



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y APLICACIONES
CLÍNICAS DE LAS CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ANA ROSA GARDUÑO RODRÍGUEZ

TUTOR: Dr. LUIS ALBERTO GAITÁN CEPEDA

ASESOR: Esp. DANIEL QUEZADA RIVERA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A Dios, por haberme dado el don de la vida, por su gran benevolencia y por permitirme llegar a coronar con éxito uno de los logros más importantes de mi vida.

*A mi querida **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Odontología** por brindarme la oportunidad de realizar y concluir satisfactoriamente mi carrera universitaria.*

*A mi madre **Lourdes**, por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Por ser mi mejor amiga, la persona que más amo y a la cual admiro muchísimo. Gracias por estar a mi lado siempre que te he necesitado, por hacer de mí una persona valiosa, responsable y honesta, por cumplir todos mis sueños... Siempre estaré en deuda contigo. Mil palabras no bastarían para agradecer tu apoyo, tu comprensión y tus consejos durante toda mi vida.*

*A mi hermano **Aarón** porque ha estado a mi lado desde el primer momento de la vida cuidándome, apoyándome y creyendo siempre en mí. Recuerda que siempre voy a estar orgullosa de ti.*

*A **Eduardo**, por motivarme a ser una mejor persona en todos los aspectos de mi vida, por apoyarme incondicionalmente para concluir mi carrera universitaria. Por amarme, protegerme y ser mi mejor amigo. Gracias por enseñarme a disfrutar y valorar cada instante, siempre estaré a tu lado acompañándote. Te amo, cosa.*

*A mis abuelitos **Rosa** y **Juan**, a mis tías **Silvia** (+), **María Eugenia**, **Marcela**, **Norma** y **Hortensia**, a mis tíos **Aarón** y **Eduardo**; a todos mis primos en especial a **Lucero** y **Ricardo**, por apoyarme en todas las etapas de mi vida, por ser mis pacientes más pacientes, por creer en mí, espero nunca defraudarlos y llenarlos siempre de satisfacciones.*

***Silvia** (+), gracias por tus consejos, tus cuidados, tu cariño y sé que en donde te encuentras estás muy orgullosa de éste logro.*

*A mis niñas **Chikís** y **Melody**, las adoro y no imagino mi vida sin su existencia.*

*A mis **amigos** porque han estado ahí para escucharme, apoyarme, alentarme y hacerme sonreír, no necesito mencionar sus nombres porque ustedes saben muy bien quienes son.*

*A todos mis **pacientes** porque sin su invaluable apoyo no hubiera sido posible convertirme en lo que ahora soy, gracias por su paciencia y comprensión.*

*A todos mis **maestros**, porque con sus enseñanzas, experiencia y dedicación he logrado una meta muy importante, el ser profesionalista.*

A todas las personas que han coincidido en mi camino, que han enriquecido mi vida de experiencias buenas y malas, que me hicieron reír, llorar, soñar, pensar, sufrir, luchar, disfrutar, amar...

*A mi tutor, el **Doctor Luis Alberto Gaitán Cepeda**, a mi asesor el **Especialista Daniel Quezada Rivera** y a la coordinadora de Patología General e Inmunología, la **Especialista Lila Areli Domínguez Sandoval** por su gran apoyo y los conocimientos aportados para la realización de este trabajo.*

A Coí porque sólo con constancia, responsabilidad, coraje, fuerza y voluntad se logran los sueños y metas.

"Llégué, ví y vencí" Julio César.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. PROPÓSITO	7
3. OBJETIVO	7

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES DE LAS CÉLULAS TRONCALES

1.1 Antecedentes históricos de la terapia celular.....	8
1.2 Definición	12
1.3 Origen	12
1.4 Localización	13
1.5 Características biológicas y moleculares	14
1.5.1 Mitosis.....	15
1.5.2 Fase G ₁	15
1.5.3 Fase S	16
1.5.4 Fase G ₂	16
1.5.5 Meiosis.....	17
1.5.6 Ciclinas	18
1.5.7 Apoptosis o muerte celular programada	18
1.5.8 Apoptosoma.....	20
1.5.9 Telomerasa.....	24

CAPÍTULO 2

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

2.1 Antecedentes históricos	27
2.2 Características biológicas y morfológicas	29
2.2.1 Multipotencialidad de las células troncales mesenquimales.....	37
2.2.2 Plasticidad de las células troncales mesenquimales ...	38
2.3 Fuentes de obtención	40
2.4 Métodos de obtención.....	42
2.5 Aplicaciones clínicas.....	44

CAPÍTULO 3

APLICACIÓN CLÍNICA EN ODONTOLOGÍA

3.1 Células troncales mesenquimales de origen dental.....	49
3.2 Localización de células troncales mesenquimales	
3.2.1 Tejido Pulpar.....	52
3.2.2 Ligamento Periodontal.....	54
3.2.3 Dientes temporales exfoliados.....	56
3.2.4 Ápice dental.....	57
3.2.5 Folículo dental	58
3.3 Aplicaciones clínicas en odontología	59

CAPÍTULO 4

REALIDAD DE LAS CÉLULAS TRONCALES	64
--	-----------

4. CONCLUSIONES68

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS70



1. INTRODUCCIÓN

Las células troncales o células madre son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un gran potencial proliferativo y presentan dos características considerables: en primer lugar, son capaces de autorrenovarse, es decir, de formar células idénticas a las células de origen, y en segundo lugar, tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que cumplen con funciones especializadas en el organismo.

En los últimos años ha aumentado notablemente, el interés en las células troncales somáticas de múltiples tejidos humanos, ya que además de ser de enorme interés biológico, éstas no representan ningún reto ético y muchas veces se obtienen de tejidos que son desechados, como la placenta, sangre del cordón umbilical ¹ y en los últimos años se han llevado a cabo estudios para obtener células troncales mesenquimales de la pulpa dental de órganos dentales primarios y ligamento periodontal.

Dentro del grupo de células troncales de adulto, las células troncales hematopoyéticas han sido las más estudiadas y en la actualidad se tiene un panorama bastante amplio de su estructura y su biología. El estudio de las células troncales mesenquimales (MSC) inició en la década de 1970, en donde los científicos estuvieron enfocados primordialmente al conocimiento de su papel en la formación del estroma hematopoyético.

Durante la última década las células troncales mesenquimales han sido sometidas a varios estudios en los cuales se ha demostrado el amplio potencial de diferenciación que poseen hacia diversos tejidos. Actualmente están siendo consideradas como una importante opción terapéutica para múltiples enfermedades sistémicas aunque el estudio de las células troncales aún es controversial y no está exento de impedimentos o fracasos.



2. PROPÓSITO

Revisión bibliográfica sobre las células troncales mesenquimales, describiendo la biología que poseen, considerando las probables aplicaciones clínicas que se les pueden dar en diversos padecimientos sistémicos.

