en papila dental.
 - d. Células madre presentes en rugas palatinas.

- **Según su capacidad de diferenciación:**

Células madre totipotenciales.

Son aquellas células con la capacidad de crecer y formar un organismo completo, tanto en componentes embrionarios, como extraembrionarios.

Células madre pluripotenciales.

A este grupo pertenecen todas aquellas células capaces de producir grupos celulares correspondientes a las capas celulares del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo). Se han descrito tres tipos de células pluripotenciales:

- a. *Células madre embrionarias* las cuales se pueden aislar de la masa celular interna del blastocisto (etapa embrionaria del feto).
- b. *Células embrionarias germinales* que pueden ser aisladas del precursor de los órganos sexuales en fetos abortados.

Estos tipos de células se pueden aislar solamente de tejido embrionario o del feto mismo. Pueden crecer en medio de cultivo y controlarse su diferenciación en células específicas (neuronas, piel, músculos, entre otros), mediante procedimientos específicos.

Grupos celulares multipotenciales.

Son aquellas capaces únicamente de diferenciarse en un número limitado de tipos celulares. Como ejemplo se tiene la médula ósea, la cual tiene la capacidad de diferenciarse en células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas).

Grupos celulares unipotenciales.

A este grupo pertenecen las células con la capacidad formadora únicamente de un solo tipo celular en particular.

2.5.2. CELULAS MADRE DE LA CAVIDAD ORAL. ¹

Las células madre dentales (DSC: Dental Stem Cells) constituyen una exclusiva población de células de autorrenovación con una utilidad potencial en generar un reemplazo biológico de dientes humanos. Debido a que el desarrollo del diente depende de interacciones de células mesenquimales y epiteliales; DSCs necesariamente consisten de dos tipos:

- a. **Células epiteliales;** las cuales contribuyen a la formación de las estructuras dentales epiteliales e incluyen capas celulares externas e internas de epitelio dental, *retículo estrellado*, estrato intermedio, ameloblastos y esmalte.
- b. **Células mesenquimales;** las cuales contribuyen a la formación de estructuras mesenquimales como son; papila dental, saco dental, odontoblastos, predentina, dentina, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar.

Las DSCs son definidas como poblaciones celulares de lenta división que dan origen a DSCs adicionales y a poblaciones celulares hijas que a su vez dan origen células “transitorias” que no son capaces de mantenerse por si solas, pero si de diferenciarse en estructuras maduras del diente. Otras características importantes incluyen la localización profunda en tejidos lejos del flujo celular normal, ciclos celulares lentos, tamaño pequeño y escasez de organelos y la habilidad de funcionar en tejidos mediante la regeneración después de heridas o lesiones; así como su habilidad para mantenerse en el cuerpo durante su periodo de vida. Las células madre

adultas están localizadas en un ambiente exclusivo denominado “nicho de células madre”, el cual le permite funcionar.

Caracterización de poblaciones de DSCs epiteliales.

Análisis desarrollados en ratones, han permitido establecer que el nicho de estas células se localiza en el ápice del diente, en el retículo estrellado, y que esta progenie celular da origen a ameloblastos. Estas células madre se integran, diferencian y migran desde una posición apical a incisal mientras producen matrices proteínicas que forman esmalte.

Caracterización de poblaciones de DSCs mesenquimales.

Los tejidos dentales mesenquimales si exhiben propiedades de autorrenovación. Los odontoblastos y cementoblastos, están presentes en dientes postnatales y adultos (mientras que los ameloblastos no), y en la formación de dentina por los odontoblastos y del cemento por los cementoblastos la cual ocurre en respuesta a alguna lesión o enfermedad dental. Hasta la fecha se reconocen 5 tipos diferentes de células madre dentales humanas (sus características y diferencias se indican en las Tablas 1 y 2, mientras que los medios de obtención se muestran en la Figura 7).

- **DPSCs:** células madre de la pulpa dental.
- **SHED's:** células madre de dientes deciduos exfoliados.
- **PDLSC's:** células madre del ligamento periodontal.
- **SCAP's:** células madre de la papila dental.
- **DFSC's:** células madre del folículo dental.
- Células madre de las rugas palatinas.

2.5.3. Células madre en pulpa dental DPSCs.

Desde el descubrimiento de las células madre adultas de la pulpa dental (DPSCs) en terceros molares en el 2000, distintos tipos de DPSCs se han aislado de forma exitosa a partir de pulpa dental madura e inmadura. Investigaciones sobre sus características, así como su potencial de diferenciación se han convertido en uno de los temas más estudiados en la odontología. Se ha considerado que estas células madres son células mesenquimales indiferenciadas presentes en los tejidos pulpaes dentales y caracterizadas por su autorrenovación ilimitada, capacidad formadora de colonias y diferenciación multipotencial.² Generalmente, las DPSCs guardan las características comunes de las células madre adultas:

- a. Usualmente se encuentran en *estados quiescentes* en la pulpa dental, y pueden causar divisiones celulares continuas durante la regeneración tisular.
- b. Tienen dos tipos de patrones de crecimiento, la división celular simétrica o asimétrica. Pueden dividirse en dos células madre hijas idénticas, o bien dar origen a una célula madre hija inalterada y una célula progenitora con una capacidad de autorrenovación limitada por la división celular asimétrica.
- c. El crecimiento clonal es otra característica importante. Una sola célula madre puede generar un grupo de células descendientes genéticamente idénticas *in vitro*.
- d. Durante el periodo de cultivo a largo plazo, las DPSCs *in vitro* pueden perder su naturaleza de célula madre, incluyendo capacidad de autorrenovación y de multidiferenciación.

Adicionalmente, debido a su gran habilidad de multidiferenciación, algunos factores de crecimiento dentro del medio de cultivo o el suero pueden inducir una diferenciación espontánea *in vitro*.² Huang et al. mostraron que las DPSCs pueden promover la proliferación y

diferenciación de células neurales en el hipocampo de ratones, indicando que estas células madre dentales pueden tener un potencial terapéutico único en la regeneración del sistema nervioso central. La transplatación de tejido inmaduro creado con las DPSCs pueden reconstruir epitelio de la córnea en un modelo animal. Cuando las DPSCs y las SHED's se recombinan con plasma rico en plaquetas, éstas tienen la habilidad de formar hueso que es útil en la osteointegración de implantes cubierto por hidroxiapatita, dando buenos niveles de contacto hueso-implante². Además de su potencial para tratar enfermedades sistémicas, las DPSCs han sido exitosamente exploradas en el área de la regeneración dental y se ha pensado que pueden ser los principales candidatos para la ingeniería tisular dental, esto debido a varias causas:

- a. Fácil acceso quirúrgico al sitio de colección y muy baja morbilidad después de la extracción de la pulpa dental,
- b. Las DPSCs autólogas pueden ser eficientemente aisladas y amplificadas de un molar impactado, o bien de un diente deciduo exfoliado,
- c. Las DPSCs pueden generar tejidos más parecidos a la típica dentina dentro de un periodo más corto, que las células madre no dentales; situación que las hace más competentes en la formación de un biodiente,
- d. La cantidad de dentina nueva formada *in vivo* por las DPSCs excede por mucho a la matriz de dentina total formada por los odontoblastos en toda su vida,
- e. Las DPSCs pueden ser criopreservadas y recombinadas con varios andamios, y
- f. Las DPSCs parecen tener privilegios inmunes y capacidades antiinflamatorias favorables para los experimentos de alotrasplatación.

Localización y origen de las DPSCs²

A pesar de que estas células han sido aisladas de tejidos pulpaes de distintos tipos de dientes incluyendo, incisivos deciduos exfoliados, dientes permanentes, dientes natales e incluso

supernumerarios, la localización de su nicho de origen permanece oculto. Desde un punto de vista tradicional, la pulpa dental consiste en cuatro capas:

- a. La zona odontoblastica.
- b. La zona acelular.
- c. La zona celular rica en células.
- d. La zona central.

La zona rica en células está fuertemente poblada de células madre progenitoras que muestran una gran plasticidad y capacidad de diferenciación multipotencial, y sirve de reservorio para el reemplazo de odontoblastos dañados. Shi. et al. demostró la expresión de marcadores de células madre de la pulpa dental, sin embargo dicha expresión está restringida a las paredes de vasos sanguíneos; indicando que las DPSCs están localizadas en la región perivascular del tejido pulpar.

2.5.4. Células madre en dientes deciduos no exfoliados SHED's

Las SHED fueron aisladas en 2003 por Miura et al., quienes las describieron como capaces de diferenciarse en una variedad de tipos celulares mayor que las DPSC. Estas células fueron aisladas de forma natural de dientes deciduos exfoliados, observándose que tienen la característica de proliferar más rápido y con mejor potencial de diferenciación que las DPSCs y las BMMSCs (Bone marrow mesenchymal stem cells,) o células madre mesenquimales de médula ósea, cuando son cultivadas *in vitro*. Además, poseen la capacidad de diferenciarse en células odontogénicas, adipositos y células neurales. También se ha observado que son capaces de formar hueso cuando son transplantadas *in vivo*. Con ellas no existen limitaciones éticas, y pueden ser más ventajosas que las provenientes de adultos por mayor capacidad de proliferación,

por su disponibilidad y fácil accesibilidad ^{2,3}. Cuando las SHEDs son colocadas para reemplazar pulpas extirpadas por infección, forman un tejido que semeja mucho en su arquitectura y celularidad a la pulpa dental. Otra aplicación clínica de trascendencia es su uso para aliviar la enfermedad de Parkinson.

2.5.5. Células madre en el ligamento periodontal PDLSC's ³

En la última década, las investigaciones sobre la reparación de tejidos periodontales se han enfocado en la identificación de células madre que contribuyen con la reparación de dichos tejidos, la caracterización de dichas células para la producción activa, y las formas en las cuales los procesos de reparación pueden ser manipulados por la administración de factores de crecimiento exógenos. Las PDLSC's son células progenitoras multipotenciales, que tienen la habilidad de generar fibroblastos, así como células osteogénicas o cementogénicas, mientras se mantiene el grosor del ligamento periodontal y la integridad del espacio del mismo.

Se ha determinado que el nicho de las células madre del ligamento periodontal reside cercano a los vasos sanguíneos y exhibe características típicas de células madre, las cuales incluyen un tamaño pequeño, así como los ciclos de división lentos.

La presencia de múltiples células en el periodonto sugiere que éste tejido contiene células madre que mantienen la *homeostasis* y la regeneración del tejido periodontal. Los análisis *in vivo* sugieren la participación de éstas células en la regeneración de hueso alveolar al proporcionar la información genética de diferenciación.

Las fibras de colágena generadas *in vivo* en humanos, son capaces de unirse a la nueva estructura formada de cemento, imitando así la unión fisiológica de las fibras de Sharpey. De éstos estudios y análisis se podrían contener un subgrupo de células capaces de diferenciarse hacia cementoblastos o cementocitos, así como hacia células formadoras de colágeno.

2.5.6. Células madre en papila apical SCAP'S³

Éste tipo de células madre derivan de la papila apical de terceros molares en proceso de desarrollo con ápices inmaduras, las cuales tienen una elevada actividad de proliferación y diferenciación, actuando como una fuente celular efectiva en los procesos de regeneración tisular *in vivo*.

Las células madre mesenquimatosas (MSC) residentes en la papila apical de permanentes inmaduros (SACP) fueron descubiertas por Sonomaya et al. y son capaces de formar odontoblastos que produzcan dentina *in vivo*. Esto explica la posibilidad de *apexogénesis* en dientes despulpados inmaduros. Las células madre de la pulpa dental de los dientes deciduos y dientes permanentes, así como las presentes en el ligamento periodontal tienen mayor carácter proliferativo que las sitúa sobre otras obtenidas a partir de una fuente diferente.

La papila apical hace referencia al tejido blando situado en los ápices de dientes permanentes en desarrollo. Existe una zona muy rica en células entre la papila apical y la pulpa. Es interesante destacar, que sin estimulación neurológica las SCAP's se muestran positivas para varios marcadores neurológicos, pero cuando se someten a estimulación neurológica, el número de marcadores aumenta notablemente.

Es probable que las SCAP's son las precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de dentina radicular, mientras que las células madre de la pulpa (DPSC) son precursoras de los odontoblastos que forman la dentina reparativa. Además, éstas últimas, contienen un mayor componente vascular y celular que las SCAP's.

Las SCAP's derivadas de un tejido en desarrollo en un inicio pueden representar una población de células madre o células progenitoras, que pueden ser una fuente de células superiores de la regeneración de tejidos.

Se ha demostrado que estas células formadoras de raíces conjuntamente con las células madre del ligamento periodontal colocadas en alvéolos de cobayos forman dentina y ligamento periodontal. Estas observaciones sugieren que ambas poblaciones celulares podrían ser usadas para crear raíces biológicas que en un momento pueden ser utilizadas en forma similar a un implante de titanio con capacidad para recibir coronas artificiales.

2.5.7. Células madre en folículo dental (DFSC's)

El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea al órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación. Este tejido contiene células que son las encargadas de la formación del periodonto, constituido por el cemento, ligamento periodontal, hueso alveolar y encía.

Las células madre presentes en el folículo dental han sido aisladas de los folículos dentales de los terceros molares impactados; son siempre semejantes al resto de las células madre de origen dental, pero constituyen colonia clonogénicas en menor número que los demás tipos. *In vitro* estas células muestran una morfología típica de fibroblastos y después de la inducción se ha demostrado diferenciación osteogénica. *In vivo* se ha demostrado la presencia del *antígeno STROH-1* en los folículos dentales y en trasplantes de estas células, observándose la generación de una estructura constituida por tejido fibroso rígido.

Las células madre aisladas del folículo dental se caracterizan por su rápida adherencia de cultivo y su habilidad para formar nódulos calcificados. Por otro lado, al igual que las células madre de papila apical, poseen mayor plasticidad, por lo que podrían utilizarse en la reparación de lesiones del corazón o del sistema nervioso.

2.5.8. Células madre de rugas palatinas.

Las rugas palatinas son eminencias papilares localizadas en la porción anterior del paladar duro y están recubiertas por un epitelio plano estratificado queratinizado. El paladar es un tejido altamente innervado e irrigado siendo altamente regenerativo. Esta capacidad de regeneración puede explicarse por la posible presencia de por lo menos un tipo de células madre en el tejido, como fibroblastos o factores de crecimiento. La obtención de células madre a partir de muestras de rugas palatinas es reciente y muy prometedora al igual que las diferentes fuentes de obtención de las mismas, debido a que a partir de las rugas palatinas es ya posible el aislar y caracterizar células madre para su posterior diferenciación a otros linajes celulares, tales como, el osteogénico, condrogénico y neural.

Tabla 1. Clasificación y características de las células madre de origen dental.

Tipo de célula	Abreviatura	Características In vitro	Características In vivo
C.M. de la pulpa	DPSC	-Multipotencialidad con capacidad: -Osteo/dentinogénica* -Adipo y neurogénica** -Condro y miogénica	- Formación de tejido ectópico: - Complejo dentino pulpar - Céls. similares a odontoblastos - Tejido óseo similar al original
C.M. del ligamento periodontal	PDLSC	-Multipotencialidad con capacidad: -Osteo/cementogénica -Adipo y neurogénica -Condro y miogénica	- Formación de tejido ectópico: - Tejido similar al cemento - Céls. similares a odontoblastos
C.M. de los dientes deciduos exfoliados	SHED	-Multipotencialidad con capacidad: -Dentinogénica -Adipo y neurogénica -Condro y miogénica -Osteoinducción***	- Formación de tejido ectópico: - Tejido similar al dentino-pulpar - Céls. similares a odontoblastos - No existe formación del complejo dentino-pulpar**** - Formación ósea***
C.M. de la papila dental	SCAP	-Multipotencialidad con capacidad: -Dentinogénica -Adipo y neurogénica -Condro y miogénica	- Formación de tejido ectópico: - Complejo similar al dentino-pulpar - Céls. similares a odontoblastos
C.M. del folículo dental	DFPC	-Multipotencialidad con capacidad: -Odontogénica -Cementogénica -Adipo y neurogénica -Condro y miogénica	- Formación de tejido ectópico: - Tejido similar al ligamento periodontal - Formación de matriz cementaria
* Una de sus principales características es la diferenciación odontoblástica. ** Expresando determinados marcadores genéticos. *** En ratones, las SHED pueden reparar defectos de formación ósea. **** A diferencia de las DPSC.			

Tabla 2. Diferencias entre aplicaciones de células madre de cordón umbilical y dentales.

Célula Madre	Hematopoyéticas	Mesenquimal
Obtención	Sangre de Cordón umbilical 	Dientes Primarios (leche). Terceros Molares (muelas del juicio) 
Tratamientos	Enfermedades Sanguíneas Leucemias Linfomas Anemias Trastornos genéticos Mieloma Múltiple Osteopetrosis Infartos embolias Lupus	Regeneración de: Cartílago Tendón Músculo Hueso Articulaciones Dientes y Encías Artritis Reumatoide Transplantes Lesiones
Potenciales	VIH - SIDA Melanoma Tumores primarios del cerebro Diabetes tipo 1 Otras	Enfermedad de Parkinson Alzheimer Parálisis Cerebral Infartos Cardíacos Otras
Multiplicación Celular	Tratamiento potencial para multiplicarse	Gran capacidad para multiplicarse por medio de cultivos



Figura 6. Medios de obtención de DES, Células Madre dentales

© Store-A-Tooth

2.6. TEJIDO ÓSEO.

La base de datos Mesh del programa Pubmed del Instituto Nacional de Salud Americano lo define: “tejido conectivo especializado, principal componente del esqueleto”, el hueso posee una resistencia tensil casi igual al hierro forjado pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible. Sin embargo el hueso no es un material inerte ya que posee una matriz orgánica e inorgánica, y también varios tipos celulares diferentes.

2.6.1. COMPOSICIÓN.

El hueso es un tejido conectivo laxo que junto con el cartílago conforma el sistema esquelético. Sus funciones mecánicas, protectoras y metabólicas derivan de su estructura. El hueso está constituido fundamentalmente por un componente mineral (65%), por matriz orgánica (33%) y por un componente celular (2%).

El componente mineral está formado fundamentalmente por Hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, que es la forma cristalizada del fosfato tricálcico amorfo. Existe en menor proporción CO_3^{2-} , Mg^{2+} , citratos, Na^+ , K^+ , sulfatos, etc.

Por otro lado la matriz orgánica está formada por grandes componentes protéicos que tienen la capacidad de formar agregados macromoleculares, cuya organización determina la estructura del hueso. Sus componentes fundamentales son el colágeno tipo I (90%) y una sustancia rica en glucosaminoglicanos.

El componente celular está formado principalmente por los osteoblastos o células formadoras de hueso y los osteoclastos o células destructoras del hueso. Al estar el hueso en contacto con la médula ósea e infiltrado de vasos sanguíneos, las células óseas se encuentran bajo la acción directa de un gran número de factores y hormonas sistémicas.

2.7. CÉLULAS ÓSEAS.

La formación y mantenimiento del hueso se relaciona con la acción coordinada de distintos tipos celulares. Éstas se encuentran clasificadas en cuatro tipos según su función y morfología principalmente:

- **Células indiferenciadas u osteoprogenitoras.**

Células de pequeño tamaño, núcleo único, pocos organelos, forma irregular y se mantienen en estado indiferenciado hasta que son estimuladas a proliferar o diferenciarse en odontoblastos. Normalmente residen en los canales del hueso, el *endostio* y el *periostio*, aunque también están presentes en tejidos no óseos.

- **Osteoblastos.**

Células cuboides con núcleo único generalmente excéntrico, y con grandes volúmenes de organelos. Se mantienen en la superficie ósea y cuando son estimulados forman matriz ósea orgánica y participan en la mineralización de esa matriz.

Una vez activados pueden encaminarse en dos vertientes: mantenerse en la superficie ósea y adoptar una morfología aplanada, o pueden rodearse de matriz ósea y convertirse en osteocitos.

- **Osteocitos.**

Resultan en más del 90% de las células de esqueleto humano. Sus prolongaciones o excrecencias celulares, se extienden desde sus cuerpos que son ovalados o lenticulares, para contactar con otros osteocitos u osteoblastos, formando una matriz de células que se extiende desde la superficie ósea por todo el entramado óseo. Ésta disposición les da acceso a la totalidad de la superficie de matriz extracelular mineralizada, y puede tener importancia en el intercambio mineral mediado por células entre el hueso y la sangre.

- **Osteoclastos.**

Células de morfología grande e irregular con múltiples núcleos, rellenan mucho de su citoplasma con mitocondrias que suministran energía para los procesos de reabsorción ósea que estas células llevan a cabo. Además, cuentan con la capacidad de moverse de un sitio de reabsorción a otro.

Una de las características más diferenciadoras de los osteoclastos es la morfología compleja de su membrana en la zona de contacto con la matriz ósea, en puntos de reabsorción. Tiene un borde rugoso o en cepillo, que parece jugar un papel importante en el proceso reabsortivo.