3. OBJETIVO

Conocer las diversas propiedades biológicas de las células troncales mesenquimales, identificar las fuentes para su obtención y analizar las probables aplicaciones clínicas en las diferentes ramas de la salud siendo de gran interés el área odontológica; considerando el verdadero potencial de estas células.



CAPÍTULO 1

GENERALIDADES DE LAS CÉLULAS TRONCALES

1.1 Antecedentes históricos de la terapia celular

La teoría básica detrás de la terapia celular fue descrita por Paracelso, en el siglo XVI, que escribió: “El corazón cura al corazón, pulmón pulmonar sana, el bazo bazo sana; semejante cura lo semejante”.⁷ Paracelso y otros médicos creían que la mejor manera de tratar la enfermedad era utilizar tejido vivo para reconstruir y revitalizar el envejecimiento de los tejidos enfermos.

El notable avance de la medicina científica se inició hace varios siglos, aunque, los logros más destacados se han registrado en los siglos XIX, XX y XXI. En el siglo XX, en 1912, el médico francés Alexis Carrel, demostró por primera vez el efecto regenerador que se observa con la aplicación de células provenientes de un organismo joven a uno más viejo, y dijo la siguiente frase célebre: “La esperanza de la humanidad está basada en la prevención de las enfermedades degenerativas y mentales, pero no en el alivio de los síntomas”.⁵ El demostró la inmortalidad de un tejido en vida artificial, ya que durante 27 años, mantuvo latiendo el corazón de un pollo dentro de un recipiente con suero fisiológico, al que le administraba todos los días sustancias del corazón de otro pollo. Fue así que con sus experimentos, estableció el paradigma de la terapia celular: “Los órganos envejecido recobran rápidamente su vigor si se les agrega un extracto de otro órgano similar”.

En 1931 cuando el doctor De Quervain, quien accidentalmente había eliminado la glándula paratiroides de su paciente, pidió apoyo al doctor Niehans, de nacionalidad suiza; ya que la paciente sufría de severas

convulsiones y su estado de salud era muy grave. Niehans no tenía tiempo de ejecutar el injerto quirúrgico de la glándula entera. Usando un catéter, aplicó células de la paratiroides obtenida de un ternero. El éxito de esta terapia realizada por Niehans para abandonar el trasplante quirúrgico de las glándulas intactas es que actualmente sólo se implantan por medio de inyecciones.

En 1948 Niehans amplió la terapia celular con células de hígado, páncreas, riñones, corazón duodeno, timo y bazo. Estas células eran aplicadas a sus pacientes con inyecciones que contenían células recientemente obtenidas (congeladas) o liofilizados reconstituidos (polvo seco de las células) derivados de los diferentes órganos y glándulas de embriones y ovejas jóvenes.⁵



Fig. 1 El doctor Paul Niehans es considerado el padre de la terapia celular²⁰

El descubrimiento de las células troncales o células madre (stem cells) viene a revolucionar el concepto de terapia celular, El trabajo científico lo inicia Robert Edwards, quien enfocó su tema de tesis en la embriología del ratón. Durante su doctorado estudio los conceptos avanzados en genética y biología celular, destacándose los conceptos de “silenciación de genes” y la “canalización” (modelo de diferenciación celular). En 1950 Edwards, tuvo la

idea de trabajar con células troncales de origen embrionario con el objetivo de aplicarlas en diferentes patologías. El primer problema que él resolvería sería la esterilidad humana, por lo que se dirigió a lograr la fertilización *in vitro* de humanos. Durante la ruta clínica de su investigación, colaboró con el bioquímico John Paul para la obtención de un embrión en crecimiento *in vitro*. Este experimento pretendía obtener células hematopoyéticas y neuronales.² También observó el comportamiento de los cultivos de las líneas celulares de embriones de conejo obtenidos por fertilización *in vitro*; este fue el hallazgo más importante de la terapia celular, ya que gracias a este experimento se ha logrado obtener células troncales de origen embrionario. Cuando la masa celular interna del blastocisto era disgregada ocurría un cambio, el cual no se suscitaba cuando se mantenía intacta. Cuando lograron separar las células de la masa celular interna del blastocisto y las pusieron en cultivo celular en cajas de Petri, observaron como las células embrionarias se transformaban (diferenciación celular) en cada tejido del cuerpo como sangre, neuronas y músculo.⁵

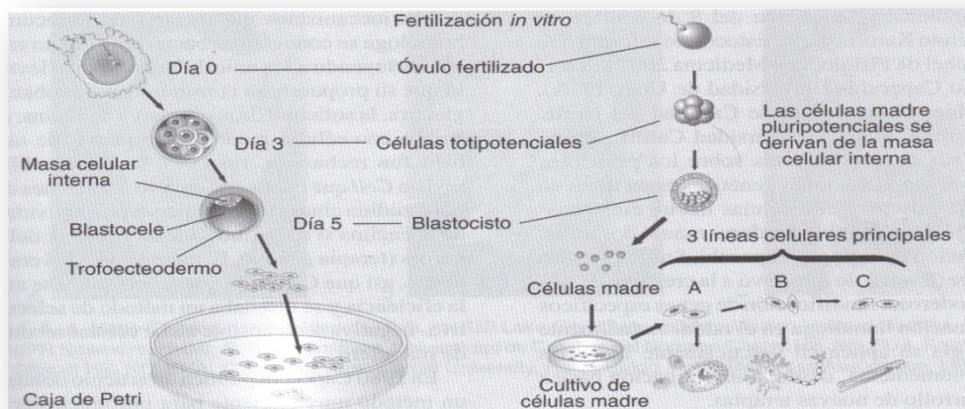


Fig. 2 Hallazgo de Edwards y col. Las células madre de origen embrionario se derivan de la masa celular interna del blastocisto⁵

Edwards en su intento por demostrar que las células troncales de origen embrionario obtenidas de la masa celular interna de blastocistos al ser aplicadas en blastocistos de otros ratones llevaban genes distintos al del receptor, ofreció como tema de doctorado a Richard Gardner y él aceptó. Trabajaron juntos para establecer los procedimientos operativos correctos para manipular los blastocistos de conejo y decidieron cortar los pequeños trozos de trofoectodermo. Los tejidos cortados fueron marcados para identificar la cromatina del sexo y poder diferenciar los embriones masculinos de los embriones femeninos. Richard Gardner descubrió la formación de quimeras en los descendientes del donador y la célula extraña había colonizado virtualmente cada tejido del cuerpo.

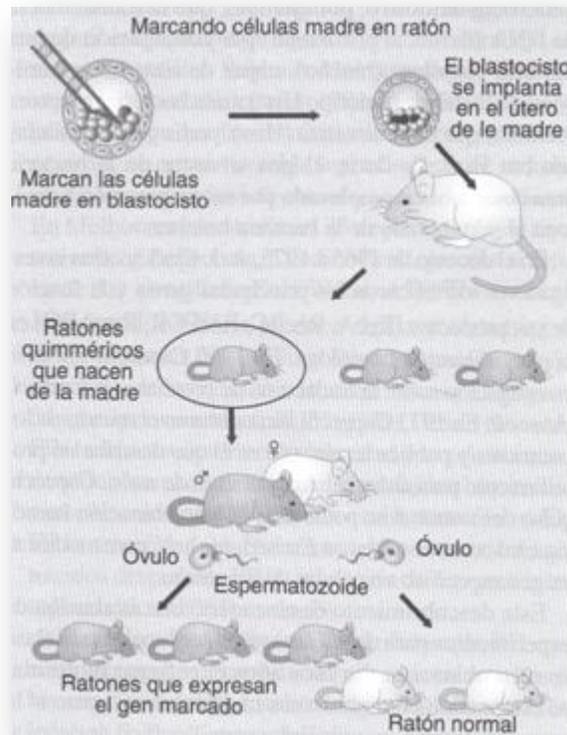


Fig. 3 Formación de quimeras de Richard Gardner y Edwards ⁵



En el año 2007, se otorgó el premio Nobel de Fisiología y Medicina a Mario Capecchi, Oliver Smithies y Martin J. Evans por sus descubrimientos sobre los principios para introducir modificaciones genéticas específicas en el ratón utilizando para ello células troncales embrionarias. El trabajo de estos investigadores reunió dos ideas: la recombinación homóloga y las células troncales, lo que llevó a la creación de una tecnología poderosa: modificación de genes específicos por recombinación homóloga en el ratón. Actualmente esta tecnología se aplica en todas las áreas de biomedicina, que abarca desde la investigación básica hasta el desarrollo de nuevas terapias.⁵

1.2 Definición

Una célula es la unidad más pequeña capaz de manifestar las propiedades del ser vivo, sintetiza el conjunto, o casi, de sus constituyentes utilizando elementos del medio extracelular. Crece y se multiplica.⁶

Entonces podemos definir que una célula troncal o célula madre (stem cell en inglés) es una célula progenitora, capaz de regenerar uno o más tipos celulares diferenciados y con la capacidad de autorrenovarse.

1.3 Origen

Durante el desarrollo embrionario todos los seres humanos pasamos por varias etapas en las primeras semanas del embarazo: cigoto (óvulo fecundado), blastocisto, gástrula y mórula. En la etapa de blastocisto, no todas las células están indiferenciadas; es decir, no se han especializado en funciones particulares, aunque estas mismas células darán origen a células especializadas con tareas concretas, como las neuronas, las células musculares, los eritrocitos y los osteocitos. La mayoría de las células del organismo provienen de las células del blastocisto, se dice que son totipotenciales y reciben el nombre de células troncales embrionarias.¹⁹

Existe otro tipo de células troncales, las “células troncales organoespecíficas”; éstas son pluripotenciales y multipotenciales que se derivan de divisiones celulares de las células troncales embrionarias y tienen la capacidad de originar las células de un órgano específico tanto en el embrión como en el adulto. Un ejemplo de este tipo de células son las células troncales mesenquimales de la médula ósea, las cuáles son capaces de originar todas las células de la sangre y del sistema inmune.⁵

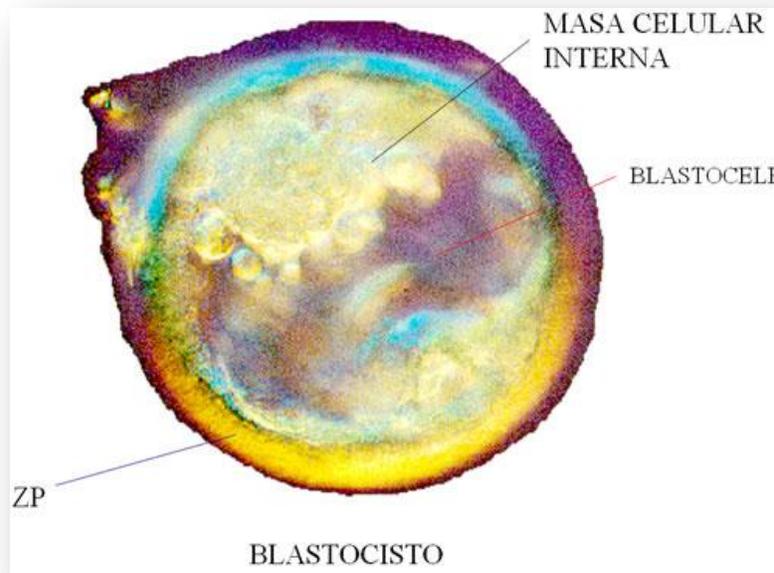


Fig. 4 En la etapa de blastocisto las células se encuentran indiferenciadas²¹

1.4 Localización

En 1978, Scofield, definió como nicho a los elementos que rodean la célula troncal cuando se encuentra en su estado nativo, incluyendo las células no troncales que puedan estar en contacto directo con ella, así como la matriz extracelular y las moléculas solubles que se encuentran



localmente.⁸ Los nichos de células troncales se encuentran en las siguientes localizaciones:

- Embrión (etapa de blastocisto)
- Cordón umbilical
- Médula ósea
- Tejido Adiposo
- Sistema nervioso
- Pulpa dental
- Ligamento periodontal

1.5 Características biológicas y moleculares

Las células troncales pasan a través de una secuencia regular de crecimiento y división llamada ciclo celular, el cual es una secuencia cíclica y ordenada de procesos en que la célula crece y se divide en dos células hijas. Consiste en interfase, mitosis y citocinesis. La duración del ciclo celular varía según la estirpe celular, siendo la duración media del ciclo completo unas 24 horas. El ciclo celular se divide en cuatro fases o cuatro estados metabólicos distintos que se denominan G_1 , S, G_2 (interfase) y M (mitosis). La mitosis o periodo de división o fase M puede durar unas horas o varios días, dependiendo del tipo de célula; a su vez se divide en dos procesos:

- a) Mitosis o división nuclear (cariocinesis): es la división celular en la cual una célula troncal se divide en dos células hijas idénticas. Ésta fase se divide en profase, metafase, anafase y telofase. Tiene una duración de aproximadamente 1 hora.
- b) Citocinesis o división citoplasmática para generar dos células hijas.