2.8. MATRÍZ ÓSEA.

Consta de macromoléculas orgánicas, material inorgánico y líquido de la matriz intracelular.

- **Matriz orgánica, osteoide.**

El colágeno tipo I contribuye aproximadamente al 90% de la matriz orgánica, el resto lo constituyen *proteoglicanos*, muchas proteínas no colágenas, colágeno tipo V y de otros tipos. La mineralización cambia y estabiliza la composición de la matriz.

- **Matriz inorgánica.**

Constituye aproximadamente el 70% del peso húmedo del hueso, aunque puede contribuir hasta el 80%. Poco después de que los osteoblastos formen la *osteoide*, aparece mineral depositado en las fibrillas de colágeno tipo I, extendiéndose posteriormente a través de la matriz sin alterar la organización de las fibrillas de colágeno. La matriz ósea mineralizada de manera reciente contiene varias especies de fosfato del calcio e hidroxiapatita. Cuando madura la matriz inorgánica se compone principalmente de hidroxiapatita cálcica.

2.9. ESTRUCTURA ÓSEA.

El hueso maduro puede clasificarse en hueso cortical y en hueso esponjoso.

- **Hueso compacto.**

La cortical del hueso se compone de laminillas que se disponen concéntricamente alrededor de pequeños canales, a través de los cuales pasa el aporte sanguíneo. Éstos son los canales de Havers que comunican con el exterior del hueso y la cavidad medular a través de otros canalículos denominados de Volkmann, esta disposición se conoce como sistema de Havers u osteona (Figura 8).

- **Hueso esponjoso.**

La disposición de las laminillas tienen forma trabecular o plexiforme, las fibras colágenas se distribuyen según las fuerzas de solicitud mecánica, son regulares y se disponen paralelamente en cada capa. Su dirección cambia de una capa a otra formando una red tridimensional. Éste tipo de hueso se encuentra principalmente en la *metáfisis* y *epífisis* de los huesos largos y en los huesos cortos, como en las vértebras (Figura 8).

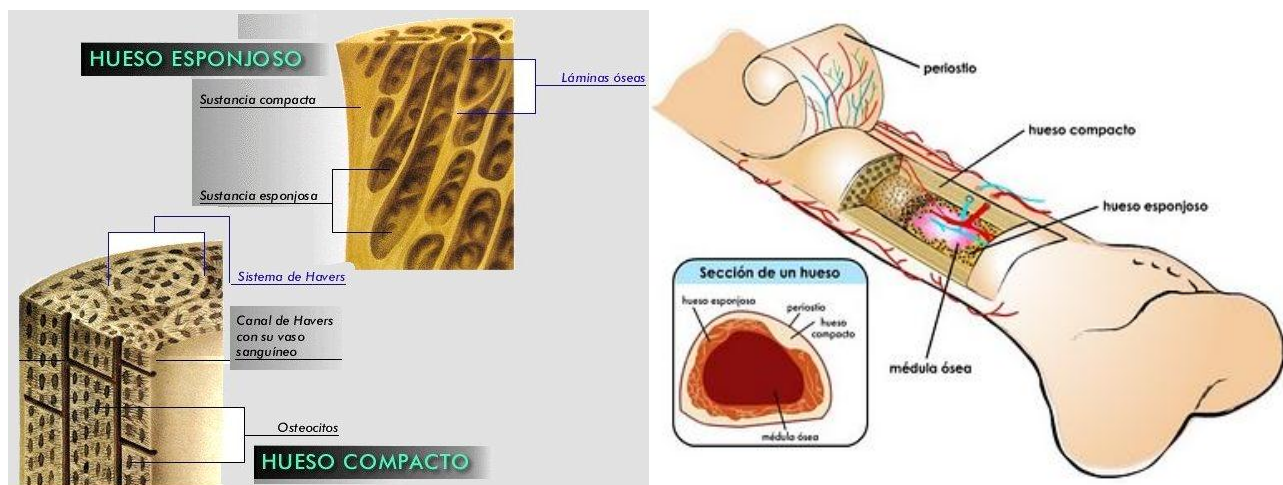


Figura7. Clasificación microscópica del tejido óseo.

2.10. HIDROXIAPATITA.

La hidroxiapatita (HAP) es un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno, de acuerdo a la formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$. La HAP está presente en huesos y dientes confiriéndoles su dureza característica, pertenece a la familia de las apatitas, presentando una estructura hexagonal. En los huesos está siempre acompañada de estructuras orgánicas como la colágena. Los principales componentes de la hidroxiapatita son el calcio y el fósforo. Sin embargo, la HAP natural contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso.

Las hidroxiapatitas sintéticas, que se obtienen a partir de fosfatos dicálcicos y tricálcicos, a través de un proceso de síntesis, presentan una pobre resistencia mecánica, además de disolverse fácilmente, lo cual no es deseable, para utilizarla como biomaterial de sustitución ósea. Si la hidroxiapatita biológica se utiliza como osteoconductor y se combina con sustancias extraídas del propio paciente, como plasma rico en plaquetas o células mesenquimales diferenciadas a osteoblastos, los resultados se optimizan respecto a la osteorregeneración

El cristal de hidroxiapatita crece y se compacta para dar dureza tanto al hueso como al diente. El crecimiento lo logra mediante un complicado proceso que se asocia con la presencia de colágena. La acción de la colágena sirve de molde para dar lugar al nuevo cristal que crecerá y diferenciará para establecer en las regiones más externas, las de mayor dureza mediante un proceso de remodelación.

La hidroxiapatita es un biomaterial por excelencia. La HAP es un material biocompatible que ha incursionado en la biomedicina como restaurador, se utiliza en odontología y oftalmología.

A consecuencia de que la hidroxiapatita puede ser reabsorbida por los osteoclastos se produce una fijación excelente de las prótesis debido a la formación de interfaces entre el hueso y el implante o su recubrimiento. Los recubrimientos porosos de hidroxiapatita con tamaños de poros y porosidades interconectadas similares a la de la estructura ósea han sido introducidos recientemente, ofreciendo propiedades inertes y estabilidad mecánica en la interfase desarrollada cuando el hueso crece dentro de los poros dando como consecuencia la fijación biológica, además de brindar una excelente reparación osteointegradora.

La biocompatibilidad de los fosfatos de calcio y de la hidroxiapatita sintética ha sido sugerida no solamente por su composición sino también por los resultados obtenidos en su implantación *in vivo*, los cuales han demostrado la ausencia de toxicidad local o sistémica, no provocando inflamación o respuesta al cuerpo extraño. La formación de enlaces internos entre la neoformación ósea y la hidroxiapatita constituye una gran ventaja del uso de éste como sustituto del injerto óseo. A las tres semanas de implantación la hidroxiapatita es revestida con fibroblastos y osteoblastos donde intervienen capas de mineralización osteoides. La formación del hueso continúa hasta que el defecto es restaurado y sucesivamente es remodelado. Otra propiedad de la hidroxiapatita es que aparentemente no presenta reabsorción significativa.

La hidroxiapatita no presenta actividad osteoinductora, sin embargo, demuestra osteoconducción cuando es implantada en defectos óseos. La formación del hueso comienza desde el borde del defecto y es conducido a través del implante formando un puente de hueso e hidroxiapatita. La naturaleza altamente biocompatible y osteoconductora de la hidroxiapatita la convierte en un material muy atractivo para ser empleado como sustituto de injerto óseo, aunque su capacidad de promover crecimiento depende no solamente de su composición química sino también de la presencia de poros.

Utilizada como andamio o *scaffold*, la hidroxiapatita con un sustrato de colágena permite un mejor crecimiento celular debido a que brinda un anclaje de estas células al andamio de hidroxiapatita y poder así guiar la regeneración ósea.

2.11. INGENIERÍA DE TEJIDOS.

Definición.

La ingeniería tisular o de tejidos es un campo multidisciplinario que involucra la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería, física y la ciencia de la vida, para el entendimiento de la interrelación función-estructura, en un tejido patológico y normal, así como el desarrollo de sustitutos óseos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular (Shalak y Fox, 1988).

La meta de la ingeniería tisular es superar las limitaciones de los tratamientos convencionales basados en el trasplante de órganos y la implantación de biomateriales (Langer y Vacantti, 1993); para producir una fuente de órganos “artificiales” inmunológicamente tolerantes y, sustitutos de tejidos que puedan crecer con el paciente. Dichos implantes deben permitir una reparación permanente de órganos y tejidos dañados, sin la necesidad de terapias suplementarias, las cuales hacen al tratamiento más caro a largo plazo (Patrick, 1998).

Por lo general, la ingeniería tisular está orientada hacia el desarrollo de materiales capaces de facilitar la reparación, la regeneración o el reemplazo de tejido dañado o enfermo. Cuando se repara y/o regenera un tejido, se debe mejorar el proceso de reparación natural, la cual constantemente produce cicatrices no funcionales o pobremente funcionales en lugar de un tejido normal. Con respecto a la reposición o reemplazo, el tejido “base” puede ser creado *in vitro* y posteriormente implantado; para esto se utiliza un componente celular unido a una estructura de

forma apropiada, conocido como *scaffold*, que puede implantarse directamente en el tejido deseado y, colonizado por células blanco.

Para la producción de un nuevo tejido óseo se necesitan componentes que se podían resumir en:

- Fuentes de células osteoprogenitoras para su multiplicación y producción de matriz extracelular,
- Una matriz o armazón que facilite la adherencia, migración, proliferación y estabilidad celular, y
- Factores bioactivos morfogénicos como los factores de crecimiento que amplifiquen la expansión celular, refuercen el fenotipo, favorezcan la producción de matriz extracelular y reduzcan la degradación catabólica.

A estos tres factores interactivos, se les conoce como la triada biológica en ingeniería de tejidos (representada esquemáticamente en la Figura 9), indispensable para cualquier experimento o terapéutica biomédica.

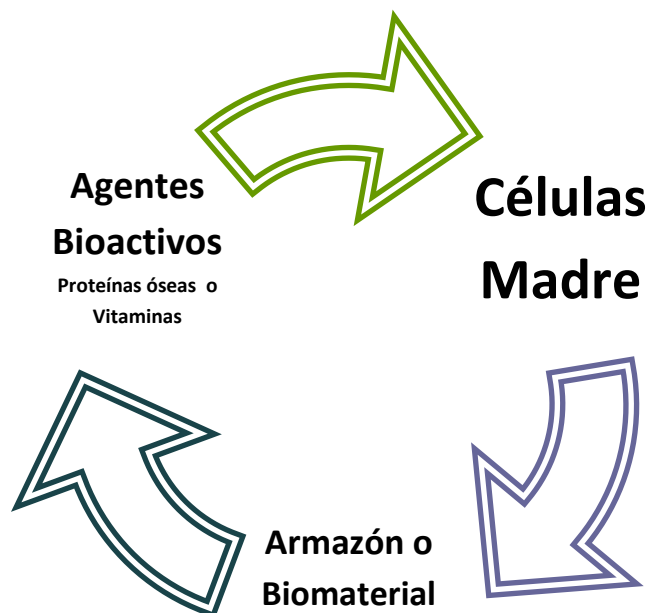


Figura 8. Triada Tisular en medicina regenerativa.

2.11.1. INGENIERÍA DE HUESO.

Los defectos óseos secundarios a una lesión, enfermedad y/o desórdenes congénitos, representan un problema importante de salud. Las estrategias actuales que se encuentran dirigidas a sustituir los defectos óseos, incluyen la utilización de injertos *autólogos*, *heterólogos* y biomateriales sintéticos. Aunque éstos injertos devuelven la estabilidad y la función del tejido, aún existen limitantes. La bioingeniería ósea utiliza la estrategia conductiva y la inductiva para la regeneración de pequeños defectos óseos. La regeneración tisular guiada (GTR) después de una cirugía periodontal, representa un acercamiento conductivo en la regeneración del hueso. Las BMPs, proteínas relacionadas y los genes que codifican para éstas proteínas permiten que se utilicen estrategias inductivas en situaciones donde la GTR no es suficiente. En contraste, la estrategia de trasplante celular, ofrece la posibilidad de preformar grandes estructuras de hueso (mandíbulas completas). Estas estructuras pueden incluso ser desarrolladas totalmente en el laboratorio antes de ser utilizadas.

Recientemente Ueda y co., utilizaron rhBMP-2 (proteína morfogenética ósea recombinante) junto con células mesenquimatosas de ratones embebidas en B-tricálcico-fosfato (MCS/B-TCP), en la colocación de implantes quirúrgicos demostrando neoformación ósea.

2.11.2. INGENIERÍA DE CARTÍLAGO.

La destrucción del cartílago es común en muchas enfermedades y después de un trauma. El diseño de templete de polímeros con propiedades mecánicas y de degradación ha permitido a la bioingeniería desarrollar tejidos cartilaginosos en modelos animales con tamaños y formas definidas (septum nasal y orejas) que potencialmente podrían ser usadas en la reconstrucción craneofacial. Joseph Vacanti, cirujano infantil del Hospital General de Massachusetts (EUA), comenzó a mediados de los 80's a buscar la forma de contar con órganos que permitieran suplir

el déficit de donaciones, para ello se asoció con el químico Robert Langer, del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT, EUA). Estos investigadores tuvieron la idea de reconstruir estructuras sintéticas y biodegradables que funcionen como esqueletos en donde las células crecen formando un tejido. En el último año estas investigaciones comenzaron a rendir sus primeros frutos, la Asociación Nacional de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos aprobó la utilización de matrices de colágeno para tratar quemaduras y úlceras cutáneas, y tejido de cartílago creados por ingeniería de tejidos para ser implantados en rodillas dañadas.

Comercialmente ya está disponible una nueva clase de biomateriales llamados ADMAT (animal derived extracellular matrix), diseñados en forma de templates protésico que movilizan las células propias del organismo y las inducen a reconstruir el tejido, reemplazando gradualmente la prótesis. Este proyecto de bioingeniería tisular pretende cambiar el reemplazo artificial de órganos por la regeneración natural de los mismos. Esta tecnología puede ser aplicada en muchas formas para problemas médicos y dentales (tejidos periodontales, hueso y tejido de ATM).

2.11.3. INGENIERÍA DE DENTINA Y PULPA DENTAL.

La producción de dentina y pulpa dental han sido desarrolladas en modelo animal y estudio *in vitro* utilizando las estrategias de ingeniería. El gran potencial de uso de esta ingeniería en tejidos se encuentra en la sustitución del material dentario perdido. La caries es una de las enfermedades más prevalentes en los adultos jóvenes y adolescentes, pero hoy en día existen diferentes formas de restablecer la dentina perdida. Una de la estrategias es la de inducir la formación de nuevas células provenientes de la pulpa dental utilizando proteínas morfogénicas óseas (BMPs). La ingeniería de tejido pulpar también puede ser posible utilizando fibroblastos cultivados y el uso de matrices sintéticas poliméricas.

Goldberg y co., demostraron la formación de pulpa artificial creada con moléculas bioactivas y agentes inductores condrogénicos en canales radiculares de molares superiores extraídos. Este hallazgo ofrece cambios espectaculares en los tratamientos endodónticos. Lianjia y co., observaron el papel de los odontoblastos en la formación de dentina en los gérmenes dentales y dientes adultos. Las proteínas morfogénicas óseas BMPs inducen la formación de cartílago y hueso cuando son implantadas en tejido muscular y están presentes en la matriz dentinal. En este estudio, las BMP se expresaron en odontoblastos, ameloblastos y matriz dentinal. La incorporación de las BMP al cultivo de tejido pulpar promovió la diferenciación de células mesenquimatosas en células odontoblásticas, incrementando la actividad de la fosfatasa alcalina, e indujo la formación de osteodentina y dentina tubular. Estos hallazgos sugieren que las BMP juegan un rol importante en la diferenciación de odontoblastos.

La pulpa dental tiene células madre progenitoras, que pueden proliferar y diferenciarse en odontoblastos formadores de dentina. Los odontoblastos dañados pueden ser reemplazados por nuevas poblaciones de odontoblastos derivados de las células madre pulpares.

Actualmente las técnicas de ingeniería tisular ofrecen matrices biológicas o aloplásticas reabsorbibles solas o sembradas con células vivas para la reconstrucción tridimensional de los tejidos afectados. Los sustitutos de mucosa oral desarrollados hasta el momento incluyen sustitutos basados en monocapa (tomadas de queratinocitos de mucosa oral o de tejido epitelial o piel humana cadavérica), sustitutos bicapa (constituidos por una capa de tejido conectivo equivalente a la matriz extracelular y otra semejante al epitelio), co-cultivos organotípicos (capa análoga a la dermis sembrada primero con fibroblastos y después queratinocitos y expuestas en cámaras de cultivo organotípicas) y co-cultivos de queratinocitos sobre AlloDem (queratinocitos cultivados sobre dermis humana cadavérica acelular no inmunogénica). Hasta el momento estos tejidos han sido utilizados en la reconstrucción secundaria de estructuras orales perdidas por

tumores, en injertos realizados a pacientes con labio y paladar fisurado y en reconstrucción de tejidos periodontales perdidos por trauma o enfermedad periodontal.

Muchos de los tejidos no sólo presentan colecciones de células arregladas aleatoriamente, también poseen características de organización altamente detalladas, las cuales están relacionadas a una función tisular. El ingeniero tisular busca principalmente restaurar la arquitectura del tejido; y el uso de un andamio proporciona los medios para lograr este fin. Estos andamios deben estar contruidos para diferentes tipos de tareas; por ejemplo una microestructura porosa permitirá una colonización celular y el crecimiento en su interior. Al aumentar la microestructura se cambia la distribución de los espacios entre los poros, lo cual ayuda a orientar a las células; así como las variaciones en las propiedades superficiales del material, que facilita la adhesión y/o migración celular selectiva. Normalmente, el andamio es construido con materiales biodegradables, para que pueda ser integrado en el tejido anfitrión y en un tiempo apropiado sea absorbido por el organismo. La biodegradabilidad permite el reemplazo gradual ordenado del andamio por un tejido funcional y, también previene el desarrollo de respuestas adversas debido a la estructura artificial. Además el andamio puede ser creado para liberar agentes biológicos activos al tejido blanco; por ejemplo el factor de crecimiento o genes. El material también puede poseer actividad biológica intrínseca, que permita una reacción de migración o proliferación específica de poblaciones de células vecinas.

2.12. FUNCIÓN DE LOS INJERTOS ÓSEOS.

Osteogénesis.

El término osteogénesis hace referencia a la formación de nuevo hueso sin indicación celular. Cuando se forma el hueso sobre el injerto o a su alrededor, éste puede tener origen en el

propio injerto (células que sobreviven al tratamiento del injerto, y que lógicamente sólo puede suceder con los autoinjertos) o células en el huésped.

Osteoinducción.

La osteoinducción es el proceso por el que factores o sustancias estimulan un determinado número de células osteoprogenitoras para que se diferencien hasta células osteogénicas. Además del autoinjerto, materiales que poseen esta propiedad osteoinductiva son la matriz ósea desmineralizada, las proteínas morfogénicas (BMP) y grupos vitamínicos.

Osteoconducción.

La osteoconducción es el proceso tridimensional de crecimiento de brotes vasculares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras desde el lecho del receptor al interior del injerto. La osteoinducción puede ocurrir por una neoformación ósea activa por osteoinducción o puede suceder pasivamente sin la participación del propio injerto, como sucede en la mayoría de los injertos con esponja. Estos materiales osteoconductores están compuestos por hidroxiapatita, fosfato tricálcico, sulfato cálcico o una combinación de éstos materiales y diversos biopolímeros.

2.13. CÉLULAS Y CULTIVOS CELULARES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.

Con el ambiente apropiado la mayoría de las células vegetales y animales pueden vivir, multiplicarse e incluso expresar propiedades diferenciadas en una placa de cultivo. Éste método permite que se puedan observar mediante microscopía o ser analizados bioquímicamente, así como comprobar los efectos de añadir o retirar diferentes moléculas específicas, como factores de crecimiento, entre otras posibilidades.

El cultivo de tejidos inició en 1907, mediante la experimentación en neurobiología y la denominada hipótesis neural, que estableció que cada fibra nerviosa es la prolongación de una única célula nerviosa. La mayoría de las células para tejido tisular requieren de un sustrato sólido sobre el cual crecer y dividirse. En la actualidad los cultivos celulares suelen llevarse a cabo sobre placas a las que se adhieren, migran y proliferan.