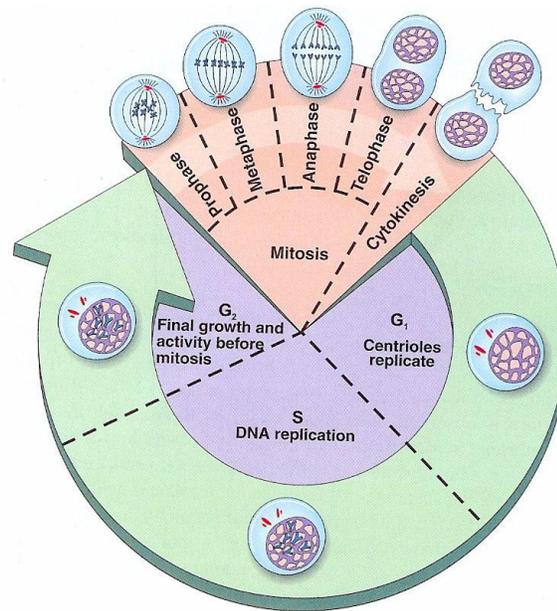


Fig. 5 Etapas del ciclo celular, en donde la célula se divide en cuatro estados metabólicos ²²

1.5.1 Mitosis

La interfase es el periodo durante el cual la célula crece, replica su DNA y se prepara para la siguiente división. Este periodo está comprendido entre divisiones celulares y es la fase más larga del ciclo celular, ocupando casi 95% del ciclo ⁵. Consta de varias fases (G₁, S y G₂). La continuidad del número cromosómico de una especie es mantenida por la mitosis. En la fase S los cromosomas se duplican y en la fase G₂ comienza la condensación de los cromosomas y del ensamblado de las estructuras especiales requeridas para la mitosis y la citocinesis.⁹

1.5.2 Fase G₁

Es la primera fase del ciclo celular en donde existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y RNA. Comenzando a partir de la citocinesis de la división anterior, la célula hija es pequeña y posee un alto contenido de ATP



resultante del gasto efectuado en el ciclo anterior, por lo que en este periodo se produce la acumulación del ATP necesario y el incremento del tamaño celular. Es el periodo que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de DNA. Dura entre 6 y 12 horas.

1.5.3 Fase S

Es la fase de síntesis o replicación del DNA, inicia cuando la célula adquiere el tamaño suficiente y el ATP necesario, tiene una duración de 6 a 8 horas.

1.5.4 Fase G₂

Tiempo que transcurre entre la duplicación del DNA y el inicio de la mitosis. En esta fase continúa la duplicación de proteínas y de DNA es tetraploide. Dura entre 3 y 4 horas. La mitosis es el proceso de separación de los cromosomas y división de las células eucariotas, células somáticas que llevan la copia del material genético. Este proceso asegura que cada célula que nace de otra tenga los mismos datos genéticos que la célula madre.

La profase finaliza con la desintegración de la envoltura nuclear y la desaparición de los nucléolos. Durante la metafase, las cromátidas, dirigidas por las fibras del huso, se mueven hacia el centro de la célula. Al final de la metafase disponen en el plano ecuatorial. Durante la anafase se separan las cromátidas hermanas y migran a los polos opuestos. En la telofase se forma una envoltura nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas, el huso comienza a desintegrarse y los cromosomas se desenrollan para entrar nuevamente a interfase.

1.5.5 Meiosis

Es un proceso de reducción cromosómica a la mitad pero sin perder la información genética que mantiene los rasgos estructurales y funcionales del organismo. En la meiosis I (etapa reduccional) se reduce el número diploide de cromosomas a la mitad o haploide, pero aún los cromosomas son dobles. En la meiosis II (etapa ecuacional) se mantiene el número cromosómico haploide conseguido en la etapa anterior, pero los cromosomas son simples. Entre estas dos etapas consecutivas no existe la letra S, por lo que no se duplica el material genético sino que se reduce.

La división celular se activa por las señales de transducción intracelulares que a su vez han sido puestas en marcha por la estimulación de los factores de crecimiento sobre sus receptores. La regulación del ciclo celular es fundamental para mantener el equilibrio homeostático entre crecimiento celular, diferenciación, supervivencia y muerte celular.⁵

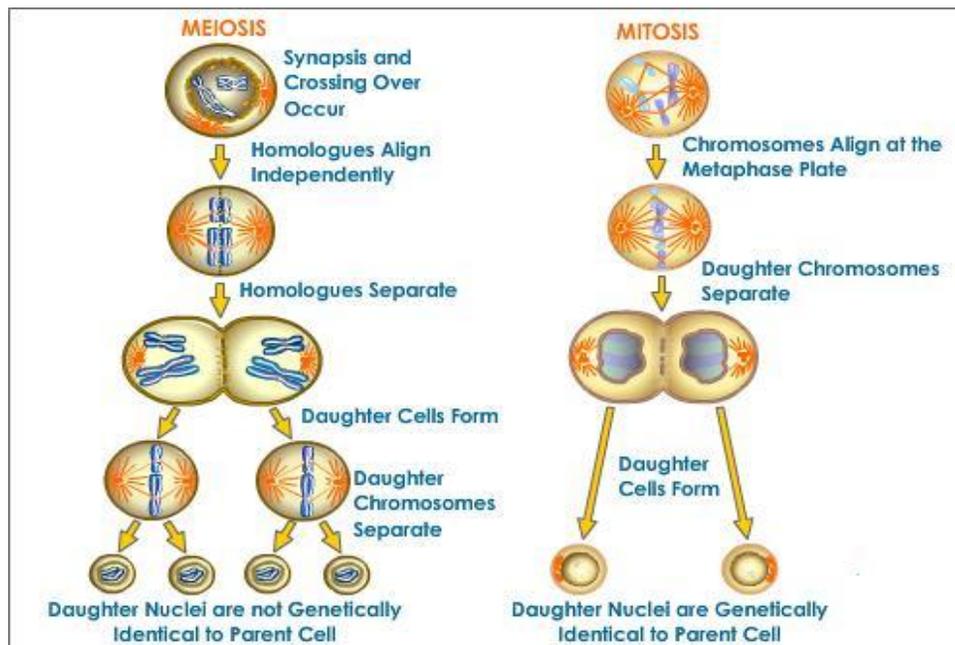


Fig. 6 Fases de la mitosis y la meiosis²³



1.5.6 Ciclinas

Las ciclinas son una familia de proteínas que son sintetizadas y destruidas durante una determinada fase del ciclo celular. Todas ellas contienen una región común conocida como secuencia ciclina, de 150 aminoácidos, que es un dominio relativamente conservado y responsable de la unión y activación de las CDC.

Las Cinasas Dependientes de Ciclina (CDC) son las principales controladoras del ciclo celular, provocando que la célula pase de G_1 a S o de G_2 a M. Las CDC son unas proteínas cinanas que se unen a ciclinas específicas y son activadas por ellas, se tienen descritas al menos nueve CDC. Las CDC4, CDC5 Y CDC6 forman complejos con las ciclinas de la familia D y funcionan durante la fase G_0/G_1 del ciclo.