Existen varios tipos de medio de cultivo. El medio de cultivo es esencial para lograr que exista un correcto ambiente para el desarrollo y mantenimiento celular, y además de poseer los factores de crecimiento necesarios para éste tipo de células, debe poseer los factores nutricionales necesarios, adecuados, tener un pH y osmoralidad correctos, y paralelamente es necesario aportar los gases esenciales, oxígeno y dióxido de carbono. Dentro de los medios de cultivo en ingeniería tisular, son de esencial importancia los siguientes:

- **Medio Basal de Eagle (BME).** Es un medio elemental con sólo los aminoácidos esenciales. Necesita estar suplementado con suero fetal bovino al 10%. Puede utilizarse para cultivo de fibroblastos de ratón y células HeLa.
- **Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM).** Contiene aminoácidos en mayor concentración que el BME, se puede utilizar para múltiples tipos de cultivo celular, requiere suplementación con suero fetal bovino al 10%.
- **Medio MEM modificado por Dubelcco (DMEM).** Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que BME, con utilidad en el cultivo de fibroblastos.

Los cultivos preparados directamente de tejido de un organismo sin división celular se denominan cultivos primarios. En muchos de los casos las células de un cultivo primario pueden

hacerse proliferar hacia un gran número de cultivos secundarios, de ésta forma se puede cultivar de manera repetida durante semanas o meses. Estas células expresan muchas veces propiedades adecuadas a su origen celular, como la producción de matriz extracelular específica.

Cuando las células se mantienen en cultivo, por regla general conservan su carácter original. Cada tipo de célula parece tener una memoria de su desarrollo y estar fija en su forma especializada, aunque pueden suceder algunas transformaciones limitadas.

Las células madre en cultivo en cambio pueden continuar dividiéndose y diferenciarse o uno o más tipos celulares, cada célula madre en particular sirve para la regeneración de un tejido concreto.

Las ventajas potenciales del uso clínico y experimental de células mesenquimales pluripotenciales o células madre, en contraposición con las células diferenciadas, son la mayor capacidad de proliferación, incluso para individuos de edad avanzada, mayor respuesta a factores de crecimiento y moléculas señalizadoras, capacidad para diferenciarse a condroblastos u osteoblastos.

Recientemente se han publicado estudios sobre el cultivo de células madre humanas y su diferenciación sobre armazones celulares. Las células madre mesenquimales humanas son una fuente interesante de células ya que pueden extraerse, expandirse y diferenciarse.

2.14. BIOMATERIALES.¹⁰

El término biomaterial designa a los materiales de origen no biológico utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la medicina.

La principal aplicación de los biomateriales, incluyendo las aleaciones metálicas, es reparar o reconstruir las partes del cuerpo humano que han sufrido daño o se han perdido, con lo que se busca relevar el sufrimiento y prolongar la vida.

Los biomateriales cumplen funciones básicas en el cuerpo humano, asegurando la calidad de vida de las personas enfermas o de quienes han sufrido accidentes traumáticos. Según su *composición química* los biomateriales se clasifican en metálicos, plásticos (o poliméricos), cerámicos y compuestos; de acuerdo con su *origen*, en naturales y sintéticos y por su *estructura*, en sólidos y porosos (Tabla 3).

El conocimiento y la aplicación de los biomateriales involucra un amplio espectro de disciplinas: medicina, biología, química, física, mecánica, metalurgia, ingeniería, informática y computación; así como numerosas áreas de actividad, las cuales se realzan en instituciones de estudio e investigación.

Los dispositivos biomédicos adaptados al cuerpo humano se fabrican con los cuatro materiales de ingeniería convencionales: metálicos, plásticos, cerámicos y compuestos; según el uso, ubicación, función; órgano o tejido duro o blando a reemplazar o reparar.

Los metales se utilizan básicamente en implantes y fijaciones ortopédica; los plásticos flexibles para corregir tejidos blandos, cartílagos, venas y arterias; los plásticos rígidos para reemplazar la cabeza del fémur que gira dentro de la concavidad de la pelvis; asimismo, los materiales cerámicos se emplean en el reemplazo de huesos y como recubrimientos sobre metales. También se aplican materiales avanzados como las aleaciones con memoria de forma, las cuales pueden cambiar por el efecto de la temperatura dentro del cuerpo humano, amoldándose a las cavidades en la que han sido insertadas. Los materiales porosos, por su parte, permiten el crecimiento del hueso dentro de los poros y su posterior unión con las fibras de los

tejidos adyacentes. Las espirales elásticas de acero inoxidable introducidas en venas o arterias cubren con el objetivo de evitar que éstas se colapsen.

Los biomateriales deben cumplir con tres exigencias elementales: ser biocompatibles, resistir a la corrosión de los fluidos corporales y cumplir la función biológica o mecánica planeada.

Tabla 3. Tipos de Biomateriales, propiedades y aplicaciones generales.

BIOMATERIAL	PROPIEDADES	APLICACIONES
Metales y aleaciones. Acero inoxidable, aleación de Titanio, Cobalto y Nitinol.	Alta densidad, resistencia mecánica al desgaste, impacto, tensión y compresión; baja biocompatibilidad, resistencia a la corrosión.	Implantes y fijaciones ortopédicas con tornillos, placas, alambres y clavos. Implantes dentales.
Cobre.	Se corroe en el útero	Dispositivos intrauterinos
Amalgamas y aleaciones dentales.	Biocompatibilidad con saliva.	Implantes y obturaciones dentales.
Espirales vasculares elásticas (stents).	Biocompatibilidad con sangre.	Reparación de venas y arterias.
Plásticos (polímeros) Hule (goma)sintético Polietileno, Polipropileno. Dacrón, Nylon (poliéster).	Baja densidad y resistencia mecánica. Formación de biopelículas.	Suturas, sustitución de arterias y venas. Restauración maxilofacial, nariz y oreja. Hilos de sutura.
Cerámicos. Óxidos metálicos zirconia, titanio, fibra de carbono, apatita artificial. Recubrimientos.	Buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, inertes, alta resistencia a la compresión, alta densidad y dureza. Dificultad de maquinado y fabricación.	Caderas protésicas. Dientes cerámicos. Cementos.
Compuestos. Metal cubierto con cerámica y diamante. Titanio con hidroxiapatita porosa.	Buena biocompatibilidad, inertes, alta resistencia a la corrosión y a la tensión.	Implantes ortopédicos reforzados con fibras de carbono. Válvulas artificiales (cardíacas) y restauración de articulaciones.

2.14.1. CLASIFICACIÓN.

Los biomateriales pueden clasificarse en:

Inertes: no presentan interacción con el organismo donde están implantados o bien la cápsula que produce el organismo alrededor de ellos es sumamente delgada (décimas de micra).

Porosos: presentan porosidad adecuada para que las células que los rodean puedan penetrarlos.

Bioactivos: promueven la existencia de enlaces entre ellos y el tejido que los circunda.

Bioabsorbibles: se reabsorben por el organismo una vez que cumplieron con su misión.

Biocompatibles: todos los biomateriales no clasificables en ninguno de los grupos anteriores.

2.14.2. BIOCOMPATIBILIDAD.

La propiedad trascendental en la interacción biomaterial-cuerpo humano, es la biocompatibilidad, o bien, la ausencia de una reacción fisicoquímica perniciosa del biomaterial implantado con los tejidos y los fluidos biológicos corporales, también llamados soluciones fisiológicas. La falta de biocompatibilidad induce una reacción negativa entre el implante y su entorno biológico creando, en forma progresiva, irritación, inflamación o infección, a tal grado que debe removerse el implante para evitar la destrucción de los tejidos o perjudicar la función de los órganos cercanos con graves consecuencias en la salud de la paciente.

La biocompatibilidad de un material puede dividirse en dos grandes ramas:

1. *Caracterización físico-química del material, que comprende estudios como:*

- Composición química del material;

- Densidad, forma, geometría, estructura y microestructura del material;
 - Propiedades térmicas;
 - Propiedades mecánicas, como elasticidad, resistencia, dureza, desgaste, fricción, fatiga, corrosión y envejecimiento;
 - Propiedades superficiales, como área, hidrofobicidad, textura y porosidad;
 - Propiedades electroquímicas, como polarización anódica y catódica y corrosión;
2. *Caracterización médica-biológica, que se puede dividir a su vez en estudios in vitro, que se llevan a cabo en cultivos de tejidos: citotoxicidad, genotoxicidad, proliferación y adhesión celular, biodegradación y mutagenicidad, entre otros; y en estudios in vivo, los cuales se realizan por implantación en animales (estudios preclínicos) y en seres humanos (estudios clínicos): irritación, inflamación, pirogenicidad, toxicidad sistémica, sensibilización, mutagenicidad, carcinogenicidad, interacción con la sangre y reacción a partículas extrañas.*

Corrosión.

La corrosión es el deterioro de un material generalmente metálico por interacción con el medio que lo rodea y que en nuestro caso que depende de varios parámetros del sistema implante-bioambiente, como son la geometría de diseño, metalúrgica, mecánica y química. Los productos de la corrosión pueden dispersarse en el cuerpo humano y afectar los procesos biológicos, por ejemplo, la actividad de los órganos y las enzimas.

2.14.3. APLICACIONES DE LOS BIOMATERIALES.

Uno de los retos actuales es otorgar al biomaterial una funcionalidad prolongada en el cuerpo. Algunos materiales rehabilitan la estructura de los tejidos duros y realizan una acción mecánica, aunque otros cumplen una función esencial, por ejemplo, las válvulas cardíacas artificiales que están en contacto directo con la sangre.

Tres de las aplicaciones principales de los biomateriales son los implantes ortopédicos para reparación del sistema óseo; materiales dentales y los dispositivos anticonceptivos. Los adhesivos tisulares son muy útiles en el campo de la ortopedia. Otros productos como granulados de hidroxiapatita o material biodegradable de β -fosfato tricálcico, se emplean para la restauración y reparaciones óseas.

Biofuncionalidad.

La funcionalidad de un biomaterial es en gran parte el desempeño que representa el dispositivo que se implanta en un medio biológico. Por ello, las características del diseño del implante, además de la biocompatibilidad del material, la geometría, las características superficiales; hidrofobicidad, hidrofiliidad y rugosidad, las propiedades mecánicas respecto a las del tejido u órgano que lo aloja, entre otros.

2.15. BIOESTRUCTURAS

2.15.1. ANDAMIOS CELULARES Y CONSTRUCTOS.

Los biomateriales contribuyen, en la ingeniería de tejidos, a proporcionar una estructura denominada armazón, en el cual las células se siembran para proliferar y generar un sistema tisular.

La mayoría de los tejidos, sugieren que un andamiaje es esencial para producir la regeneración ordenada del tejido. Aunque las células aisladas tienen la capacidad para reformar una estructura tisular respectiva, esto lo hacen hasta un punto limitado ya que no tienen organización tisular intrínseca. Las células aisladas no pueden transplantarse en grandes cantidades ya que existen problemas para la difusión de los nutrientes, con éste objetivo se intentan sembrar células sobre andamios inertes que sirven de estructura guía del desarrollo tisular. En general un andamio está diseñado para producir una plantilla estructural para la adhesividad y el desarrollo tisular.

Los andamios varían con respecto a:

- La composición química del material (colágeno, agarosa, polímeros, etc.),
- Geometría (geles, redes fibrosas, esponjas porosas, etc.),
- Estructura (porosidad, distribución, orientación y conectividad del poro),
- Propiedades mecánicas (resistencia compresiva, elasticidad, etc.), y
- Degradación.

La porosidad del andamio debe permitir el intercambio de nutrientes y productos de desecho, mientras que tiene que proveer de un soporte físico adecuado para las células y la matriz extracelular.

Los andamios tienen que estar fabricados con materiales biocompatibles y preferiblemente biodegradables. En caso de poseer esta segunda propiedad el andamio debe de reabsorberse a la misma velocidad que se forma la matriz extracelular.

Las propiedades mecánicas del andamio pueden determinar la mecanotransducción en el tejido en desarrollo, y por tanto si éste es adecuado o no para una aplicación particular de ingeniería de tejidos y por lo tanto, deben cumplir ciertos requisitos entre los que se encuentran propiedades mecánicas similares a las del tejido a regenerar, biocompatibilidad y biodegradabilidad a un ritmo consistente al remodelado.

Las características esenciales de los andamios son:

- Propiedades mecánicas similares a las del tejido a regenerar,
- Biocompatibilidad,
- Biodegradabilidad a un ritmo consistente con el remodelado en producto son tóxicos, y
- Manufacturables

Las construcciones tisulares tridimensionales se obtienen de la triada conformada por las células, las señales moleculares y las matrices extracelulares, llamados también constructos.

Un constructo es la estructura formada por los tres componentes necesarios para configurar un tejido artificial (células, andamios e inductores) y la disposición arquitectural que adoptan en relación con su ubicación en el organismo. Si el constructo reproduce de manera estricta la estructura del tejido se denomina *constructo tisular*; si reproduce la estructura de un órgano con varias poblaciones celulares jeraquizadas se denomina *constructo de órgano*.

Para la elaboración de un constructo se necesitan varias fases. La primera consiste en la reproducción y la proliferación de las células. Esta fase se desarrolla en placas de cultivo con un medio estático, que incluye factores de crecimiento, suero fetal bovino y suero autólogo del paciente, del cual se obtienen las células por medio de una pequeña biopsia. Aunque este

mecanismo asegura la proliferación celular en la cantidad necesaria, las células pierden muchas de sus cualidades más características a causa de la dediferenciación.

La segunda fase en el proceso consiste en el asentamiento de las células sobre el biomaterial seleccionado. La relación entre la población celular y el biomaterial es decisiva para la diseminación tridimensional de la misma población y para la óptima diferenciación de sus elementos. El asentamiento en el biomaterial puede llevarse a cabo de un modo estático (aplicación directa de la suspensión celular al soporte) y de una forma dinámica (aplicación de la suspensión celular a un soporte en agitación, incluyendo la rotación). En los soportes de menos de 2mm, el asentamiento puede conseguirse con métodos estáticos; para los soportes mayores de 2mm es necesario utilizar técnicas dinámicas. Con el objetivo de potenciar la adhesión y facilitar la proliferación, la diferenciación y la migración sobre el soporte, éste puede recubrirse con moléculas de distinta naturaleza (aminina, fibronectina), hidroxiapatita y con factores de crecimiento.

La tercera fase implica el mantenimiento del fenotipo diferenciado en el nuevo tejido construido. Para conseguirlo, el nuevo tejido debe transferirse a un contenedor de cultivo con perfusión permanente de medio fresco y eliminación continua de metabolitos nocivos. El término biorreactor, utilizado en distintas aplicaciones de la medicina, se identifica en la ingeniería tisular con los diferentes dispositivos (cartuchos de perfusión, estructuras, vasos rotatorios) en los cuales pueden llevarse a cabo cultivos dinámicos estables que se renuevan de manera continua y en los cuales se introducen otros componentes de naturaleza física y mecánica, como la microgravedad simulada, el alargamiento, la presión, la rotación, etc. En éstos biorreactores el constructo se desarrolla en su diferenciación histotípica con carácter previo a su implantación, a su utilización en la investigación experimental e incluso a su empleo temporal en conexión con algunos pacientes.

En la elaboración de constructos se llevan a cabo modelos de sólo un tipo de células y material, como ocurre con algunos constructos de cartílago, y modelos con varios tipos de células y de material, como ocurre con los constructos de piel, en los cuales se utilizan fibroblastos y queratinocitos, y con los constructos de vasos sanguíneos, en los cuales se emplean células endoteliales y musculares.

La elaboración de un tejido y de un órgano por medio de la ingeniería tisular exige, a partir del conocimiento previo de la naturaleza descriptiva de los mismos, un diseño constructivo en el cual las células, los biomateriales y las señales moleculares implicadas sean ensamblados de manera parcial o total en un biorreactor en el que se haya reproducido o imitado los principales factores morfogénéticos que condicionan e inciden en su estructura.

Para el desarrollo tisular en procesos de regeneración ósea, son tres los componentes indispensables para éste propósito: ¹¹

El primero son las células madre, las más recomendables son las del propio paciente (autólogas), teniendo como fuente de éstas al cordón umbilical, médula ósea y más recientemente las células de pulpa dental, que se caracterizan por su gran capacidad de proliferación y diferenciación.

El segundo componente son los andamios o moldes donde se colocan las células y sirven como vehículos. Entre los más conocidos están la hidroxiapatita, el fosfato tricálcico y esponjas de colágeno que han sido sometidos a exhaustivas investigaciones para mejorar su adaptación y determinar su capacidad ósea regenerativa. El andamio debe ser capaz de soportar cargas cuando sea necesario, esto permite el mantenimiento de la estructura, de tal forma que el hueso neoformado pueda modelarse al adquirir las mismas cualidades y dimensiones que el hueso original; debe ser osteoactivo, es decir, estimular la formación de nuevo hueso. No debe causar

molestias o dolor, fracturas, sangrado excesivo, respuesta negativa al cuerpo extraño, deformidad, transmitir enfermedades ni reabsorberse antes de que ocurra la formación de hueso, reacciones inflamatorias crónicas o de rechazo y no ejercer sobre el organismo efectos tóxicos o carcinogénicos.

El tercer componente son los inductores o biomoléculas, que ejercen una inducción o efecto sobre las células madre a convertirse en una célula formadora de hueso.

En resumen, los tejidos y los órganos contruidos mediante la ingeniería tisular para uso clínico deben conseguir en su diseño:

1. La naturaleza estructural y funcional de los tejidos naturales,
2. Los tamaños y las formas deseadas,
3. La posibilidad de continuar su desarrollo tras su implantación en el cuerpo, y
4. La posibilidad de integrarse completamente al huésped.

Los andamios son estructuras tridimensionales que se usan para soportar tejidos o células mientras procede la regeneración o formación de órganos; en general se manufacturan con biomateriales poliméricos biodegradables que ayudan en el soporte de células y el transporte de nutrientes a los tejidos. Los biomateriales metálicos o cerámicos se emplean como andamios para tejido duro (hueso) y tienen dos aplicaciones básicas: la restauración de los tejidos y la función como controladores y liberadores de medicamentos en el tratamiento de tumores e infecciones.

Siempre se ha buscado que los biomateriales sean resistentes y biocompatibles. La última novedad en cuanto las aplicaciones de los biomateriales, son deliberadamente débiles y flexibles para minimizar el daño a los tejidos y tener un tiempo de servicio finito predeterminado, mucho menor que el esperado.

Hoy en día la ingeniería de tejidos hace uso de los andamios celulares para facilitar el crecimiento de las células humanas y de estructuras tridimensionales de biomateriales usadas para el soporte de tejidos o células, y el transporte de nutrientes a los tejidos mientras la regeneración se lleva a cabo. Generalmente están elaborados de biopolímeros degradables, pero para tejido óseo se han empleado andamios metálicos y cerámicos con mucho éxito.

Con la intervención de la biología tisular, es posible colocar a éstos andamios celulares matrices bioinductoras de tejido nuevo, como proteínas morfogénicas o factores de crecimiento que tienen como función hacer que las células madre se diferencien a ciertos tipos celulares o inducir la división de células ya diferenciadas.

2.15.2. ANDAMIOS BIODegradABLES.

Los andamios biodegradables son estructuras tridimensionales utilizadas en la ingeniería de tejidos para el crecimiento celular de manera organizada. Para la fabricación de los andamios biodegradables, es necesario utilizar materiales con características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y con velocidades de degradación aceptables, tales como el poli-(ácido láctico) o PLA y la Policaprolactona o PCL.

Unas de las características básicas que se le deben dar al material que formará al andamio es: tener una alta porosidad, una máxima área superficial, rigidez superficial, forma específica tridimensional y necesita ser biodegradable.

La gran mayoría de los andamios desarrollados para aplicaciones en el campo de la ingeniería tisular están constituidos por estructuras elaboradas a partir de materiales poliméricos. Los polímeros sintéticos son bioabsorbibles con capacidad de degradarse gracias a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo humano, y eliminarse completamente por vías metabólicas, siendo por ello los materiales más atractivos para la elaboración de andamios

en ingeniería tisular. Los andamios elaborados a partir de éste tipo de polímeros ofrecen la posibilidad de crear tejidos completamente naturales dejando de lado los problemas de infección y formación de hueso fibroso, asociados a implantes permanentes.

Hay muchos materiales biocompatibles que pueden ser utilizados (Tabla 4), en general los más auspiciados son los polímeros y, dentro de éstos, los polímeros biodegradables son los más utilizados ya que son degradados por el huésped en un periodo de tiempo adecuado. Los polímeros biodegradables proporcionan un sustento celular hasta que las células son capaces de secretar su propia matriz extracelular. El ácido poli-L-láctico (PLLA), el ácido láctico-co-glicólico (PLGA), el ácido glicólico (PGA) y la Policaprolactona (PCL) son polímeros biocompatibles de degradación aprobados por la FDA (Food and Drugs Administration) para su uso en determinadas aplicaciones.

Tabla 4. Tipos de Biopolímeros y sus aplicaciones en andamios celulares.

POLÍMEROS SINTÉTICOS BIODEGRADABLES USADOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS	
Polímero	Aplicaciones
PLA-PGA	Hueso, cartílago
Polianhídridos	Hueso, liberación controlada de fármacos
Poliortoester	Liberación controlada de fármacos
Policaprolactona	Dispositivos biodegradables de fijación
Policarbonato	Hueso, dispositivo de fijación, liberación controlada de fármacos
Polifumarato	Hueso

Las estructuras poliméricas porosas pueden ser obtenidas a través de numerosos métodos. Cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio.