1.5.7 Apoptosis o muerte celular programada.

La apoptosis es la muerte celular programada controlado genéticamente; esta forma de muerte es diferente de la muerte no apoptósica o necrosis. Tiene un papel muy importante en el desarrollo embriológico de casi todos los órganos y tejidos. El rasgo característico de la muerte celular por apoptosis son las membranas celulares intactas aunque la célula se esté destruyendo por dentro. La apoptosis es inducida por el p53 a través de la transcripción de genes como Bax. Otros inductores de apoptosis son FAS/APO-1/CD95.

En la apoptosis pueden diferenciarse varias fases:

- Efectora: adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte, se caracteriza por el aumento en el contenido de calcio intracelular.



-
-
- Degradativa: se degradan los ácidos nucleicos y existen más cambios en la membrana células. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos.
 - Limpieza: los macrófagos eliminan todas las células apoptóticas.

En el organismo son comunes dos formas de muerte celular: necrosis y apoptosis. En la apoptosis destacan las alteraciones morfológicas del núcleo frente a las del citoplasma, a la inversa de lo que ocurre en la necrosis en general. La necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible.

Los receptores de muerte son moléculas señaladoras de apoptosis, pertenecen a la superfamilia del receptor de necrosis tumoral (TNF), cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína. Existen dos familias de receptores de muerte: Proteína CD95 (APO-1/Fas) y el Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1).

Existen dos vías de señalización de apoptosis donde interviene la mitocondria en el panorama de muerte celular.

- La primera por medio de MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization), que ocasiona la creación de un poro formado por las proteínas de la familia Bcl-2, Bax y Bak, activados por su dominio BH3 en respuesta a una señal de apoptosis, resultando en la liberación de proteínas del espacio intermembránico de la mitocondria incluyendo a citocromo C, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2. El citocromo C activa a APAF-1, la cual se oligomeriza y forma el apoptosoma, el cual

activa a la caspasa 9. La caspasa 9 activa a las caspasas ejecutoras. El inhibidor de las caspasas (IAP) bloquea la función de la caspasa 9 y es bloqueado por Smac y Omi.

- La segunda ruta de muerte celular es desencadenada por especies reactivas de oxígeno (ERO) que cambian la permeabilidad de la membrana interna, provocando edema y ruptura de la matriz.⁹

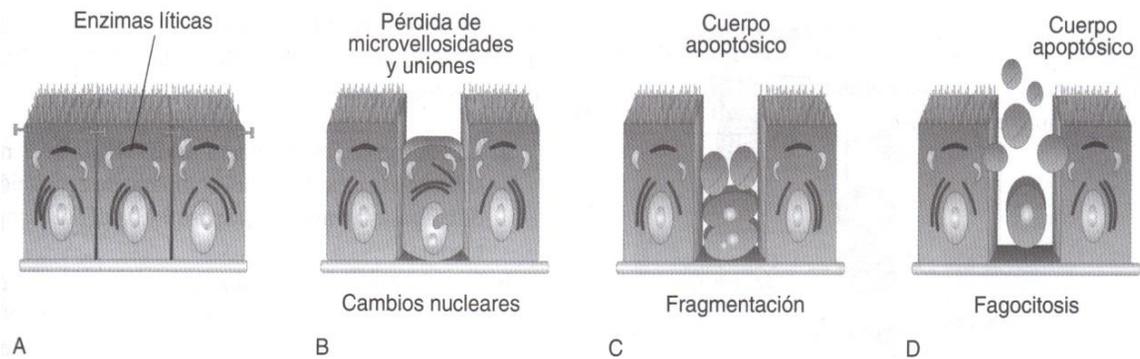


Fig. 7 Esquema de la apoptosis. Este proceso celular es dependiente de energía; al realizarse de manera controlada, no afecta a las células vecinas. **A.** Cuando comienza este proceso se sintetizan enzimas líticas y se producen cambios estructurales, lo que se llama cebamiento. **B.** Las células pierden contacto con sus vecinas, su citoplasma y su núcleo se retraen y los cromosomas se fragmentan. **C.** Se forman los fragmentos apoptóticos por fragmentación celular; el núcleo también se fragmenta. **D.** Las células vecinas fagocitan los cuerpos apoptóticos.⁵

1.5.8 Apoptosoma

En todos estos sistemas, el complejo formado por receptores, adaptadores y procaspasa 9 se denominan apoptosoma. Todas las células que conforman al organismo, incluyendo las células troncales adultas, provienen de las células troncales embrionarias. Estas células expresan antígenos embrionarios estadioespecíficos, fosfatasa alcalina y gran cantidad de



telomerasa. Después de la implantación, las células pluripotenciales se restringen al epiblasto del embrión. Las células del epiblasto son autorrenovables y pluripotentes hasta el periodo de gastrulación, cuando de manera progresiva se diferencian en las tres capas germinativas y sus derivados.

Cuadro 1. Marcadores de superficie de las células madre pluripotentes

Antígeno	2-8					
	células	Mórula	MCI	Trofoblasto	hECC	hESC
SEA-1	-	+	-	+	-	-
SSEA-3	-	-	++	-	+	+
SSEA-4	-	-	++	-	+	+
TRA-1-60	-	-	+++	-	+	+
TRA-1-81	-	-	++	-	+	+
GCTM-20					+	+
CD9					+	+
Osteopontina		+	++			++
PECAM-1 (CD31)						

+++ muy alta expresión; ++ alta expresión; + expresión; - sin expresión; MCI masa celular interna, Hecc células de carcinoma embrionario humano; hESC células madre embrionarias.

Las células troncales embrionarias dan origen a las capas germinativas del embrión como el ectodermo, mesodermo y endodermo. Todos los tejidos de adulto provienen de estas tres capas. A medida que avanza la ontogénesis, las células de las capas germinativas se diversifican de manera progresiva en patrones espaciales específicos para controlar la morfogénesis. De manera más avanzada en el desarrollo, la diversificación precede a la determinación de cada célula progenitora del fenotipo celular del tejido. Las



células troncales se dividen para amplificar la cantidad de células progenitoras, las que finalmente diferencian a células funcionales.⁵

Las células troncales pluripotenciales humanas (ChESC) se derivan de la masa celular interna en los días 5-8 del estado de blastocisto o mórula embrionarios. Estas células tienen un cariotipo estable, se renuevan y tienen gran potencial de diferenciación en células de las tres capas germinativas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Cuadro 2. Marcadores de autorrenovación y pluripotencia de las hESC y mESC⁵

Antígeno	hESC	mESC
SSEA-1	-	+
SSEA-3	+	-
SSEA-4	+	-
TRA-1-60	+	-
TRA-1-81	+	-
TRA-2-49	+	-
TRA-2-54	+	-
GCTM-2	+	-
Fosfatasa alcalina	+	+
Telomerasa	+	+
TRF-1	+	+
TRF-2	+	+
Nanog	+	+
Oct3/4	+	+
Sox2	+	+
Rex1	+ (variable)	+
Foxd3	+ (variable)	+
Dppa5/Esg1	+	+



Las hESC (células troncales embrionarias humanas) indiferenciadas se pueden caracterizar por la expresión de marcadores de superficie como el antígeno específico de estadio embrionario (SSEA) 3 y 4, por el antígeno de rechazo tumoral (TRA) y por el marcador tumoral de célula germinal (GCTM). Una característica común a las células troncales embrionarias (ESC) de humano y de ratón es la expresión de la enzima fosfatasa alcalina.

Nanog, es un factor de transcripción tipo secuencia homeótica, esencial en el mantenimiento de la masa celular interna *in vivo* y en las ESC *in vitro*. Está presente en la MCI y en las poblaciones celulares mESC y hESC indiferenciadas y se regula a la baja cuando existe diferenciación. Nanog es capaz de mantener la pluripotencia al suprimir la expresión de los factores transcripcionales Gata4/Gata6/Cdx. No se conocen por completo los mecanismos involucrados en la regulación de Nanog pero se sabe que posee un efecto pivote en la transcripción de factores como Oct3/4 y Sox2. Oct3/4 es un factor de transcripción de dominios POU que regula genes al unirse a la secuencia octamérica repetida AGTCAAAT dentro de la región promotora de los mismos, este factor actúa en conjunto con Sox2, que se unen a regiones cercanas a los repetidos octámeros de Oct 3/4. Estos factores tienen una función muy importante en la autorrenovación y son expresados en alta concentración en líneas celulares de ESC.

Las variaciones en la expresión de estos factores influyen en el destino de las células troncales embrionarias; por ejemplo los incrementos en Oct3/4 promueven la formación de endodermo y mesodermo y si baja la expresión de éstos se promueve la aparición de trofoectodermo.⁵



1.5.9 Telomerasa

Los télómeros son secuencias de DNA que protegen los extremos de los cromosomas eucarióticos manteniendo estabilidad y evitando la fusión entre cromosomas y la pérdida de información. En las células somáticas los télómeros se acortan tanto que alcanzan un tamaño crítico y las células entran en senescencia o apoptosis. Las células y tejidos que cuentan con la capacidad de autorrenovarse y que proliferan rápidamente superan este problema por medio de la expresión de la enzima telomerasa. Esta enzima está formada por dos subunidades una transcriptasa reversa y un componente de RNA telomerasa que porta una secuencia de RNA molde. En las células troncales pluripotentes contienen elevadas concentraciones de telomerasa, esta enzima se considera como un marcador de indiferenciación de las hES.

Existen diversos factores extrínsecos de autorrenovación de las células troncales embrionarias tales como la señal de LIF (factor inhibitorio de la leucemia mieloide). El LIF es un miembro de la familia de las citocinas IL6 y se une a un receptor que forma un complejo de dos proteínas transmembránicas que son LIF β y gp-130. La unión de LIF a su receptor genera el reclutamiento de proteínas JAK cinasas por debajo de la membrana y activa la vía de señalización de STAT3 e induce la expresión de genes que participan en la autorrenovación. No existe a la fecha evidencia que involucre a la vía de señalización de LIF con Nanog/Oct3/4/Sox2. LIF es esencial en el mantenimiento de las mESC en un estado de indiferenciación *in vitro*. La vía de transducción de señales de TGF β está involucrada en un amplio rango de decisiones del destino celular y en diferentes procesos celulares como: la proliferación celular, diferenciación y apoptosis) tanto en el periodo embrionario como en el estado adulto. Existen dos ramificaciones de



la señal de TGF β que están implicadas en el proceso de autorrenovación de las ESC, están las vías:

- TGF β /nodal/activina: Involucra la activación de Smad2/3, la cual es fosforilada y forma complejo con co-Smad4 antes de que transloque al núcleo. La importancia de activación de la activación de Smad2/3 es la autorrenovación de las hESC.
- BMP (proteína morfogenética de hueso): De igual forma pertenecen a la familia de las TGF β . Existen cuatro receptores para BMP: BMP1 α (ALK2, ALK), BMP1 β y BMPRII. Esta señal se inicia por la unión de BMP al receptor BMPRI α y BMPRII, que lleva a la activación de Smad1/5/8. La vía de las BMP termina con la expresión de factores id (inhibidor de la diferenciación).

Otras vías:

- Vía de nodal: Diferentes investigaciones han relacionado al nodal en la autorrenovación de células troncales embrionarias humanas y de ratón. En las hESC, nodal se expresa a la baja cuando inicia la diferenciación. La sobreexpresión de nodal inhibe la diferenciación a neuroectodermo de las hESC, induce la formación de endodermo visceral y mantiene los marcadores de pluripotencialidad.
- Vía de señalización de activina: Son proteínas homodiméricas miembros de la familia de las TGF β que interactúan con los receptores para activina y que posteriormente activan la vía de Smad 2/3. Están presentes en un amplio rango de tejidos y órganos incluyendo placenta, médula ósea y bazo. Tienen un amplio rango de funciones biológicas, como la diferenciación del endodermo a partir de las hESC



y participan en asociación con con BMP4 en la diferenciación del mesodermo en mESC.

- Vía de señalización de FGF y PI3K: La familia de factores de crecimiento de FGF es capaz de iniciar un amplio margen de respuestas celulares como proliferación, migración, diferenciación, interrupción del ciclo celular y autorrenovación de las ESC. La señal de esta vía puede estar sujeta a regulación por BMP2, la cual inhibe la degradación de la proteína supresora de tumores, PTEN, que es un efector negativo de PI3K.
- Vía de WNT/ β -catenina: La vía de Wnt está involucrada en la proliferación y determinación del destino celular. Las alteraciones en esta vía llevan a carcinogénesis. La vía que se conoce comienza por la unión de Wnt con el receptor Frizzled (Frz), lo que activa, por debajo de la membrana, a la proteína Dishvelled (Dsh) que inhibe la destrucción del complejo. A partir de esta un ion, la proteína β catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde actúa con un coactivador transcripcional del factor de células T. La vía de Wnt está relacionada con la autorrenovación de las células troncales del epitelio intestinal, de las células troncales de piel y las células embrionarias humanas.⁵



CAPÍTULO 2

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

2.1 Antecedentes históricos

En 1924, el científico ruso Alexander A. Maximow utilizó los extensos hallazgos histológicos para identificar un tipo singular de célula precursora en el interior del mesénquima que se diferenciaría en distintos tipos de células sanguíneas y en 1960 los científicos Ernest A. McCulloch y James E. Till fueron los primeros en demostrar la naturaleza clonal de las células de la médula ósea.²

El estudio completo de las células troncales mesenquimales inició a finales de la década de 1960 y se extendió durante los años 70's con los trabajos realizados por Friedenstein y col. Este grupo utilizando ratones y cobayos, describió por primera vez una población de células adherentes de la médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. Estas células fueron nombradas como mecanocitos estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F).¹

Durante la década de los 80's varios grupos de investigación se dieron a la tarea de caracterizar a la población celular de médula ósea, capaz de originar el estroma medular, hueso y cartílago. Durante ésta etapa los investigadores trabajaron intensamente en la caracterización y la biología de las células troncales mesenquimales.³

Piersma y col. demostraron que las células de la médula ósea contienen progenitores de fibroblastos, que podían ser trasplantados junto con las



células hematopoyéticas. Por su parte Owen y col. demostraron que estas células tenían la capacidad de originar tejido óseo, cartilaginoso y conjuntivo, y que a partir de una pequeña cantidad de células de médula ósea inoculadas en cámaras de difusión en modelos *in vivo*, se generaban una gran cantidad de células estromales, lo que dejaba claro el gran potencial de proliferación y diferenciación de estas células.