Una de las técnicas más usadas para la fabricación de éstos, es la bioextrusión, la cual es un proceso de fabricación aditiva, cuyas principales ventajas son reproducir rápidamente estructuras tridimensionales complejas, utilizar diferentes materias primas y con alta reproducibilidad, obteniéndose andamios con forma y morfología interna predefinidas, permitiendo un control en el tamaño y distribución de los poros.

Otras técnicas utilizadas hoy en día para la elaboración de andamios porosos son:

- **Gel casting:** consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico como la acetona. La solución polimérica es colocada en un molde hasta alcanzar consistencia de gel. Posteriormente el gel es procesado mediante diferentes concentraciones de acetona, etanol y agua para así obtener una estructura microporosa.
- **Disolución y vaciado con liberación de partículas:** en éste método, se incorpora a la solución polimérica una proporción determinada de partículas minerales (cloruro de sodio) u orgánicas (sacarosa). La mezcla es luego vaciada en un molde donde el solvente se evapora o puede ser procesada por “*freeze-drying*”. Una vez evaporado el solvente, las partículas son disueltas en agua dejando a su paso los diferentes poros. Con ésta técnica se pueden conseguir porcentajes de porosidad elevados. El tamaño de los poros dependerá de las partículas utilizadas.

- **Laminación de membranas:** es parecida a la técnica conocida como “*lamitaded object manufacturing* (LOM)” usada en el prototipado rápido. Consiste en la utilización de diferentes films porosos generalmente obtenidos a partir de la técnica de disolución y colada con la liberación de partículas, y colocados uno sobre otro unidos con la ayuda de la impregnación con cloroformo en la superficie para obtener estructuras tridimensionales de forma compleja.
- **Separación de fases:** el polímero se disuelve en un solvente como el dioxano a una temperatura baja. La separación líquido-líquido y luego sólido-líquido es inducida al bajar la temperatura de la solución. Subsecuentemente se elimina el solvente solidificando por medio de la sublimación del mismo dejando así el andamio polimérico. La concentración del polímero y la estrategia de enfriamiento juegan un papel fundamental en la morfología del poro.
- **Saturación con gas:** para esto se utilizan especímenes poliméricos sólidos previamente prensados, los cuales son expuestos a altas presiones (800 unidades de SI kilopascal) de CO₂ permitiendo así la saturación del polímero con el gas. Se crea una inestabilidad termodinámica al reducir la presión del gas a niveles ambientales. Esto conlleva la nucleación y expansión del CO₂ disuelto generando así macroporos. La mayor ventaja de éste proceso es que no utiliza solventes orgánicos. La mayor desventaja es que el producto final es poco poroso en la superficie y además permanece un cierto porcentaje de porosidad cerrada en el interior del material. Para solucionar estos problemas se está utilizando esta técnica en combinación con partículas solubles en agua.

- **Liofilización:** es una técnica similar a la separación de gases, consiste en *liofilizar* soluciones congeladas del polímero con ácido acético glacial o benceno. La morfología de las esponjas depende notablemente del polímero y del solvente. Por ejemplo, el benceno induce una estructura tipo capilar, mientras que el ácido acético produce una estructura tipo ladrillo.
- **Unión de fibras:** consiste en la elaboración de redes interconectadas mediante la unión de fibras. Para esto se utilizan dos polímeros diferentes como la PLA y PGA. Las fibras de PGA son alineadas con la forma final de la estructura deseada, y son embebidas en una solución de PLA/cloruro de metileno. Después de la evaporación del solvente, los polímeros son calentados por encima de su temperatura de fusión. Finalmente el PLA es disuelto en cloruro de metileno, dejando las fibras de PGA unidas de forma tal que forman una estructura porosa. Esto se puede conseguir gracias que el PGA es insoluble en cloruro de metileno. Dada la especificidad del solvente, del par de polímeros y de sus temperaturas de fusión, esta técnica es difícil de utilizar con otros polímeros.

En general, casi todas las técnicas pueden ser utilizadas no sólo para elaborar esponjas poliméricas, sino también para generar materiales compuestos porosos. Para esto se añaden partículas o fibras de enlace de refuerzo (fosfato de calcio) en la fase de elaboración de las estructuras.

Las técnicas convencionales para fabricar andamios incluyen tecnologías textiles, modelo por solventes, lixiviadas de partículas, laminación de membrana y modelo por fundido. Desde un punto de vista funcional y diseño de los andamios cada metodología tiene sus pros y contras:

- **Textiles:** un gran número de tecnologías textiles tienen el potencial de ser aplicados en el diseño y fabricación de andamios altamente porosos. Las fibras proporcionan un área

superficial grande en relación al volumen y, por lo tanto, son deseables como matriz en los andamios. Los textiles carecen de la estabilidad estructural para soportar la carga biomecánica. Para los tejidos finos tales como hueso y cartílago, el desafío de un tejido-célula construido, es tener características mecánicas similares a las del tejido original.

- **Unión de cadena:** esta técnica consiste en alinear fibras en la forma deseada del andamio, embebidas en una disolución polimérica. Después de la evaporación del solvente, el material compuesto es calentado alrededor de su temperatura de fusión de ambos polímeros. Posteriormente la matriz es removida por disolución selectiva, dejando a las fibras físicamente unidas en sus puntos de contacto. Obviamente esta técnica no es muy apropiada para el control de la porosidad.
- **Fase de separación:** el polímero es disuelto en un solvente a baja temperatura. La fase líquido-líquido o sólido-líquido es inducida bajo temperatura de la disolución. Subsecuentemente, se remueve la fase sólida rica en solvente por sublimación, dejando un andamio polimérico poroso. Una ventaja es que se puede incorporar moléculas bioactivas dentro de la matriz sin decrecer la actividad de la molécula, por efecto de severos ambientes químicos y térmicos.
- **Modelo por fusión:** una mezcla de polímeros en forma de polvos finos y microesferas de gelatina son cargados en un molde de teflón, y calentados a temperatura de transición vítrea del polímero. Subsecuentemente la disolución de la gelatina, resulta un material poroso de matriz polimérica. El tamaño de poro es controlado directamente por el diámetro de las microesferas, y la porosidad general cambia con la razón polímero-gelatina. Pueden construirse andamios poliméricos de formas diferentes, simplemente cambiando la geometría del molde.

Existen tres razones principalmente por las que la adición de una fase inorgánica en una matriz polimérica resulta interesante en un sustrato para la ingeniería de tejidos. En primer lugar la incorporación de esta segunda fase modifica el comportamiento mecánico del material, así como la integridad estructural del andamio. En segundo lugar, la bioactividad de polímero aumenta debido a la incorporación de una fase bioactiva. En tercer lugar, la introducción de la fase inorgánica para modificar de forma positiva del patrón de degradación del polímero. Algunos de los compuestos empleados para ingeniería tisular y los compuestos de refuerzo o bioactivos son los siguientes (Tabla 5):

Tabla 5. Interacciones entre biopolímeros y biomateriales en la fabricación de constructos tisulares.

Materiales compuestos para ingeniería tisular	
Matriz Polimérica	Compuesto en fase de refuerzo
PCL (Policaprolactona)	HA (Hidroxiapatita)
PLLA [Ácido Poli(L-láctico)]	HA (Hidroxiapatita)
PLA (Ácido Poliláctico)	Bioglass
Quitosano	TCP (fosfato de tricesilio), vidrio de fosfato de calcio.
PGA (Ácido Poliglicólico)	Apatita carbonatada.
PLLA [Ácido Poli(L-láctico)]	TCP (fosfato de tricesilio)
PDLA [Poli(D-lactida)]	Bioglass
PLLA [Ácido Poli(L-láctico)]	Nano-hidroxiapatita
Colágeno, PLLA [Ácido Poli(L-láctico)]	Nano-hidroxiapatita
PLA (Ácido Poliláctico) / PGA (Ácido Poliglicólico)	Nitrato del calcio tetrahidratado+aminohidrógeno fosfato.

La función de los andamios es la de dirigir el crecimiento celular, ya sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas en él. Para ello, el material debe proveer una adecuada adhesión celular, y en ciertos casos debe favorecer la migración celular. La estructura porosa le provee al implante dos funciones críticas. Primero, los canales del poro proveen puertos de entrada para la migración de células. Segundo, una disponibilidad de una máxima área para la interacción de numerosas células específicas.

2.15.3. CAPROLACTONA.

La Caprolactona (PCL) es un poliéster biodegradable usado continuamente para la elaboración de andamios, el cual puede ser utilizado en una amplia gama de aplicaciones médicas. Por otro lado, la Policaprolactona ha sido utilizada junto con el almidón para la fabricación de materiales compuestos con aplicaciones biomédicas. Entre otros trabajos que se han realizado empleando como base la Policaprolactona, tenemos:

- Ingeniería tisular usando andamios de Policaprolactona fabricado vía sintetización selectiva por láser, y
- Diseño, síntesis y propiedades de andamios de poliuretano y Policaprolactona para regeneración de meniscos.

La introducción de nanotecnología en la ciencia de los materiales ha dado la oportunidad de realzar las características de los andamios, mejorando las interacciones biológicas. Los andamios de polímeros biodegradables, se han fabricado con nanofibras o se han mezclado con nanomateriales para obtener muchas de las características deseadas. La Policaprolactona ha sido

electroespumada para obtener los andamios con un alto cociente del área-volumen de la porosidad y de la superficie así como semejanzas morfológicas a la matriz extracelular natural.

2.15.4. AGENTES OSTEOINDUCTORES.

La regeneración ósea supone un auténtico proceso regenerativo sobre el cual se están produciendo importantes avances. Esta reparación supone la organización de un sistema constituido por células capaces de proliferar y diferenciarse.

Los factores de crecimiento (FC), son moléculas polipeptídicas que sintetizan las células, cuya misión general es transmitir señales entre unas células y otras para modular su actividad. Los diferentes factores de crecimiento realizan su misión a determinadas concentraciones, mediando receptores específicos en las células. Las principales familias de FC (factores de crecimiento) se agrupan bajo los nombres TGF- β (*Transforming Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), NGF (*Nerve Growth Factor*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) e IGF (*Insulin Growth Factor*). Estas familias de FC constituyen un extenso número de tipos y subtipos de componentes implicados en la reparación ósea, aunque no todos con la misma intensidad e importancia. A todos ellos hay que añadir un grupo de agentes bioactivos con personalidad propia; las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), las cuales, aunque genéticamente pertenecen a la familia de los TGF- β , tienen una capacidad osteoinductiva ampliamente demostrada. La Tabla 6, resume los factores de crecimiento y las BMPs con capacidad osteoinductora.

Tabla 6. Agentes osteoinductores empleados en ingeniería tisular, para la proliferación en cultivos celulares.

Factor de Crecimiento	Nombre genérico	Acción biológica
TGF- β	Factor de crecimiento	Estimula/inhibe la reparación ósea
IGF	Factor de crecimiento	Incrementa la densidad ósea
FGF	Factor de crecimiento	Actúa en fases finales de linaje osteogénico
PDGF	Factor de crecimiento	Incrementa la Osteoinducción de MOD
BMP-2	BMP-2A	Morfogénesis de hueso y cartílago
BMP-3	Osteogenina	Osteogénesis
BMP-3B	GDF-10	Huesos craneofaciales
BMP-4	BMP-2B	Morfogénesis de huesos y cartílagos
BMP-5		Morfogénesis de hueso
BMP-6		Hipertrofia de cartílago
BMP-7	Proteína osteogénica 1	Diferenciación ósea
BMP: proteína morfogenética de hueso (<i>Bone morphogenetic protein</i>); FGF: factor de crecimiento fibroblástico (<i>Fibroblast growth factor</i>); GDF: factor de crecimiento y diferenciación (<i>Growth differentiation factor</i>); IGF: factor de crecimiento insulínico (<i>Insulin like growth factor</i>); PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet derivated growth factor</i>); TGF- β : factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>); MOD: matriz ósea desmineralizada.		

Otro hecho interesante, aportado recientemente, es la posibilidad de un cierto sinergismo entre TGF- β y BMPs; los primeros serían ciertamente necesarios, sobre todo como mitogénicos y puede que también como inductores de las células madre mesenquimales, mientras que en las últimas etapas de la osteogénesis necesitarían la acción de las BMPs.

2.15.5. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO (BMP).

Éste grupo de proteínas que pertenecen a la familia de los TGF- β está directamente relacionado con los fenómenos de osteogénesis y condrogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los efectos de las BMPs han sido estudiados de manera aislada, sus efectos se pueden agrupar atendiendo a los resultados obtenidos en 4 tipos de estudios: a) osteogénesis *in vivo*; b) condrogénesis *in vitro*; c) genéticos, y d) odontológicos. Algunos estudios han demostrado que las BMPs inducen la diferenciación de células mesenquimales en condrocitos *in vitro*; también estudios han revelado que la acción de BMPs en osteogénesis, están directamente relacionados con la inducción de la formación de hueso *in vivo* para el tratamiento de defectos óseos.

La proteína osteogénica-1, también conocida como proteína morfogénica-7 (BMP-7), muestra efectos específicos en diversos campos de aplicación, tales como, la diferenciación condroblástica y osteoblástica, procesos oncológicos, desarrollo del SNC, odontología y embriogénesis.

En cultivos celulares, las BMP-7, las BMP-2 y los TGF- β favorecen la proliferación celular y la síntesis de colágeno, además de que la BMP-7 por si sola es capaz de activar la estimulación de los marcadores del fenotipo osteoblástico. Promueve la proliferación y estimulación de osteoblastos *in vitro*, induce la diferenciación condroblástica y osteoblástica de células osteoprogenitoras, induce la formación de hueso nuevo cuando se implanta con un adecuado transportador pudiendo consolidar totalmente defectos óseos, considerándose todo esto, el carácter osteoinductivos de las proteínas morfogénicas óseas, principalmente las BMP-7 y BMP-2.

2.15.6. EFECTO DE LAS VITAMINAS D Y K1 COMO AGENTES OSTEOINDUCTORES.

Los osteoblastos son células responsables de la formación y organización de la matriz extracelular del hueso y su posterior mineralización. El principal producto de síntesis osteoblástica es el colágeno tipo I, así como su importante participación en la síntesis de proteínas como la osteocalcina y las proteínas Gla óseas.

La osteocalcina como proteína ósea de síntesis osteoblástica, puede estimularse tanto en producción y en aumento de concentración para la estimulación ósea en defectos óseos para su regeneración, siendo utilizada en cultivos celulares y su colocación sobre andamios biológicos degradables. En éste caso la vitamina D estimula la producción de osteocalcina y proteína Gla ósea por parte de los osteoblastos, además de verse aumentada su concentración por medio del empleo de co-factores como las vitaminas K1, B y C.

2.16. DEFECTOS ÓSEOS CRANEOFACIALES.

La ingeniería de tejidos combinada con el uso de células madre y con la terapia génica ofrece una poderosa herramienta biológica, química y física para solucionar los problemas clínicos que involucran enfermedad periodontal, caries, tumores, trauma y anomalías dentomaxilofaciales.

La región craneofacial representa un gran reto desde el punto de vista reconstructivo. Anatómicamente está relacionada con cavidades no estériles como las fosas nasales y cavidad oral, con potencial de contacto por la cercanía con áreas sumamente vitales como el cerebro. Probablemente muy poco hubiera evolucionado la cirugía craneofacial de no haber sido por Jean

Paul Tessier, que en 1967, con sus visionarios estudios, preconizó la utilización de injertos autólogos de hueso fresco en grandes cantidades para cubrir extensas brechas óseas en la corrección de *disostosis craneofaciales*.

Las anomalías craneofaciales son frecuentes en la población medico-odontológica. Estas patologías pueden afectar severamente la apariencia, función y aspecto psicológico del paciente. Las estrategias que utiliza la bioingeniería para crear nuevos tejidos y órganos se fundamenta en la combinación de materiales artificiales con moléculas bioactivas que inducen la formación tisular o el crecimiento de células *in vivo* e *in vitro*. Las moléculas bioactivas usadas más frecuentemente son los factores de crecimiento o proteínas de matriz extracelular. Esta acción puede ser realizada mediante diversos procedimientos, tales como:

- *Estrategias conductivas*, mediante la utilización de materiales de manera pasiva como las membranas o armazones celulares,
- *Estrategias inductivas*, mediante la colocación de células o factores de proteínas morfogénicas óseas (BMPs), que se activan en el sitio del defecto induciendo la formación de los tejidos, y
- *Estrategias de transplante celular*, por medio del transplante directo de células cultivadas y diferenciadas en el laboratorio y la posterior colocación en armazones inductores, que sirven como moldes y generan tejido para implantarlo posteriormente en el paciente.

Los materiales para biomodelos juegan un papel importante en la estabilidad mecánica, no sólo de células individuales, sino también en la construcción completa del tejido antes de la síntesis de la nueva matriz extracelular. Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias para reemplazar los tejidos afectados, teniendo en cuenta la forma en como el cuerpo realiza normalmente los procesos de ingería de tejidos:

- *Modelo endógeno*, creando hueso a partir del conocimiento de procesos naturales,
- *Estrategia de recombinación con bases protésicas*: el mayor esfuerzo realizado en esta estrategia se ha basado en la colocación de factores de crecimiento exógenos, para aumentar la inducción de hueso (inducción de formación ósea y cicatrización de fracturas) o la cicatrización de un tejido. Entre la numerosas proteínas osteogénicas y angiogénicas que han sido investigadas están, el factor de crecimiento transformante β s, las BMPs, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-1, FGF-2), factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y hormonas de crecimiento (GH).

Los procedimientos inductivos activan células cercanas al tejido por medio de señales específicas. Estos procedimientos se han fortalecido gracias al descubrimiento de los factores de crecimiento osteogénicos y angiogénicos. Las proteínas de matriz extracelular (MEC), también inducen la neoformación ósea cuando son colocadas en el sitio de defecto. Estas proteínas también tienen la capacidad de dirigir la función de las células residentes y por lo tanto pueden promover la regeneración tisular. Por esta razón uno de los objetivos de la bioingeniería es la de diseñar nuevos sistemas de liberación controlada. Shea y colaboradores demostraron que las células incorporan el DNA liberado y producen cantidades suficientes de proteínas inductivas que promueven la neoformación de tejidos.

- *Estrategia basada en genes*: el objetivo es iniciar la cascada de expresión génica que permita la expresión celular, la diferenciación, la producción de matriz y el ensamblaje ordenado de estructuras para la regeneración de tejidos, y
- *Estrategia basada en células*: cuando un tejido es incapaz de cicatrizar un defecto, o cuando un tejido u órgano debe ser diseñado *in vitro*, se necesita de bloques de células

vivas para sus requerimientos. Para que una célula sea funcional en la ingeniería tisular craneofacial, debe seguir ciertos criterios, tales como ser capaz de formar múltiples tejidos, no ser inmunogénica, ser de rápida y fácil expansión en tejidos, y ser accesible con mínima morbilidad para el sitio donante. Aunque las células madre embrionarias cumplen con la mayoría de estos criterios, las controversias éticas sobre la obtención de las mismas, han llevado al estudio e investigación de nuevas fuentes de obtención de células madre. La nueva y más reciente fuente de obtención de células madre se encuentra en las células de tejido pulpar de piezas dentales, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse a linajes osteogénicos, condrogénicos y neurogénicos.

2.17. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS MANTENIDAS EN CULTIVOS ¹⁵.

La determinación de la viabilidad de las células mantenidas en cultivo constituye un requisito importante antes de que éstas células puedan ser cultivadas *in vivo*. En éste sentido, se han descrito diversos métodos y técnicas útiles para la evaluación de la viabilidad de las células, los cuales se pueden utilizar tanto para células sometidas a pases sucesivos como para evaluar células cultivadas en presencia de un compuesto más o menos tóxico (ensayos toxicológicos). A continuación se exponen brevemente las bases de las principales técnicas para la evaluación de la viabilidad celular.

Detección de alteraciones de la permeabilidad celular.

En primer lugar, los métodos basados en detección de alteraciones de la permeabilidad de la membrana son probablemente más numerosos y utilizados, pudiendo distinguir dentro de estos fundamentos dos variantes:

- Métodos basados en el empleo de colorantes, y
- Métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas fundamentalmente enzimas o ácidos nucleicos, en el medio extracelular.

Los métodos que emplean colorantes habitualmente consisten en la utilización de un colorante que, en función de sus características, es capaz de penetrar y colorear el interior de las células vivas o bien de las células muertas.

La proporción relativa de células coloreadas o no, refleja el número exacto de células vivas o muertas y, en consecuencia, la viabilidad del conjunto celular. El conteo de las diferentes poblaciones celulares puede ser efectuado por métodos microscópicos, citometría de flujo, espectrofotometría o espectrofluometría automatizada (Slater 2001). Con frecuencia, se han utilizado colorantes orgánicos como el azul de tripán o el yoduro de propidio, los cuales son capaces de teñir y colorear únicamente las células muertas, siendo expulsados activamente del citoplasma celular cuando las células están vivas. Por este motivo, este tipo de ensayos se denominan con frecuencia ensayos de exclusión de colorantes orgánicos.

Por otra parte, los métodos basados en la medición de liberación de moléculas intercelulares al medio de cultivo, están fundamentados en alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bajo la acción de determinados tóxicos o bien por envejecimiento celular espontáneo. Dichos métodos comprenden dos tipos de ensayos, uno enzimático y el otro radioactivo, siendo mas utilizados los primeros. Uno de los ensayos enzimáticos más comunes es la determinación del enzima citosólico lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo, enzima que es liberada al medio extracelular únicamente cuando la membrana plasmática ha sido gravemente alterada. Otras moléculas de interés al evaluar la viabilidad celular son las enzimas mitocondriales o incluso el ADN nuclear. Niveles elevados de cualquiera de éstas moléculas en el

medio de cultivo son claros indicativos de que un porcentaje significativo de células han sido destruidas y, por tanto, de que la viabilidad celular es baja (Ikegami et al., 2007; Park et al., 2008; Posadas et al., 2007).

Uno de los métodos más utilizados en biología y medicina es el de la determinación de la viabilidad celular mediante la prueba de bromuro de 3-(4-5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT). Este compuesto, de color amarillento, es capaz de reducirse y adquirir color morado por acción de las enzimas intramitocondriales de las células vivas. Por éste motivo, la adición de MTT al medio de cultivo y la posterior cuantificación colorimétrica del producto nos pueden dar una idea bastante fiable del número de células vivas y muertas que existen en el cultivo celular (Brink et al., 2008; Meric et al., 2008).

Finalmente los métodos radioactivos suelen basarse en la medida de la liberación del Cr^{51} , isótopo radiactivo que se une de manera no covalente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. Las células muertas liberan el Cr^{51} , en el medio extracelular, el cual puede ser cuantificado por un contador gamma (Rinaldi et al., 1998).

Microanálisis por energía dispersiva de rayos X.

El microanálisis por energía dispersa de rayos X (EDS o EDX) o microscopía analítica es una técnica que, utilizando un haz de electrones, permite estudiar la composición química de la muestra de forma simultánea a su observación microscópica. A éste respecto, existe un amplio número de técnicas analíticas que permiten estimar el contenido de los elementos inorgánicos en especímenes biológicos, incluyendo, por ejemplo, la espectrometría por absorción atómica o fotometría de flama.

2.18. MICROSCOPÍA.

2.18.1. Microscopía Confocal.

La microscopía laser Confocal es una técnica de observación microscópica que logra grandes resultados en el área biomédica, ya que permite el obtener “secciones ópticas” de la muestra con lo que es posible realizar un estudio tridimensional de la misma (Figura 24).

El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz refleja o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso procedente del plano focal, eliminándose los haces provenientes de planos inferiores y superiores (Boyde, 1988).

La utilización de un láser como fuente de luz permite enfocar la iluminación en un punto muy pequeño de la muestra y con gran intensidad, con lo cual al realizarse el barrido de la imagen se recoja la información detallada de cada zona estudiada. El sistema de barrido puede ser de dos tipos:

- Que el láser se desplace por la muestra (beam scanning),
- O bien que la muestra sea la que se desplace y el haz se mantenga inmóvil (stage scanning).

En esta investigación, el primer sistema está indicado para el análisis de resultados ya que la velocidad de barrido es mayor y por lo tanto la de obtención de imágenes y debido a que el campo de barrido coincide con el campo de observación del objetivo, se emplea paralelamente una técnica de fluorescencia para el aporte detallado y específico de los componentes celulares presentes en las muestras.

La técnica de microscopía confocal giratoria (Tandem Scanning Microscope TSM) empleada para la obtención de resultados utiliza un disco giratorio con cientos de aperturas agrupadas en

pares lo que permite barrer la muestra con múltiples puntos de luz simultáneamente, permitiendo también la utilización de filtros para microscopia de fluorescencia.

Las principales ventajas de la microscopia confocal son:

- Mayor resolución pudiendo obtener resoluciones de $0.14\mu\text{m}$ en horizontal y $0.23\mu\text{m}$ en vertical a una longitud de onda de 442 nm ,
- Mayor contraste debido a que se elimina la luz procedente de zonas fuera de foco,
- Posibilidad de realizar secciones ópticas variando el plano de enfoque con lo que es posible tomar imágenes a diferente profundidad para obtener información tridimensional de la muestra,
- Análisis de imágenes al obtenerse de forma electrónica pudiendo digitalizarlas y aplicar sobre ellas otras técnicas de análisis como realce de imágenes, para mejorar su calidad, combinación de imágenes, para comparar campos; entre otras, y
- Reconstrucción 3D a partir de las secciones ópticas con lo que es posible visualizar detenida y detalladamente las estructuras presentes en la muestra.

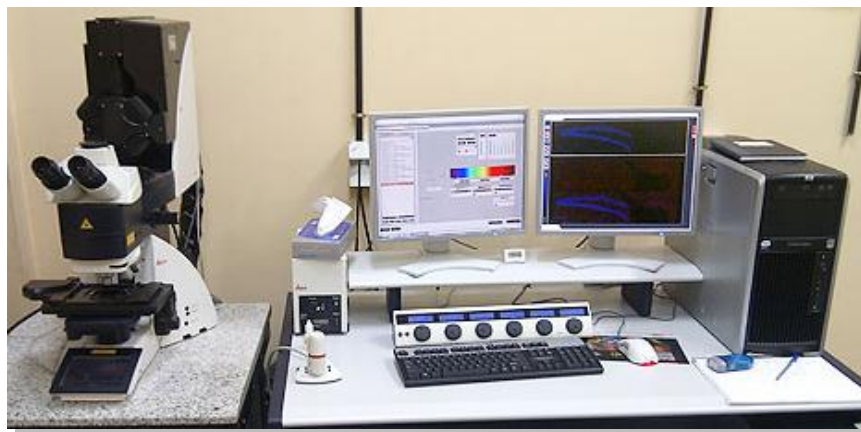


Figura 9. Microscopio Confocal giratorio.

© Leyca microsystems

Glosario **CAPÍTULO 2**

Alveolo: División o compartimiento anatómico donde se encuentra alojada la raíz dental, con la cual conforma la articulación hueso-diente.

Ameloblasto: Células propias del esmalte encargadas de su formación y organización estructural.

Antígeno STRO-1: Antígeno utilizado para la identificación y tipificación de las células madre mesenquimales.

Aparato estomatognático: Conjunto de órganos y tejidos craneofaciales duros y blandos que permiten la deglución, fonación y respiración.

Apexogénesis: Proceso terapéutico medicamentoso que permite la estimulación y crecimiento o regeneración adicional de las paredes radiculares.

Articulación Temporomandibular (ATM): Articulación doble localizada en la región lateral de la cara, conformada por la relación entre el hueso temporal y la mandíbula.

Blastocisto: Fase primitiva del desarrollo embrionario, formada por un aglomerado celular posterior a los 3 o 4 días de fecundación.

Carcinogenicidad: Capacidad de los agentes físicos y/o ambientales de estimular y producir cáncer.

Cementoblasto: Células propias del cemento dental, responsables de su formación y maduración.

Citotoxicidad: Capacidad nociva que presentan ciertas sustancias, las cuales pueden tener un efecto destructor sobre las células de los tejidos.

Cristales de hidroxiapatita: Formaciones prismáticas hexagonales de naturaleza mineral localizados en la matriz ósea.

Dentinogénesis: Proceso embrionario de desarrollo morfológico y estructural de la dentina por los odontoblastos.

Disostosis craneofacial: Enfermedad de origen genético que se caracteriza por malformaciones del cráneo y de la cara. Se transmite de padres a hijos según un patrón de herencia autosómico dominante.

Endostio: Tejido conjuntivo vascular y nervioso que reviste y nutre la región interna de la cavidad medular del hueso.

Epífisis: Extremos o superficies articulares del hueso.

Estados Quiescentes: Estado de reposo celular antes de que la misma pase o inicie su periodo de división o proliferación.

Genotoxicidad: Sustancias o agentes que pueden actuar de forma nociva sobre los genes o bien actuar alterando el proceso de replicación.

Gónfosis: Tipo de articulación fibrosa, mediante la cual interactúan los huesos maxilar o mandíbula con las raíces dentales.

Homeostasis: Capacidad de un organismo vivo de mantener una condición estable y constante.

Injerto Autólogo: Injerto o trasplante de un tejido propio o a otro paciente.

Injerto heterólogo: Injerto o trasplante de un tejido proveniente de otra especie.

Liofilizar: Técnica de desecado o deshidratación por frío.

Metáfisis: Zona intermedia o de transición de los huesos largos localizados entre su cuerpo y superficies articulares.

CONTINUACIÓN. Glosario **CAPÍTULO 2**

Mutagenicidad: Producción de alteraciones del material genético celular (genes, cromosomas) que da lugar a una modificación permanente de la constitución hereditaria.

Odontoblasto: Células de tejido conectivo altamente diferenciadas características del sistema o complejo pulpodentinario.

Osteoides: Conjunto o agrupación conformada por los osteoblastos, osteocitos y la matriz orgánica no mineralizada, responsable de la formación y maduración del hueso.

Periostio: Membrana de tejido conectivo de naturaleza vascular, fibrosa y resistente que recubre la diáfisis o cuerpo del hueso, por su región externa.

Pirogenicidad: Propiedad que tiene una sustancia, que al inyectarse en el organismo, causa un aumento o elevación de la temperatura.

Proteoglicanos: Grupo de polisacáridos propios de los tejidos animales de origen mesodérmico, teniendo acción desinflamatoria y aceleran los procesos de cicatrización.

Retículo Estrellado: Capa celular, localizadas en el germen dentario, encargadas de la formación de la pulpa dental durante el estadio de casquete en el desarrollo embrionario.

Scaffold (andamio): Estructuras tridimensionales o moldes empleados para la colocación en tejidos de células encaminadas a la regeneración terapéutica.

CAPÍTULO 3
**MATERIALES Y
METODOLOGÍA**

3. METODOLOGÍA.

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental *in vitro*, realizado en el Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California y el Laboratorio de Ciencias Básicas e Ingeniería Tisular de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

La figura 10 esquematiza las etapas de trabajo experimental las cuales van desde la obtención y procesamiento de la muestra, el desarrollo del cultivo celular y las técnicas de identificación celular a partir de las cuales se culminó con la diferenciación de las células obtenidas en los cultivos e identificadas mediante marcadores específicos.

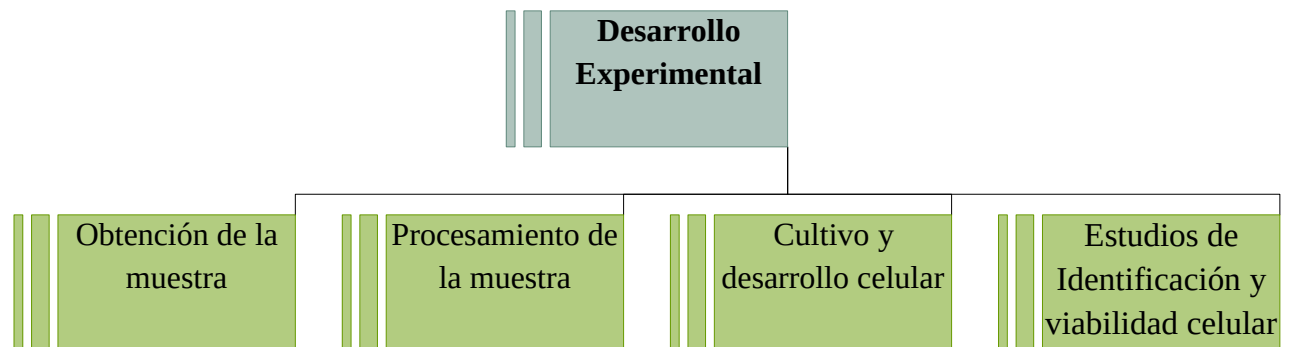


Figura10. Desarrollo experimental del estudio.

3.2.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.

Inicialmente se lleva a cabo la identificación de pacientes potenciales, específicamente para el aislamiento de células pulpares; para cumplir con esto se toman en cuenta los siguientes criterios de inclusión en cuanto al tipo de muestra y su procesamiento previo y posterior a la extracción.

Especificaciones de la muestra.

En dientes temporales, así como en dientes permanentes, las piezas dentarias (muestra) deben seguir las siguientes especificaciones clínicas y anatómicas (como se muestran en Figura 11 desde el punto de vista radiográfico y clínico):

- Pieza dentaria completamente formada: corona y cámara pulpar, así como la raíz o raíces y conducto radicular,
- Estar completamente libre de *caries*, imperfecciones estructurales y funcionales que pongan en riesgo la integridad pulpar,
- Estar libre de *enfermedad periodontal* en cualquiera de sus fases y,
- Estar libre de *abscesos periodontales o apicales*.

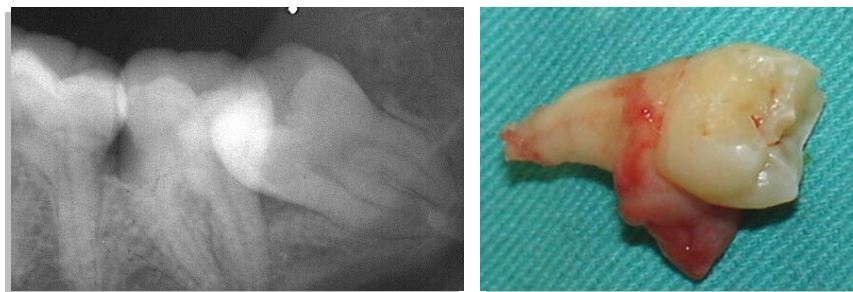


Figura 11. Criterio de inclusión básico de la muestra.

Proceso de obtención de la muestra dental.

Para la obtención de la muestra dental, es necesario seguir el protocolo de atención clínica establecido para el trabajo en la práctica odontológica dentro de las clínicas de la Facultad de Odontología, referente a la forma de trabajo, manejo y control de infecciones. Para el proceso de obtención, se seguirán los siguientes puntos:

- Historia clínica completa,
- Serie radiográfica completa, radiografías apicales por regiones y radiografía de trabajo,
- *Material de trabajo.* Incluye: anestesia tópica, benzocaina tópica al 20%; anestesia dental inyectable, cartucho con clorhidrato de lidocaína 36 mg, epinefrina 1 x 200,000, 0.018 mg.,
- Instrumental de trabajo. Elevadores y fórceps, dependiendo cada uno de ellos de la zona a tratar y el diente a realizar la exodoncia,
- *Técnica de anestesia.* Dependiendo de la zona a tratar, se elige la técnica ideal para preparar el campo de trabajo, y
- *Técnica de exodoncia.* De igual forma, dependiendo de la zona a tratar, se elige la técnica a utilizar.

Criterios especiales previos a la extracción dentaria.

Un factor importante para el mantenimiento de la integridad pulpar es el evitar contaminaciones durante su manejo y sobre un punto clave es el soporte higiénico del paciente antes de la extracción. Previo a la extracción de la pieza muestra, es necesario un tratamiento profiláctico en el paciente, el cual incluye la *fase periodontal inicial*, eliminación de sarro en la zona y profilaxis; así como proporcionar al paciente un enjuague de 10 ml con *Clorhexidina* al 0.12%, que actúa como antiséptico de acción bactericida y fungicida.

En la figura 12 se muestran la zona de realización de la técnica de exodoncia correspondiente a un tercer molar inferior izquierdo previa a la cirugía bucal así como también la pieza dentaria una vez realizada la extirpación y obtención de la muestra.

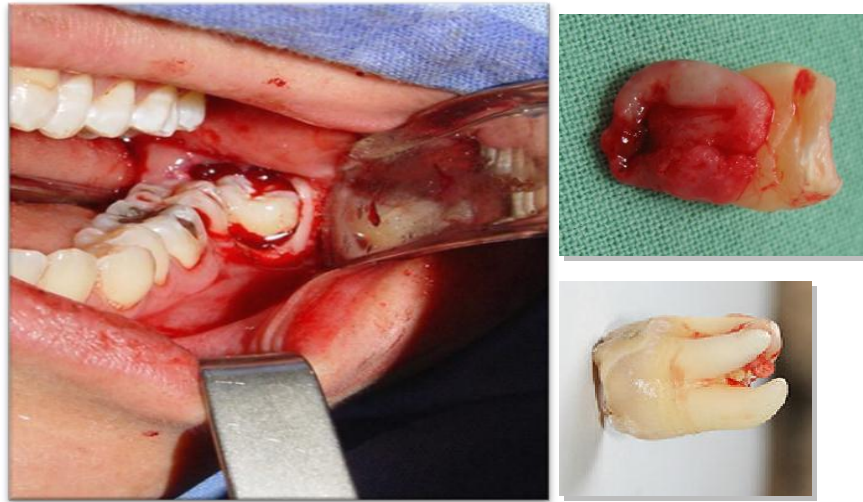


Figura 12. Técnica quirúrgica para la obtención de la muestra o pieza dental.

3.2.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Una vez realizada la extracción, se prosigue con el proceso inicial de conservación de la muestra. Para esto la pieza dentaria extraída se coloca en un medio de conservación inicial, transporte y almacenamiento.

Para almacenar y transportar la pieza extraída se utiliza un contenedor plástico, cilíndrico, estéril y de sellado hermético; utilizándose un contenedor por pieza dentaria.

Para la conservación de la muestra, es necesario utilizar una solución enriquecida, compuesta por suero fisiológico, antibiótico y antimicótico, como se muestra en la Figura 13.

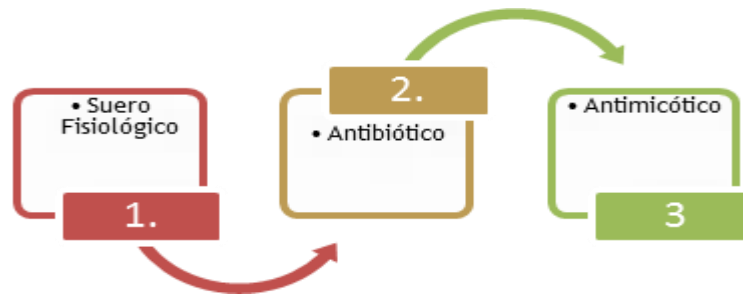


Figura 13. Proceso de conservación inicial de la muestra post-extracción.

En este caso la solución de antibiótico y antimicótico utilizada es Sigma Chemical Co, compuesta por 500 U/mL de Penicilina G, 500 µg/ml de Estreptomicina y 1.25 µg/mL de Anfotericina B.

Se coloca el diente en el contenedor plástico con suero fisiológico (solución salina al 0.9%) y 1ml de la solución de antibiótico y antimicótico (Figura 14). La conservación se realiza a una temperatura de 4 a 5 °C, teniendo como periodo inicial de conservación post extracción de 4 a 6 horas, para posteriormente iniciar con el proceso de obtención de la muestra pulpar.

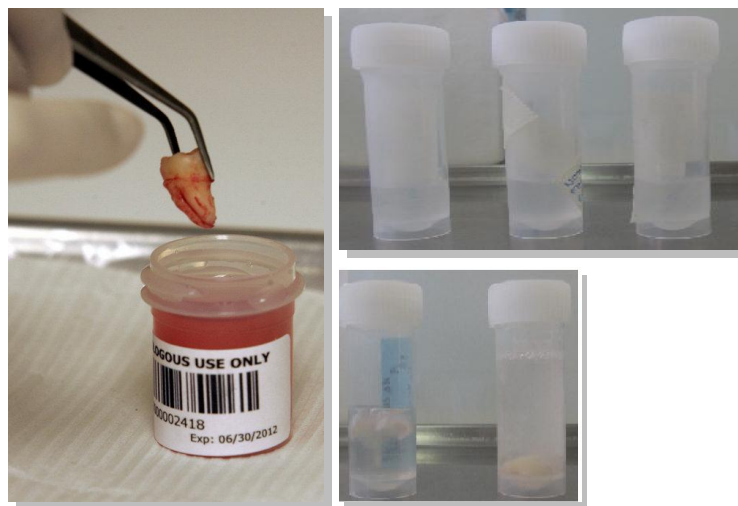


Figura 14. Proceso de almacenamiento de la muestra o pieza dental.

Obtención de la muestra de tejido pulpar.