En 1987, Friedenstein y su grupo de colaboradores, realizaron estudios con clonas aisladas que les permitieran ver si los osteoblastos, condrocitos y fibroblastos que originaban dichos tejidos provenían de un progenitor común en la médula ósea ³ y encontraron que las colonias de morfología fibroblastoide, formadas al cultivar *in vitro* una suspensión de células provenientes de la médula ósea, derivaban de un solo progenitor (CFU-F); también demostraron la gran capacidad proliferativa de las CFU-F, su gran habilidad para autorrenovarse y su multipotencialidad. ¹



Fig. 8 El doctor Friedenstein realizó un estudio completo de las células troncales mesenquimales ²⁴



A finales de 1980 Friedenstein y Owen plantearon que existía una célula troncal presente en el tejido conjuntivo asociado a la médula ósea, capaz de dar origen a diferentes tipos celulares, entre los que se incluía el tipo osteogénico, ellos la designaron como célula troncal estromal.³

Años más tarde Caplan y col. desarrollaron un protocolo que permitía cultivar y trasplantar células mesenquimales de humanos adultos y obtener la formación de hueso.¹

Gracias a diversos grupos de estudio, a este grupo celular se le han asignado varios nombres como. Células de Estroma Medular, Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides, Precusores Estromales ó Células Adultas Progenitoras Multipotentes o MAPC's (Multi-Potent Adult Progenitor Cells)⁴

2.2 Características biológicas y morfológicas

Se han observado, dentro de la Médula Ósea (MO), unas células que no son de linaje hematopoyético y que son capaces de diferenciarse en células troncales mesenquimales (MSC)¹², capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos. Diversos estudios han asignado a este grupo celular diversos nombres como: Células del Estroma Medular, Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides, Precusores Estromales ó Células Adultas Progenitoras Multipotentes o MAPCs (Multi-Potent Adult Progenitor Cells).

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios para definir las células troncales mesenquimales:

- Estas células deben ser adherentes en cultivo.

- Expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B.
- Las MSC deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo.

Además de lo propuesto, también se debe tener en cuenta dos aspectos adicionales para clasificarlas como células troncales: que las MSC realicen procesos de autorrenovación, es decir; durante la división celular solo una de las células hijas debe iniciar programas de diferenciación celular y que sean capaces de desarrollar plasticidad clonogénica o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo.⁴

Morfológicamente, las células troncales mesenquimales se caracterizan por presentar una morfología espigada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo alargado, central, que contiene de dos a tres nucléolos.

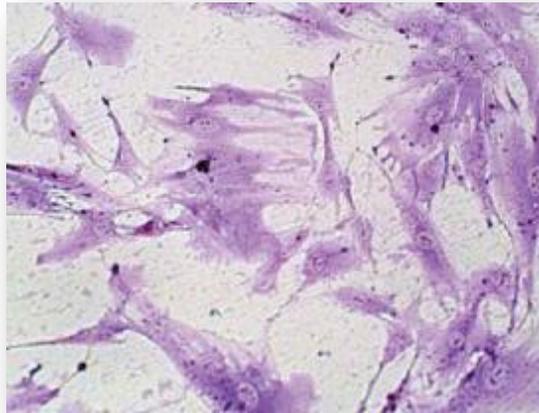


Fig. 9 Microfotografía de células troncales mesenquimales con tinción PAS donde se observa una morfología espigada y núcleos alargados ²⁵



Desde los primeros estudios de Owen se observó que las colonias de progenitores de células mesenquimales contenían distintos tipos de células, describieron colonias que contenían células fibroblastoides, fusiformes, las cuales formaban colonias compactas y colonias abiertas; otro tipo de células a las cuales denominaron de tipo epitelial que eran más pequeñas, con núcleos más intensamente teñidos y morfológicamente semejantes a células epiteliales. Más tarde Mets y Verdonk destacaron la presencia de dos tipos celulares, uno denominado tipo I, en cual se podían observar células pequeñas y fusiformes, y el tipo II, las cuales eran células grandes, aplanadas y que proliferaban más lentamente. Recientemente los estudios llevados a cabo por Prockop y su grupo de colaboradores, describieron tres tipos de células en cultivos de células troncales mesenquimales. Llevaron a cabo estudios con citometría de flujo y separaron tres subpoblaciones, una de células pequeñas, fusiformes y agranulares, a la cual denominaron RS-1; otra de células pequeñas y granulares denominada RS-2 y la última conformada por células más grandes y granulares a las que denominaron como células mesenquimales maduras o mMSC. Estos autores postularon que las células RS-1 corresponden a MSC progenitoras, con elevado índice de proliferación, que dan origen a las células RS-2 y estas últimas a las mMSC.¹ En el grupo de la Doctora Eugenia Flores, realizó un estudio en donde reportaron la presencia de dos tipos de morfología en cultivos de células troncales mesenquimales. Donde la mayoría de las células era de morfología fibroblastoide y una proporción menor de células en el cultivo presentaban un tamaño mayor y morfología romboidal.¹⁰

En la década de los 90 ya se había demostrado la presencia de MSC en gran parte de los modelos humanos y animales, es ahí cuando se les denomina como células troncales mesenquimales. Sin embargo, aún faltan estudios más detallados sobre su biología. Hasta ahora no se ha identificado una molécula que sea única de este tipo celular y que permita ver o distinguir, de



manera totalmente selectiva a las MSC. Aunque existen antígenos que se expresan de manera preferente por las células troncales mesenquimales, para obtener y caracterizar éstas células se utiliza una batería de anticuerpos monoclonales y distintos tipos de tinciones.¹

El doctor Hebertson y su grupo de colaboradores utilizaron la expresión de la fosfatasa alcalina como marcador, este grupo separó dos poblaciones (fosfatasa alcalina positiva y fosfatasa alcalina negativa) de células estromales de la médula ósea de rata. Al cultivar las dos poblaciones, encontraron que la población de células estromales que expresaban altos niveles de fosfatasa alcalina contenía progenitores osteogénicos, capaces de formar hueso. Esta población celular carecía de adipocitos y de células adipocíticas y se encontraba enriquecida en progenitores de osteoblastos. Ellos observaron que las células troncales mesenquimales no expresan fosfatasa alcalina, hasta que han adquirido el compromiso de diferenciación hacia el linaje osteoblástico.¹¹

El primer anticuerpo generado que reconoce a células troncales mesenquimales es el STRO-1 creado por Simmons y Torok-Storb. Este anticuerpo reconoce a las células estromales de la médula ósea como adipocitos, células del músculo liso, fibroblastos estromales y algunas CFU-F. Sin embargo, este anticuerpo también reconoce a células eritroides y no es expresado en todas las MSC.