Después de procesada la muestra, se procede a la extirpación del tejido pulpar. Para la obtención de la muestra pulpar, es necesario, tener el mayor cuidado tanto para el acceso a la cámara pulpar y/o conducto radicular, así como en la extirpación de la pulpa. El proceso de extirpación y explante de la pulpa dental se realiza bajo la campana de flujo laminar, con la finalidad de mantener el medio libre de contaminaciones, teniendo en cuenta esta consideración se prosigue de la siguiente manera:

- Tomar la pieza dentaria cuidadosamente, por medio de manejo manual o utilización de pinzas hemostáticas,
- Extensión del foramen apical, utilizando la pieza de mano de alta velocidad, refrigerada con agua, dicho acceso se realiza por medio de una fresa de carburo “bola” numero 5,
- Una vez realizada la ampliación del foramen apical, por medio de la utilización de una lima endodóntica de 25mm calibre 10 o 15 estéril y la ayuda de una cucharilla para dentina igualmente esterilizada, se realiza la extirpación de la pulpa, recargando sobre las paredes del conducto y las paredes de la cámara pulpar, con la finalidad de proteger al máximo la integridad del tejido pulpar.

Procesamiento del tejido pulpar.

Una vez extirpado el tejido pulpar, la muestra obtenida se fragmenta en pequeños segmentos de aproximadamente 1 mm², para ello con ayuda de uno de los extremos de la cucharilla de dentina, se fija el tejido pulpar y por medio de una hoja de bisturí se realizan los explantes cuidadosamente y de manera uniforme para posteriormente seguir con el cultivo de las muestras obtenidas (Figura 15).



Figura 15. Proceso de obtención y almacenamiento del tejido pulpar

3.2.3. CULTIVO Y DESARROLLO CELULAR.

Los explantes pulpaes obtenidos y fragmentados se colocan en cajas de cultivo tipo Falcom con filtro. Se colocan de 12 a 16 explantes pulpaes de 1 mm² por caja cuidadosamente con ayuda de la cucharilla de dentina, se introducen los explantes en el interior de la caja Falcom sin tocar los bordes de la misma y posteriormente sembrándolos en el interior de la caja de forma cuadrangular con espacio suficiente entre cada uno de los explantes.

Una vez realizada la siembra, los explantes se dejan en fijación en la caja por 4 a 5 minutos para que estos se adhieran a la superficie y posteriormente se coloca el medio de cultivo suplementado (Figuras 16, 17, 18)

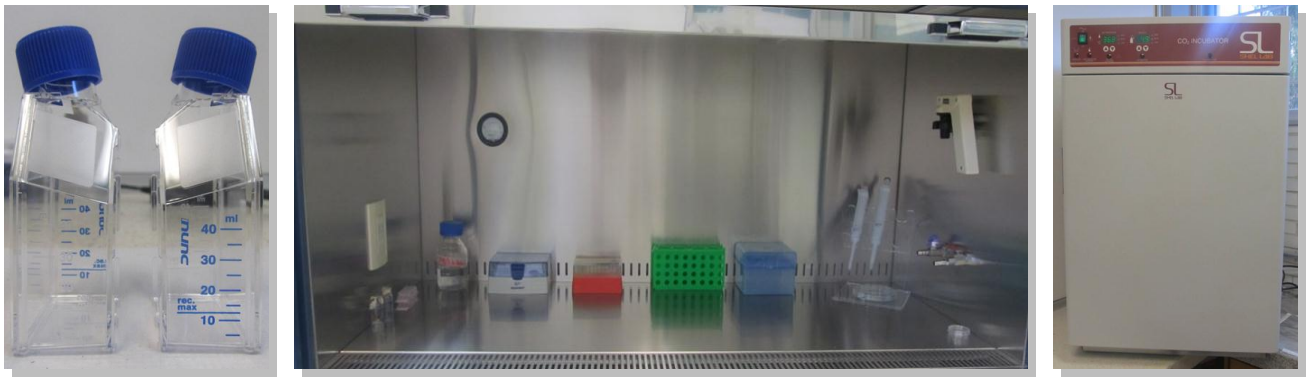


Figura 16. Cajas tipo Falcom para incubación en atmósfera de CO₂. Material adicional y zona de trabajo en campana de flujo laminar, así como incubadora de CO₂, para mantenimiento del cultivo.



Figura 17. Preparación del medio de cultivo enriquecido con antibiótico, antimicótico y factores de crecimiento para la realización del sembrado de los explantes pulpares.

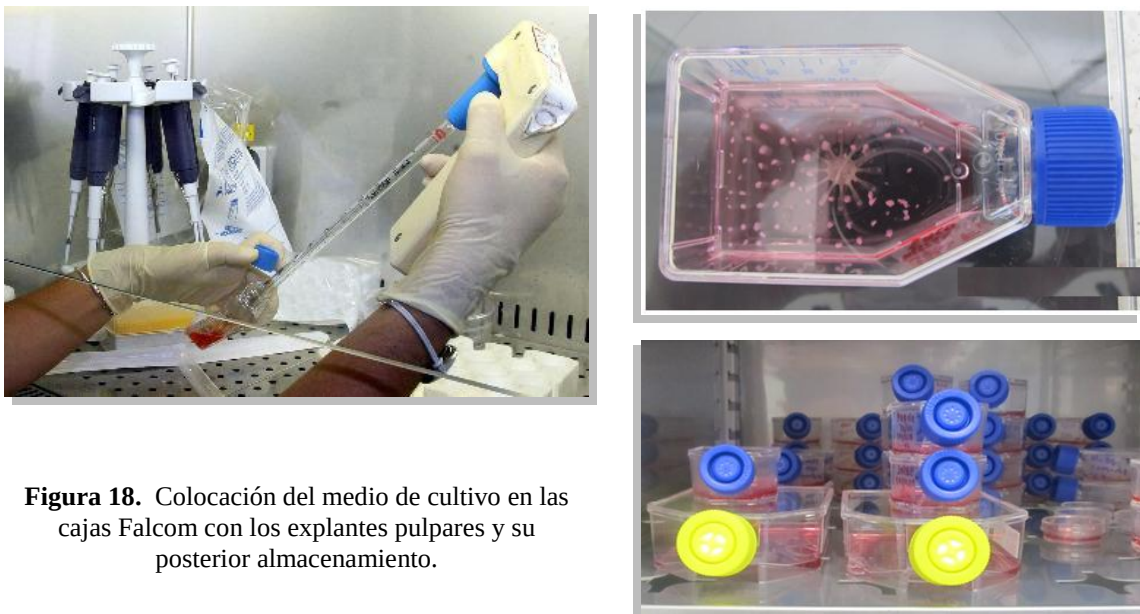


Figura 18. Colocación del medio de cultivo en las cajas Falcom con los explantes pulpares y su posterior almacenamiento.

3.2.3.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.

Incubación y procesamiento del cultivo celular.

Los medios de cultivos sembrados, se incuban en una atmosfera de CO₂ del 5%, a una temperatura de 37°C durante 30 días.

Posterior a la siembra, durante el tiempo de incubación, el medio de cultivo suplementado es reemplazado 2 veces por semana, dicho procedimiento se realiza en la campana de flujo laminar para evitar nuevamente contaminaciones del medio, se retira en su totalidad el medio de cultivo con la ayuda de una pipeta estéril cuidando que la misma no toque el cuello de la caja; el explante de tejido pulpar se deja de 4 a 5 minutos en la caja para que se adhiera a la misma y se coloca nuevamente 5 mL del medio ya descrito anteriormente; y así de igual forma se procede en cada uno de los cambios de medio durante el proceso de incubación (Figura 19).



Figura 19. Proceso de almacenamiento e incubación en atmósfera de CO₂ de los cultivos celulares

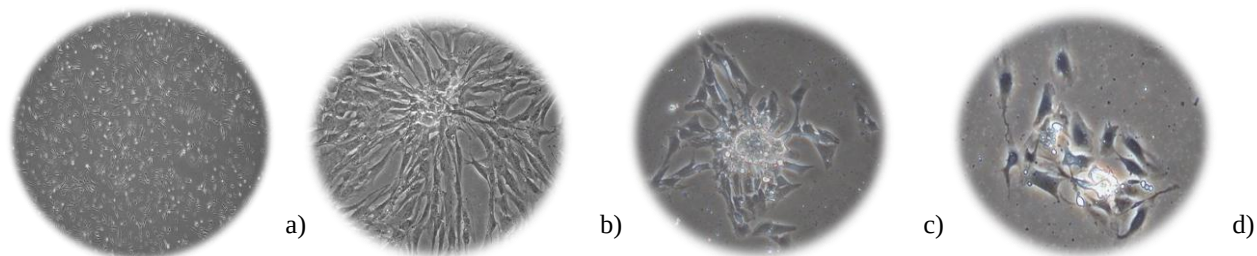


Figura 20. Valoración de la confluencia de los cultivos empleando microscopia óptica, con observaciones a los a) 3, b) 5, c) y d) 11 días de la siembra

3.3. IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR.

3.3.1. INMUNOMARCAJE E INMUNOFLUORESCENCIA

Las técnicas de inmunomarcaje e inmunofluorescencia, pertenecen a un conjunto de métodos de marcate e identificación de complejos celulares y estructurales basado en reacciones inmunoenzimáticas, utilizando *anticuerpos monoclonales* y *policlonales* que reaccionan con antígenos específicos (membranales) siendo expresada dicha reacción mediante el empleo de agentes colorantes o fluoróforos que emiten un efecto fluorescente visible y detectable mediante el empleo de técnicas microscópicas de fluorescencia.

Existen dos grandes grupos de técnicas de inmunohistoquímica, una de acuerdo al tipo de reacción antígeno-anticuerpo, y la otra, de acuerdo al número de anticuerpos empleados para el estudio.

3.3.2. TÉCNICAS DE INMUNOMARCAJE SEGÚN LA REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO.

1. Técnica directa:

El marcador o anticuerpo primario se acopla de forma directa al antígeno.

2. Técnica indirecta:

El marcador o anticuerpo primario para acoplarse al antígeno requiere de la presencia de un anticuerpo secundario.

3. Técnica de Amplificación:

El marcador o anticuerpo primario se une a un agente amplificador (medio de detección) el cual le permite reaccionar con el antígeno (agente colorante o fluoróforo).

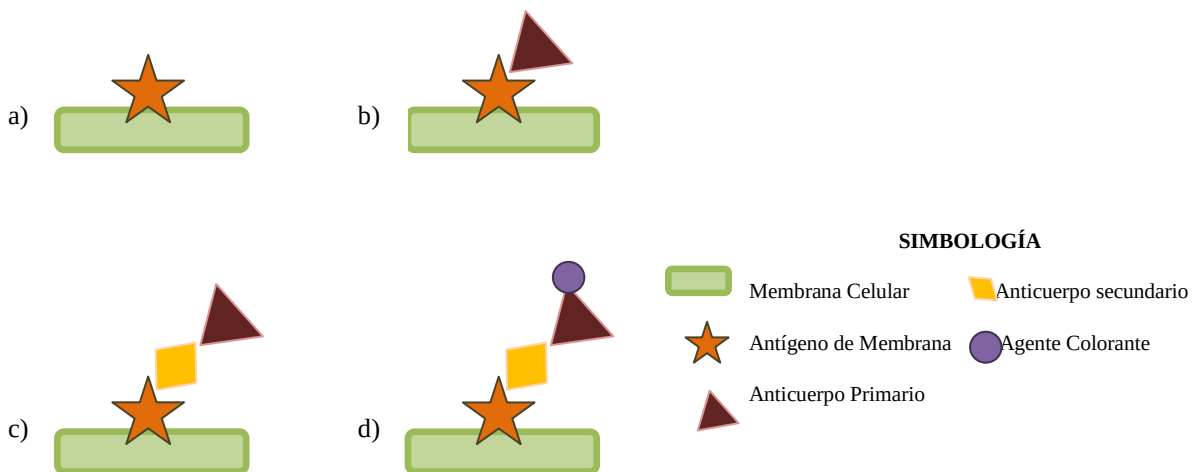


Figura 21. Técnicas de marcaje según la reacción antígeno-anticuerpo, donde en la imagen “a” se representa el antígeno sobre la superficie de membrana, en la imagen “b” se presenta la reacción directa del anticuerpo primario sobre el antígeno de membrana, en la imagen “c” se presenta la reacción del anticuerpo con el antígeno de membrana por la interacción con un anticuerpo secundario y en la imagen “d” se presenta la amplificación de la reacción entre los anticuerpo primario y secundario con el anticuerpo de membrana mediante la reacción con un agente colorante.

3.3.3. TÉCNICAS DE INMUNOMARCAJE SEGÚN EL NÚMERO DE ANTICUERPOS EMPLEADOS.

1. Inmunomarcaje Doble:

Marcaje o reconocimiento específico de estructuras u organelos celulares por medio del empleo de anticuerpos y colorantes mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Estos anticuerpos se unen directa o indirectamente a moléculas fluorescentes o enzimas que reconocen a las estructuras marcadas.

2. Inmunomarcaje Triple

Además del empleo de anticuerpos de reconocimiento de estructuras celulares y moléculas fluorescentes, se emplea también un anticuerpo específico de reconocimiento e identificación celular. Ejemplo: Marcaje positivo para células madre.

3.4. CONSIDERACIONES PARA EL DESARROLLO DE LA TÉCNICA.

Para el desarrollo exitoso de la técnica es indispensable tomar en cuenta aspectos generales tanto de las muestras empleadas, así como también de los diversos agentes empleados para la expresión y marcaje.

Muestras de análisis.

Cultivos celulares sembrados en pocillos individuales con su respectivo cubreobjetos, como lo empleado para este estudio, también pueden ser utilizados los centrifugados celulares, frotis de tejidos o cortes histológicos preparados.

Agentes Fijadores.

Tienen como objetivo inmovilizar el antígeno sin modificarlo, manteniendo la estructura celular y permitiendo la fijación del anticuerpo.

Ejemplos: Formalina Neutra (cultivos) no altera estructura del antígeno. Metanol, acetona y glutaraldehído, puede modificar al antígeno o ser tóxico para la muestra.

Agentes Permeabilizadores.

Tienen como objetivo hacer detectable a los antígenos membranales para los anticuerpos (primarios y secundarios) empleados en la técnica de inmunomarcaje.

También es empleado como medio detergente en dilución para proteínas membranales estructurales.

Ejemplo: Tritón X-100 (polioxi-etilen-p-t-octilfenol) el cual es un detergente iónico fuerte capaz de modificar la estructura de las proteínas incrustadas en la membrana celular, pero sin alterar la estructura de la misma (bicapa lipídica).

Agentes Bloqueadores.

Tienen como objetivo atraer y retener a los marcadores o anticuerpos a los receptores de superficie seroalbéminas presentes en las membranas celulares, permitiendo la reacción inmuno-enzimática o antígeno-anticuerpo.

Ejemplo: Albúmina Sérica Bovina

Marcadores Específicos.

Anticuerpos Monoclonales y Policlonales.

Utilizados para la detección de antígenos específicos (policlonal) el cual en una técnica indirecta se une a un anticuerpo secundario (monoclonal) para poder reaccionar con el antígeno

específico, reacción amplificada por medio de agentes colorante (fluoróforos) permitiendo detectarse dicha reacción por una técnica microscópica de fluorescencia.

Ejemplos: mAb (*monoclonal Antibody o Anticuerpo monoclonal*): Stro-1; pAb (*polyclonal Antibody o anticuerpo policlonal*): ALEXA Flúor 594, Cy5.

3.5. TÉCNICA DE INMUNOMARCAJE

Desarrollo de la técnica.

Para realizar la inmunohistoquímica y detectar el marcador específico para células madre Stro-1 y la identificación de los componentes celulares y su actividad mitótica por medio de un anticuerpos secundarios y colorantes, las clonas de células madre aisladas se crecieron en cajas de cultivo de 24 pocillos (Figura 22) durante 3 días; para la técnica se emplearon los siguientes marcadores: Anticuerpo primario policlonal Stro-1, Anticuerpos secundarios monoclonales ALEXA F594, FCy5 y colorantes de estructuras celulares como vinculina, faloidina y sytox. Posteriormente se realizó la rotulación de los pocillos y se inicia la técnica.

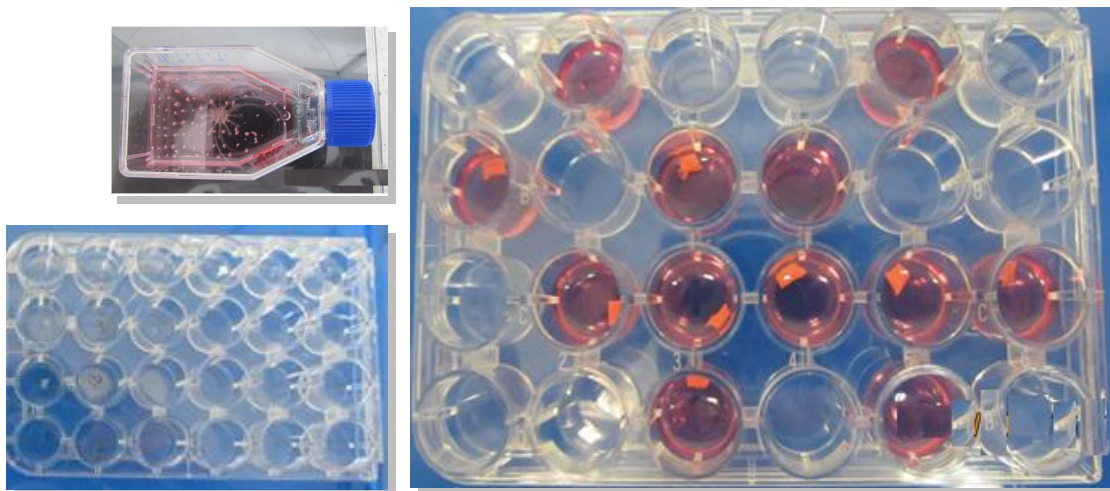


Figura 22. Resembrado del cultivo primario hacia la caja de pocillos, (Posteriormente se indica el agente adicionado a cada pocillo)

Como primer paso del marcaje, se toma la caja de cultivo y se le retira cuidadosamente el medio, con ayuda de una pipeta manual o succionador, evitando tocar la parte profunda del pozo, una vez eliminado el medio, se realizan dos enjuagues con PBS o buffer de fosfatos al 1%, continuando con los 3 pasos básicos del triple marcaje:

1. Fijación: se colocan 500 μ L de formalina neutra al 10% y se deja actuar por 20 minutos, pasando el tiempo de interacción se realizan dos enjuagues con PBS,
2. Permeabilización: se colocan 500 μ L de Tritón 100X al 0.1% en PBS dejando actuar por 20 minutos para posteriormente enjuagar 2 veces con PBS,
3. Bloqueo: se colocan 100 μ L de albúmina sérica bovina, dejándola actuar por 30 minutos y posteriormente se incuba a 37 °C por 10 minutos. Pasando el tiempo de incubación se deja reposar a temperatura ambiente por 5 minutos, se retira la albúmina y se enjuaga 2 veces con PBS.

Una vez terminados los pases y enjuagues, se coloca en cada uno de los pocillos rotulados los controles, detectores y agentes colorantes, como se muestra en la siguiente imagen:

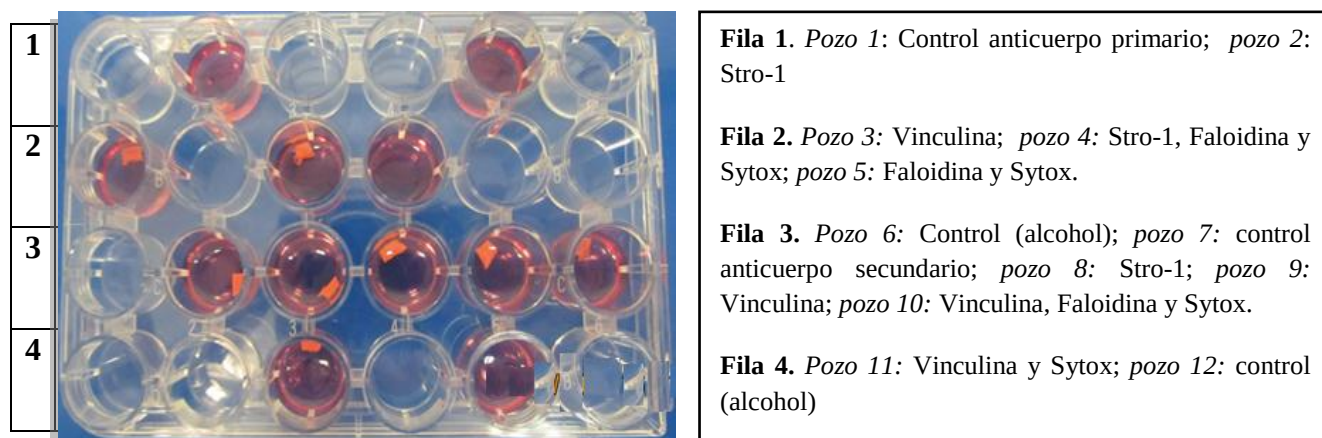


Figura 23. Rotulación de los pocillos y adición de anticuerpos y agentes colorantes. La caja rotula de la siguiente manera: de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo. En la fila 1, pocillos 1 y 2; en la fila 2, pocillos 3, 4, 5; en la fila 3, pocillos 6, 7, 8, 9, 10 y en la fila 4, pocillos 11 y 12.

Después del bloqueo, y pasado el segundo enjuague, se coloca el primer anticuerpo en el pozo de control 1, así como 200µL de cada reactivo a los pocillos rotulados (como se indica en la imagen 11), dejando reposar a 4 °C por 12 horas y pasando el tiempo de reposo se enjuaga cuidadosamente con PBS en dos ocasiones.

Después del segundo lavado se coloca el segundo anticuerpo en el control 2 y se adicionan 150 µL del anticuerpo primario en los pocillos rotulados y adicionados con Stro-1 así como 150 µL del anticuerpo secundario en los pocillos rotulados y adicionados con vinculina. La caja se sella y se deja reposar por 1 hora a 4 °C. Pasado el tiempo de acción se realiza un enjuague doble con PBS y se coloca agua destilada en cada pocillo y se inicia con el análisis de resultados a partir de la técnica de microscopia confocal giratoria de fluorescencia.

Glosario CAPÍTULO 3

Absceso Periodontal: Es un proceso inflamatorio agudo purulento por microorganismos piógenos asociada a la susceptibilidad del individuo, localizado en la pared blanda de encía.

Anticuerpo monoclonal (mAb): Es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral.

Anticuerpo policlonal (pAb): Son anticuerpos derivados de diferentes líneas de células B, los linfocitos encargados de la respuesta ante elementos ajenos (antígenos) mediante anticuerpos.

Caries: Enfermedad multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana.

Clorhexidina: El gluconato de Clorhexidina es un agente antimicrobiano tópico que se utiliza para enjuagues bucales en el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal y tópicamente en la preparación de la piel del paciente antes de una operación quirúrgica, lavado de heridas, y tratamiento del acné vulgar.

Enfermedad apical: Proceso infeccioso, invasivo y destructiva de la zona terminal o ápice radicular, por la formación de un absceso.

Enfermedad periodontal: Proceso infeccioso manifestado por la afección y destrucción de tejidos blandos (encía) y de soporte (hueso) que conforman el sistema periodontal.

Fase periodontal inicial: Tratamiento higiénico inicial en la terapia dental, la cual consiste en otorgarle al paciente las herramientas de limpieza e higiene oral básica para el mantenimiento óptimo de la salud bucal.

PBS: Es una solución comúnmente usado en la investigación biológica. Se trata de una solución base de agua que contiene cloruro de sodio, fosfato de sodio, y, en algunas formulaciones, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Grupos del búfer de fosfato de ayudar a mantener un pH constante.

CAPÍTULO 4
**RESULTADOS Y
CONCLUSIONES**

4.1. ENSAYOS DE INMUNOMARCAJE Y PROLIFERACIÓN CELULAR

4.1.1. Ensayo de reconocimiento estromal.

La finalidad del aislamiento y posterior cultivo de los complejos celulares obtenidos a partir de pulpa dental es la proliferación de células madre mesenquimales a partir de las muestras cultivadas. Un cultivo primario y/o secundario exitoso es aquel en el que los complejos celulares son capaces de originar nuevas células a partir de su propio *ciclo mitótico*, todo ello controlado mediante el perfecto y cuidadoso manejo de los cultivos y subcultivos, así como también de la técnica empleada y el medio ambiente controlado y producido de forma artificial el cual brinda las condiciones idóneas para la obtención de cultivos altamente confluentes y con células altamente activas.

Para la valoración de la viabilidad celular de los cultivos de células madre de pulpa dental se empleó un kit vida y muerte celular estandarizado (**LIVE/DEAD®**. Cell Viability Assays. *Life Technologies™*) el cual permite la determinación fácil y sensible de la viabilidad celular, la vitalidad celular y la citotoxicidad de compuestos y el medio en que se desarrolló el cultivo y las condiciones en que se realizó el mismo. La técnica empleada en citometría permite valorar los resultados mediante microscopía de fluorescencia permitiendo la fijación de los fluoróforos o agentes colorantes empleados los cuales son atraídos por receptores específicos marcando las membranas celulares integras de color verde estableciendo con ello complejos celulares activos mitóticamente y marcando de color rojo por la fijación del fluoróforo o colorante a receptores citoplasmáticos intracelulares para marcar a las células en etapa de *apoptosis* o bien restos celulares y/o agentes contaminantes (Figura 24 y 25).

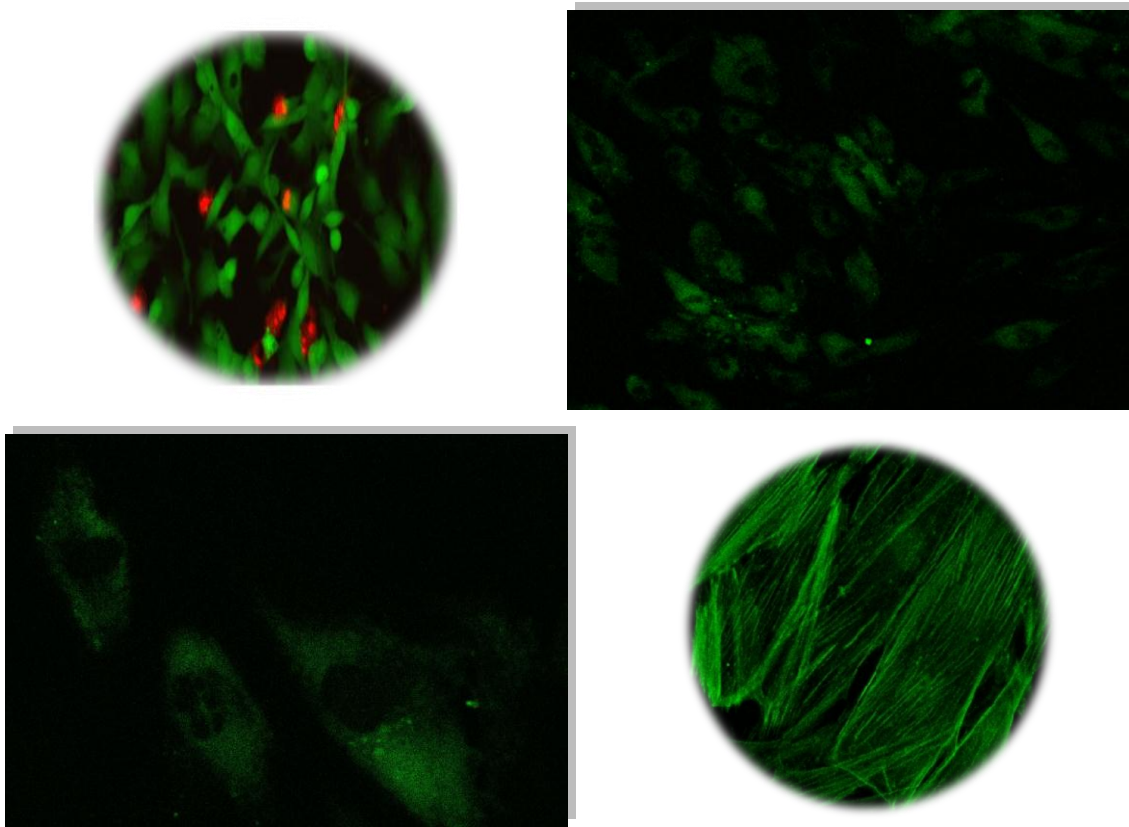


Figura 24. Microscopio Confocal giratorio. Valoración de la proliferación y viabilidad celular, marcando de color verde células vivas y de color rojo células muertas.

Imagen obtenida con bajo microscopio © Leyca microsystems

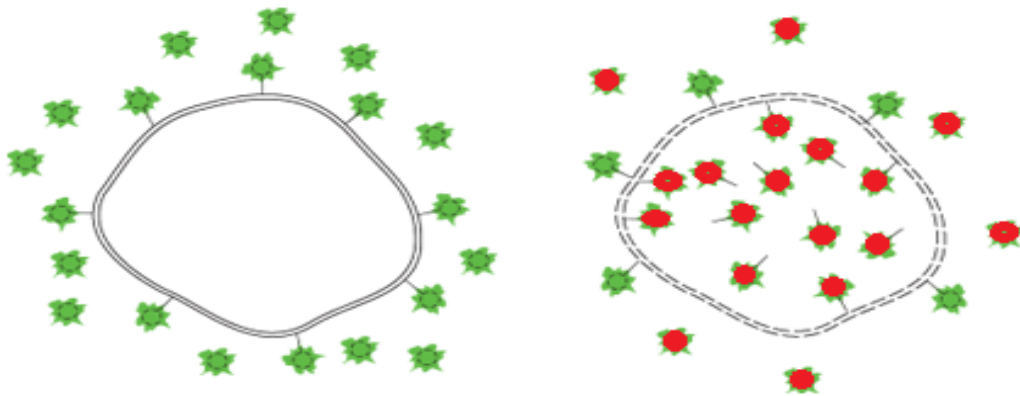


Figura 25. Ejemplificación de la acción de los reactivos o fluoróforos del kit vida y muerte sobre receptores membranales y citoplasmáticos específicos.

© Life Technologies™. Viability Assays

4.1.2. Inmunomarcaje de células madre de pupa dental.

Para la identificación y reconocimiento estromal de células madre, es necesaria la aplicación de una técnica de inmunotinción o inmunohistoquímica con lo cual se demuestra la presencia de antígenos superficiales extra e intracelulares presentes en los cultivos. La técnica se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos mono o policlonales de detectar y unirse específicamente a antígenos de superficie, siendo visible dicha reacción por la acción de agentes colorantes o fluoróforos que absorben o emiten luz produciendo una coloración o fluorescencia.

Para el reconocimiento estromal positivo para células madre, posterior al último enjuague con PBS en el bloqueo o tercera fase de la técnica de marcaje, se colocó en el pocillo 1, el marcador Stro-1, complementado con 1.5 μ L del reactivo o fluoróforo E, 1.5 μ L del reactivo C (estos reactivos corresponden al kit de vida y muerte) y 1.47 μ L de PBS, dejando reposar por 45 minutos libre de luz. Posterior al tiempo de reacción se observó al microscopio confocal, obteniéndose los siguientes resultados.

Reconocimiento estromal para células madre mesenquimales por reconocimiento del marcador Stro-1: **POSITIVO** (Figura 26). Con lo cual, las células presentes en las muestras celulares corresponden a clonas de células madre derivadas de pulpa dental.



Figura 26. Reconocimiento estromal positivo por Stro-1

Para confirmar los marcajes por medio de los anticuerpos primarios y secundarios, fueron empleados agentes colorantes o fluoróforos que tienen como objetivo el reaccionar e identificar las zonas de anclaje o unión entre los anticuerpos y los antígenos específicos de superficies, tanto para el *citoesqueleto*, el núcleo y los filamentos de actina o fibras de estrés. Los medios de reacción empleados son: para el reconocimiento de la reacción estromal, se colocaron los fluoróforos *ALEXA F594* y *Cy5*; para el reconocimiento de las estructuras celulares se emplearon los siguientes colorantes: Faloidina, Vinculina y Sytox.

Para realizar el estudio microscópico de las estructuras celulares reconocidas por los fluoróforos y colorantes empleados, es necesario retirar cada uno de los cubreobjetos colocados en la profundidad de los pocillos y sobre los cuales se realizó la resiembra y crecimiento secundario, para ello es necesario el uso de una cucharilla para dentina de borde circular, despegando cuidadosamente cada uno de los bordes del cubreobjetos (Figura 27); una vez obtenidos, se invierten y se colocan en un portaobjetos aplicándose una gota de glicerol y/o aceite de inmersión para posteriormente iniciar con la técnica de observación empleando el microscopio confocal.



Figura 27. Cubreobjetos localizado en el interior de cada pocillo, además se muestra también la cucharilla de dentina usada para despegarlo del fondo y las puntas terminales circulares de la misma.

Mediante el empleo de marcadores estructurales celulares, ligados a los fluoróforos empleados para el reconocimiento de las reacciones antígeno-anticuerpo y los receptores estructurales específicos, se revelan estructuras y organelos celulares presentes en la muestras derivadas de los cultivos pulpaes y las cuales fueron confirmadas por el marcador estromal para células madre.

Por medio de la técnica es posible observar en diferentes planos o regiones zonas específicas de las células cultivadas.

En la Figura 28 se presentan cuatro planos observados en el inmunomarcaje; en la Figura 28-A se observan de color rojo las células marcadas como POSITIVAS al marcador estromal Stro-1.

En la Figura 28-B se observa por medio de los colorantes faloidina y vinculina el citoesqueleto de la célula y los filamentos de actina de color verde, los cuales al teñirse expresan la integridad de la membrana celular y la íntima relación entre los complejos celulares.

En la Figura 22-C por medio del empleo del colorante Sytox se observa el núcleo celular teñido, marcándose de un tono azulado la membrana nuclear y de un color rosado brillante el interior del núcleo o contenido genético observado en la Figura 28-D, que en el caso de las muestras se expresó ampliamente con lo cual se establece que el material cromosómico se encuentra no condensado o visible y en estado de dispersión y duplicación, proceso con el que se inicia el ciclo celular de mitosis o división del núcleo, finalmente ésta misma imagen muestran en un plano tridimensional las estructuras anteriormente mencionadas.

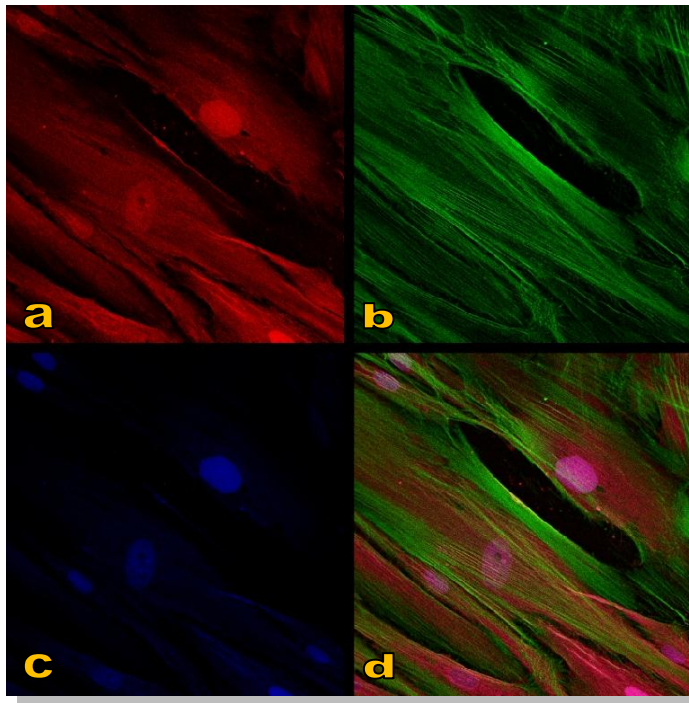


Figura 28. Fotografía confocal que muestra las diferentes zonas ampliadas en el inmunomarcaje y representadas en un plano tridimensional.

En las Figuras 29 y 30 se observan en diferentes planos de observación las regiones del citoesqueleto de las diferentes agrupaciones celulares presentes en la muestra y las cuales tienen zonas de interrelación mediante los filamentos de actina, pertenecientes al citoesqueleto.

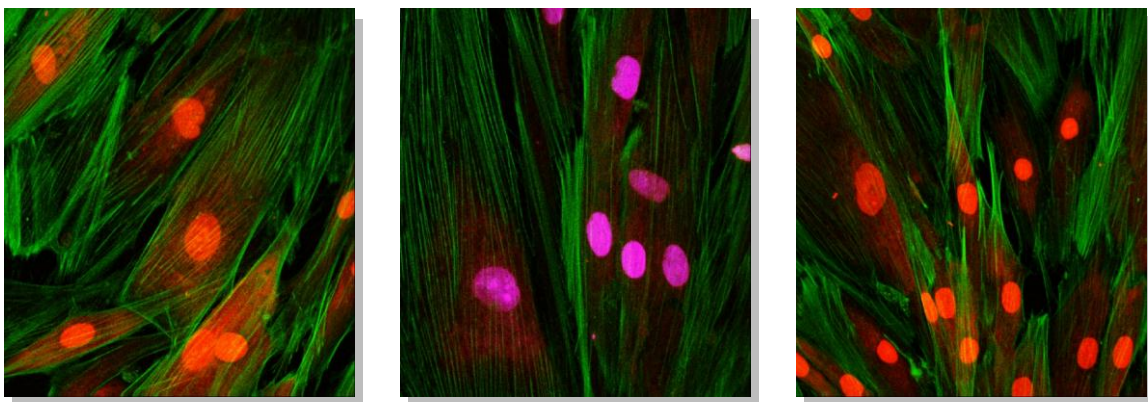


Figura 29. Fotografía confocal que muestra en diferentes planos los filamentos de actina que forman parte del citoesqueleto celular (verde).

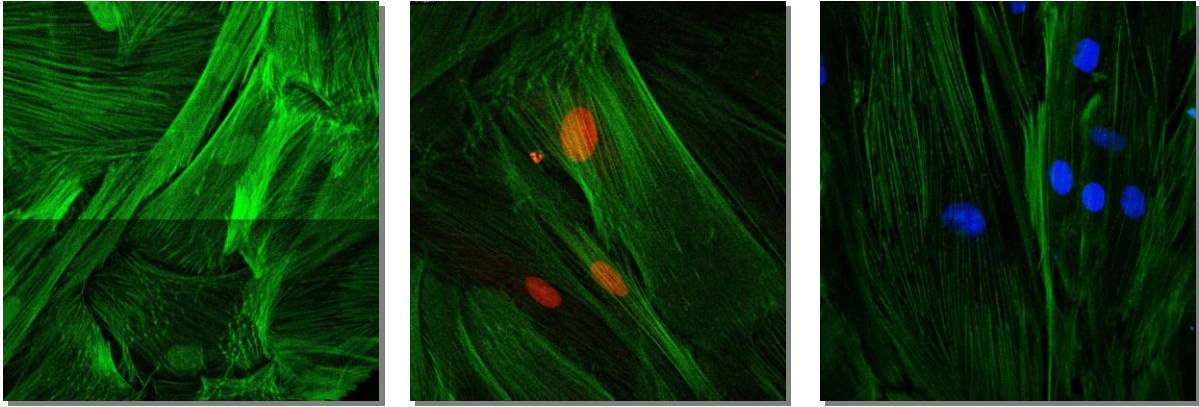


Figura 30. Fotografía confocal que muestra en diferentes planos el citoesqueleto celular (verde), en regiones con aspecto de telaraña lo que indica la íntima relación entre células.

En la Figura 31, se muestran en diferentes planos de corte el núcleo celular teñido, expresado de un color azul la membrana nuclear (Figura 31-A) y de un color rosa brillante el contenido genético o cromosómico (Figura 31 B y 31C), que al expresarse de tal forma, indica que se encuentre en estado condensado o apto para iniciar la etapa de replicación durante el ciclo de división celular.

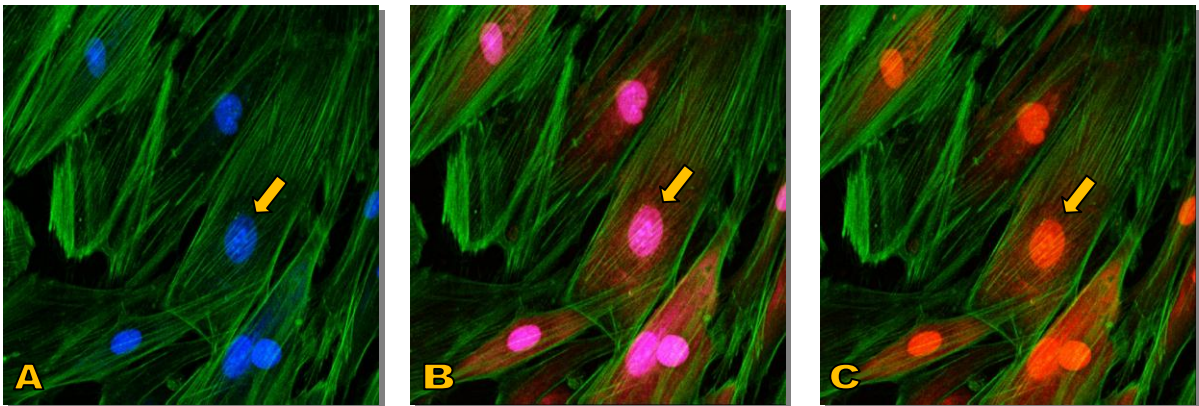


Figura 31. Fotografía confocal que muestra el núcleo y su membrana teñidos con el fluoróforo Sytox. (Indicado con flecha)

La Figura 32, muestra de forma aislada una célula madre de pulpa dental identificada mediante el inmunomarcaje, en donde se aprecia el citoesqueleto completamente delimitado y la interacción entre sus filamentos de actina, así como la presencia de un núcleo celular altamente activo.

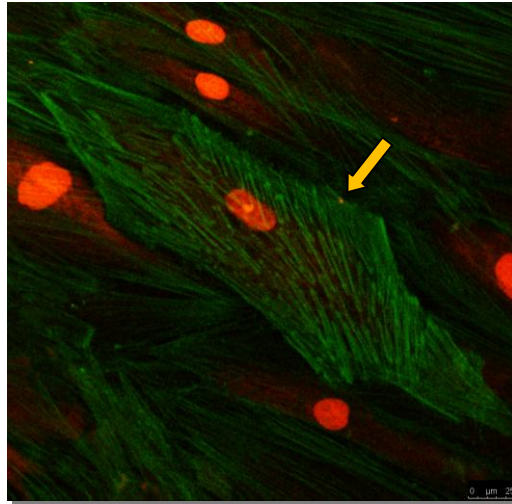


Figura 32. Fotografía confocal de una célula madre, destacándose su citoesqueleto perfectamente delimitado, sus fibras de interacción y su núcleo altamente mitótico (indicado con flecha).

En la Figura 33, se observa la gran confluencia de células madre pupares, con dos aspectos de interés, la íntima relación entre las fibras del citoesqueleto y la gran actividad en que se encuentran los núcleos celulares.

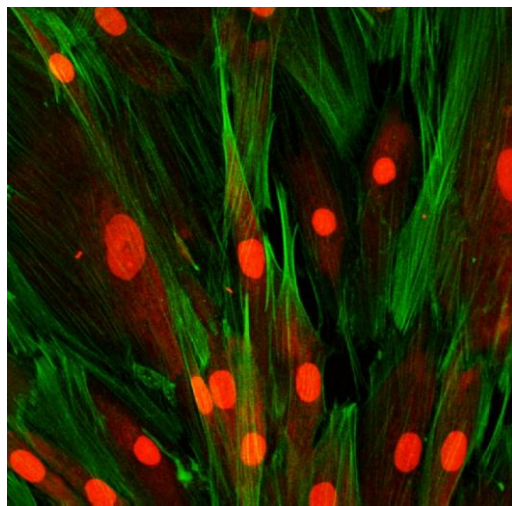


Figura 33. Fotografía confocal que demuestra la gran confluencia de células madre en la muestra,

En las Figuras 34 y 35, se muestran las zonas de interrelación entre el citoesqueleto de las células, en forma individual como también grupal. Estas regiones de contacto son llamadas zonas de estrés por medio de las cuales las células tienen la capacidad de adaptación y proliferación tanto en cultivos celulares como también en dispositivos de crecimiento o andamios.

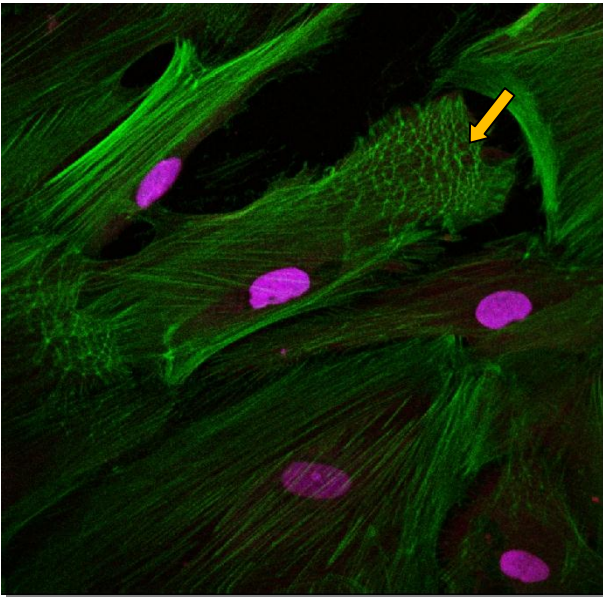


Figura 34. Fotografía confocal en la que se aprecia la interacción de las fibras del citoesqueleto en la misma célula (indicada con flecha)

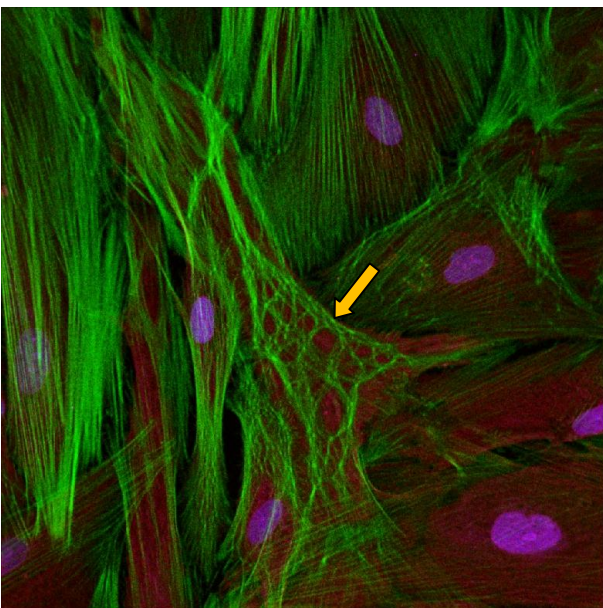


Figura 35. Fotografía confocal que muestra una zona de anclaje y/o adaptación entre fibras del citoesqueleto (telaraña) entre grupos celulares, con lo cual se establece la actividad de adaptación a superficies o dispositivos. (Indicado con flecha).

En las Figuras 36 y 37, se observan en un plano tridimensional grupos de células madre de pulpa dental cultivados y aislados, con las estructuras de reconocimiento mediante inmunomarcaje e inmunofluorescencia con las cuales, mediante la detección de estructuras y la observación de la confluencia de células, es posible establecer que las células madre obtenidas mediante el cultivo y aislamiento de pulpa dental de dientes permanentes, son células estromales o progenitoras con capacidad de adaptación y proliferación celular.

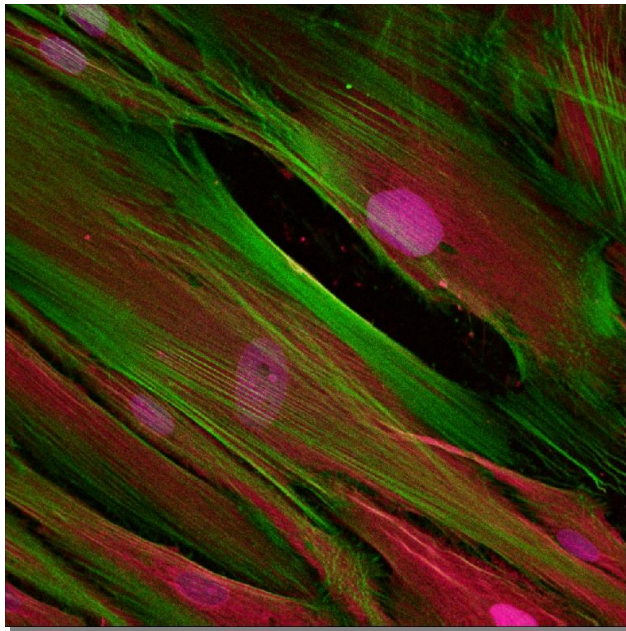


Figura 36. Fotografía confocal que muestra en un plano tridimensional la confluencia de la muestra.

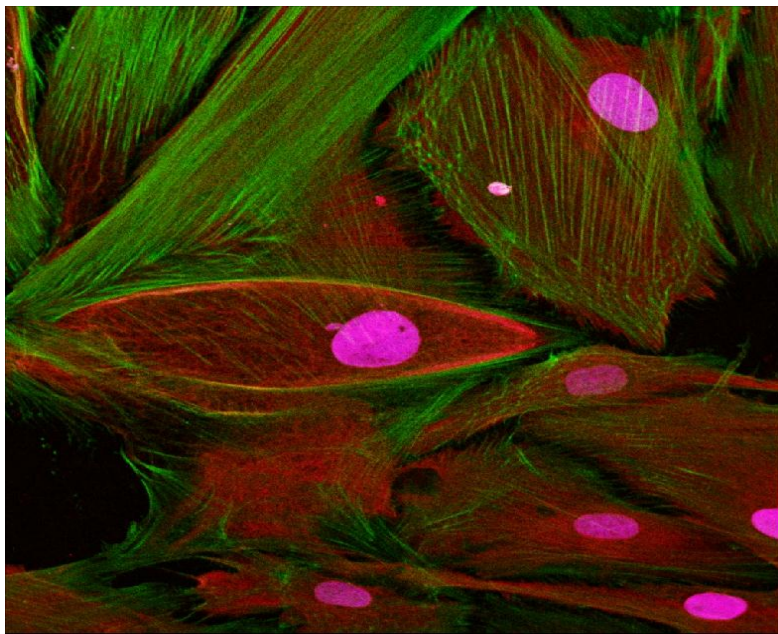


Figura 37. Fotografía confocal en la que se aprecian las diferentes estructuras celulares, su íntima relación y actividad, con lo que se puede establecer que las células presentes en la muestra tienen amplio carácter de proliferación celular.

4.2. CONCLUSIONES.

La tendencia actual en cuanto a la terapéutica médica está encaminada a la solución integral de las afecciones o padecimientos que afectan y deterioran la calidad de vida de las personas, ya que los tratamientos ante enfermedades agresivas son muy radicales y los resultados postoperatorios son tardados, en ocasiones dolorosos y con bajas expectativas de recuperación integral.

La ingeniería de tejidos ha establecido una sinergia muy importante con las áreas biomédicas otorgándoles nuevas herramientas aplicadas para la terapéutica médica integral. La nueva tendencia en el campo de la ingeniería de tejidos o bioingeniería es el empleo de complejos celulares enfocados al uso terapéutico regenerativo.

Las células madre cumplen un papel vital en esta sinergia entre campos de estudio, pero su medio de obtención en cuanto a la naturaleza de la muestra y el manejo de las mismas para su producción y proliferación, han detenido el avance en cuanto al estudio de sus aplicaciones y beneficios.

Es por eso que las células madre mesenquimales de origen dental están revolucionando el estudio de la terapéutica celular y su modelo aplicativo en la terapia regenerativa.

Una vez revisada la información obtenida de los diferentes ensayos y estudios experimentales así como la realización de pruebas de vitalidad, proliferación y reproducción celular, durante la realización de la investigación, se han llegado a las siguientes discusiones y conclusiones:

- *Referente al medio de obtención de la muestra:*

Las células madre pueden obtenerse también de pulpa dental y otros tejidos orales. Las células madre pulpares, además de ser de fácil obtención en cuanto a la muestra (pieza

dental), tienen una técnica de extirpación del tejido muestra (pulpa dental) que es de fácil acceso, gran cantidad de tejido y por ello una cantidad alta de muestra a cultivar además de que la población en general tiene la posibilidad de ser donante de forma autóloga o bien ligada a la línea familiar directa y en ocasiones indirecta.

- *Referente a su capacidad de diferenciación y proliferación.*

En cuanto a su proliferación en cultivos, superan en gran medida al resto de fuentes, además de que su carácter de reproducción es más elevado y se caracterizan por su autorrenovación ilimitada, su capacidad formadora de colonias y su diferenciación multipotencial.

- *Referente a las técnicas de obtención y cultivo.*

Se logró estandarizar las técnicas en cuanto a manipulación de las muestras, almacenamiento de las mismas, obtención de la muestra dental y pulpar y su manejo, así como la técnica de cultivo, en cuanto a medios de cultivo enriquecidos y suplementados que garantizan el crecimiento óptimo de colonias y la proliferación y reproducción ordenada de las mismas.

- *En cuanto a las técnicas de marcaje e identificación celular.*

Con la corroboración del estudio inmunohistoquímico, es posible determinar que el aislamiento y diferenciación de las células derivadas de extractos pulpaes y que expresan marcadores estromales específicos obtenidas para este estudio, se identifican como células madre o troncales. Además con los marcadores de estructuras u organelos celulares es posible tipificar a las colonias de células obtenidas y aisladas con la

característica clonal y metabólica necesaria para proliferar, dividirse y en su caso diferenciarse a un linaje celular específico, con lo cual es posible el continuar con los estudios futuros de esta investigación.

4.3. ESTUDIOS FUTUROS.

Una vez establecido y logrado el objetivo general de la investigación al obtenerse, aislarse, inducir la proliferación e identificar las células obtenidas como células madre de pulpa dental, es posible continuar y establecer los objetivos específicos para el estudio futuro de la investigación, serán:

- Implementar un sistema tisular (constructo tridimensional), formado por las células madre aisladas, un biopolímero y agentes osteoinductores y osteoconductores.
- Diseñar, sintetizar y obtener de un biopolímero para la elaboración del constructo tisular, a base de caprolactona.
- Implementar un sistema tisular *in vitro* e *in vivo* en una zona de defecto óseo, para guiar y producir un remodelado y regeneración ósea.

Glosario **CAPÍTULO 4**

ALEXA F594: Agente fluorescente o fluoróforo de membrana que actúa como medio de identificación y ligue en la reacción antígeno anticuerpo, estableciendo una reacción fluorescente de color rojo intenso.

Apoptosis: Conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en las células cuando se diferencian y ejercen funciones normales, concluyendo tras un cierto número de divisiones celulares con la muerte celular de una forma ordenada y silenciosa

fCy5: Es un agente fluorescente conjugado que produce una excelente reacción altamente sensitiva y reproducible al actuar en las reacciones antígeno anticuerpo principalmente a nivel de la región nuclear, estableciendo una expresión fluorescente azulada.

Mitosis, ciclo mitótico: Proceso de división celular del núcleo y citoplasma en las células eucariotas cuyo objetivo principal es la reproducción celular, con lo cual a partir de una célula madre se obtienen 2 células hijas con la dotación cromosómica completa o idéntica a su progenitora.

Stro-1: Marcador específico de superficie que actúa sobre los receptores de membrana plasmática o celular de las células troncales o madre, uniéndose y ligándose, siendo expresada dicha interacción por medio de agentes fluorescentes para establecerse un marcador, positivo o negativo.



BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. **Lanza Robert.** Handbook of stem cells, Elsevier academic press 2004.
2. **Ming Yan, Yan Yu, Guangdong Zhabg, Chunbo Tang, Jinhua Yu.** A journey from dental pulp stem cells to a Bio-tooth. Stem Cell Rev and Rep. DOI1.1007/s 12015-010-9155-0.
3. **Yamaza et al.** Stem Cell Research & Therapy 2010, 1:5.
4. **Muñoz R.,** Cuerpo, histología y medicina de la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Instituto de España, Real Academia Nacional de Medicina. Madrid, 2004, 41-59.
5. **Ferreira, C. Magini, R., Sharpe, P.** Biological Tooth replacement and repair. Journal of Oral Rehabilitation 2007 34: 933-939.
6. **Sonie, A., Modino, C., Sharpe, P., Tucker, A.** Tissue engineering of teeth using adult stem cells. Archives of Oral Biology 2005, 50, 225-258.
7. **Matalova, E., Fleischmannova, J., Sharoe, P, Turker, A.** Tooth Agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry. J Dent Res, 2008, 7: 617-623.
8. **Ikeda E., Morita, R., Nakao, K., Tsuji, T.** Fully functional bioengineered Toth replacement as an organ replacement therapy. PNAS, 2009, 106;32: 13475-13480.
9. **Couseriro, J.** Bioadhesividad celular sobre superficies de armazones o matrices celulares. Tesis Doctoral. <http://tdx.cat/bitstream/handle/10803/4313/jco1de1.pdf?sequence=1>
10. **Valdez, B., Schorr M., Valdez E., Carrillo.** Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano. Revista Ciencia y desarrollo. UABC-Instituto de Ingeniería. Conacyt 2006.

- 11. Rosales, R., Alvarado, K., Pozos, A.** Reparación de huesos con células dentales. Revista Universitarios Potosinos. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Marzo-Abril 2011.
- 12. Krebsbach P, Gehron P.** Dental and skeletal stem cells. Potential cellular therapeutic for craniofacial regeneration. Journal of dental Education 2002.
- 14. VV.AA.** XXIX Simposio Internacional de Traumatología y Ortopedia FREMAP. Biomateriales, trasplantes e ingeniería tisular en cirugía ortopédica y traumatología. Editorial Mapfre, 1ra edición, 2003.
- 15. Trownson A.** New perspective in human stem cell therapeutic research. BMC Medicine. 2009. 7:1-5.
- 16. Andrew J, Daniel A, Joshua S y col.** The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering. Organogenesis. 2008; 4:1, 23-7.
- 17. Arora V, Munshi A.** Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth. SHED: Saving for the future. J Clinic Pediatric Dent 2008; 33(4): 289-94.
- 18. Gronthos S, Zannettino A, Graves S.** Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cell. J Bone Miner Res. 1999; 14:47-56.
- 19. Grottkau BE, Purudappa PP, Lin YF.** Multilineage differentiation of dental pulp stem cells from green fluorescent protein transgenic mice. Int. Journal Oral Sci. 2010, Mar, 2(1): 21-27.
- 20. Huang J, Gronthos S, Shi S.** Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res. 2009; 88(9): 792-806.

- 21. Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Oshima A, Sobajima S y col.** Multipotent cells from human third molar: feasibility of cell-based therapy for disease differentiation. 2008; 76:495-505.
- 22. Magallanes M, Rodríguez B, Álvarez A.** Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. Revista Odontológica Mexicana, 2010; 14:15-20.
- 23. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan R, Wang R, Wang S, Shi S y col.** Characterization of the apical papilla and residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod. 2008; 24:166-71.
- 24. Stewart K, Walsh S, Screen A.** Further characterization of cell expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cell. J Bone Miner Res; 14:1345-56.
- 25. Griffith I, Grodzinski A.** Advances in biomedical engineering. JAMA. 2001; 285: 556-561
- 26. Hart TC, Marazita ML, Wright JT.** The impact of molecular genetics on oral health paradigms. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2000; 11(1) 25-56.
- 27. Kaigler D, Mooney D.** Tissue Engineering's Impact on Dentistry. Journal of Dental Education. 2001; 65(5):456-62.
- 28. Vacanti, Charles A. Bonassar, Lawrence J.** An Overview of Tissue Engineered Bone. Clinical orthopedics and research. Vol. 1(367S), 1999; 375-381.
- 29. Tamura RN, Oda D, Quaranta V, et al.** Coating of titanium alloy with soluble laminin-5 promotes cell attachment and hemidesmosome assembly in gingival epithelial cells: Potential application to dental implants. J Period. Rest. 1997;32:287-94.

- 30. Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ.** Controllable DNA delivery from polymer matrices. *Nat Biotechnol*, 1999;17:551-54.
31. Fong K, Nacamuli R, Song H, Warren S, Lorenz P, Longaker M. New Strategies for craniofacial repair and replacement: A brief review. *J Cranio. Surg.* 2003;14(3):333-39.
- 32. Ueda M, Tahnai I, Nakai H.** Tissue engineering in oral implant surgery. *Artif. Organs*, 2001; 25(3):164-71.
- 33. Bell E.** Prostheses made of biomaterials that regenerate body parts: In *Biotechnology*. 2000. 31-33.
- 34. Yao X, Ma X, Zhang Z.** Chondrocyte allografts for repair of full-thickness defects in the condylar articular cartilage of rabbits. *Chin J Dent Res.* 2000; 3(3): 24-30.
- 35. Rhee Ph, Friedman C, Riedge J, Kusiak J.** The use of processed allograft dermal matrix of intraoral resurfacing. *Arch Otolaryngo. Head Neck Surg.* 1998; 124: 1201-04.
- 36. Sumy Y, Hata K, Sawaki Y, Mizuno H, Ueda M.** Clinical application of cultured oral epithelium for palatal rounds after palatoplasty: a preliminary report. *Oral Dis.* 1999; 5(4): 307-312.
- 37. Ripamonti U, Reddi AH.** Tissue engineering, morphogenesis and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997; 8(2): 154-163.
- 38. Nakashshima M.** The induction of reparative dentin in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenic protein. *Arc Oral Biol.* 1990; 35(7): 493-7.
- 39. Mooney D, Powell C, Piana J, Ruthefor R.** Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotech Progress.* 1996; 12(6): 868-868.

- 40. Goldberg M, Sic N, Decup F, Lasfargues J, Salih E, Tomkins K, Veis A.** Bioactive molecules an the future of pulp therapy. Am J Dent. 2003; 16(1): 66-76.
- 41. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakashima A, Akamine A.** Dentine regeneration by dental pulp stem cells theraphy with recombinant human bone morphogenic protein 2. J Dent Res. 2004; 83(8): 590-5.
- 42. Krebsbach P, Kuznetsov S, Bianco P, Gerhon R.** Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. Crit in oral boil med. 1999; 10(2): 165-81.
- 43. Baum B, Mooney D.** The impact of tissue engineering on dentistry. Cover stories. Bethesda. 2001.
- 44. Ascencio D. Medicina regenerativa e ingeniería tisular.** Del laboratorio a la clínica. Academia Mexicana de Cirugía. 2008.

ANEXOS