El grupo de colaboradores liderado por Caplan generó varias líneas celulares de hibridomas a partir de ratones inmunizados con células mesenquimales humanas expandidas *in vitro*. Sólo seleccionaron tres líneas celulares de hibridoma denominadas SH2, SH3 Y SH4. Estas líneas secretaban anticuerpos que reconocían antígenos en la superficie de las MSC, y no reaccionaban con células hematopoyéticas. El anticuerpo SH2 reaccionó con



células mesenquimales de la médula ósea, pero no con células del periosteo expandidas en cultivo. Ahora se conoce que el anticuerpo SH2 reconoce al antígeno CD105-endogлина y los anticuerpos SH3 y SH4 al antígeno CD73.¹

ISCT, propone la molécula CD73 o 5`ectonucleotidasa como un marcador de linaje para las MSC, es una glicoproteína cuya función biológica consiste en hidrolizar nucleótidos extracelulares para permitir el ingreso de nucleósidos y así generar ATP y GTP como fuente de energía celular en células diferenciadas. Sin embargo, se cree que el papel que juega CD73 en las MSC se cree que está relacionado con los mecanismos de adhesión celular ya que se ha encontrado co-expresada con moléculas tipo $\alpha 2$ integrinas, lo que ha postulado a CD73 como un mediador de adhesión celular en las células troncales mesenquimales.

El antígeno CD105, también conocido como endogлина, es una glicoproteína que hace parte del complejo del receptor del Factor Transformante de Crecimiento-B ó TGF- β y se expresa en monocitos activados, macrófagos activados, precursores eritroides, fibroblastos, células foliculares dendríticas, melanocitos, células cardíacas, células endoteliales. También interviene en la regulación de distintos componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno razón por la cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular.

Las MSC también expresan el antígeno CD90, una proteína que es parte de las inmunoglobulinas, aún no se conoce su función en células troncales mesenquimales. Un estudio muestra que si son sometidas a estrés celular mecánico se diferencian hacia células similares a osteoblastos disminuyendo notablemente la expresión de CD90, lo que podría demostrar que este antígeno es un marcador de precursores mesenquimales tempranos que pueden diferenciarse en osteoblastos.⁴



Las células troncales mesenquimales también han sido caracterizadas con anticuerpos ya conocidos y expresados con otros tipos celulares.¹

Cuadro 3. Caracterización de las células troncales mesenquimales (MSC)¹

Antígenos presentes en células hematopoyéticas	Antígenos presentes en células estromales
CD7 -	CD90 +
CD11b -	AC133 +-
CD13 +	HLA-DR -
CD14 -	HLA-ABC +
CD31 -	STRO-1 +-
CD38 -	HOP-26 +
CD34 -	SH2 +
CD43 -	SH3 +
CD45 -	SH4 +
CD56 -	
CD68 -	
CD71 +	

Diversos trabajos concuerdan que las células troncales mesenquimales no expresan los antígenos de células hematopoyéticas con: CD11b, CD14, CD31, CD34, CD45, CD56, CD68 y CD133; siendo positivos únicamente para el marcador de las células hematopoyéticas CD90.¹

Además de los antígenos propuestos por ISCT, otros autores proponen moléculas como STRO-1, CD44 que contribuye en procesos de adhesión, migración y proliferación de las MSC; y CD166 que interviene en la hematopoyesis involucrando a las MSC, participando en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células hematopoyéticas y de las células troncales mesenquimales.⁴



Las MSC son positivas para diversos receptores de factores de crecimiento y de matriz extracelular como los receptores de las interleucinas 1, 3, 4, 6 y 7, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (rPDGF), el receptor del factor de crecimiento neuronal (rNGF), los receptores del factor de crecimiento transformante beta I y II (rTGFβI y II), los receptores del factor de necrosis tumoral I y II (TNF I y TNF II), el receptor del interferón gama (IFNγ) y transferrina, así como para las moléculas de adhesión, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, L-selectina, LFA-3, ALCAM, endoglina (CD105) y CD72.

También expresan una variedad de integrinas incluyendo α1, α2, α3, α5, α6, αv, β1, β3 y β4. Por otra parte estas células son negativas a las siguientes reacciones citoquímicas: fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y sudán negro.¹

Cuadro 4. Caracterización de las células troncales mesenquimales^{1,4}

Integrinas	Moléculas de Adhesión	Receptores de interleucinas¹
α1 +	ICAM-1 +	rIL-1 +
α2 +	ICAM-2 +	rIL-3 +
α3+	VCAM-1 +-	rIL-4 +-
α4 +	L-selectina +	rIL-6 +
α5 +	LFA-3 +	rPDGF +
α6 +	ALCAM +	rNGF +
Aα +	Endoglina +	rTNF γ II +
αv +		rIFN γ +
β1 +		
β3 +		

Diversas moléculas de gran relevancia en la hematopoyesis son producidas y secretadas por las células troncales mesenquimales. Estas moléculas incluyen a componentes de la matriz extracelular como son las colágenas I,



III, IV y VI, laminina, trombospondina, tenacita y fibronectina; así como citocinas (incluyendo IL-6, IL-11, el factor inhibitorio de leucemia (LIF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor de células troncales (SCF), el ligando de FLT-3, la trombopoyetina (Tpo), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), la proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1), el factor de crecimiento de placenta (PIGF). Las MSC al ser estimuladas con IL-1 α , incrementan los niveles de producción de IL-6, IL-11 Y LIF y producen bajos niveles de G-CSF Y GM-CSF.¹

Cuadro 5. Caracterización de las células troncales mesenquimales^{1,4}

Moléculas de matriz extracelular		Secreción de citocinas		Secreción de citocinas al estímulo con IL1-α, IL1-β TNF-α
Colágena I,III,IV,VI	+	IL-6	+	+
Laminina	+	IL-11	+	IL-6 >
Trombospondina	+	LIF	+	IL-11 >
Tenacina	+	M-CSF	+	LIF >
Fibronectina	+	SCF	+	G-CSF <
Vimentina	+	Flt-3	+	GM-CSF <
		Tpo	+	
		VEGF	+	
		FGF-1	+	
		MCP-1	+	
		PIGF	+	

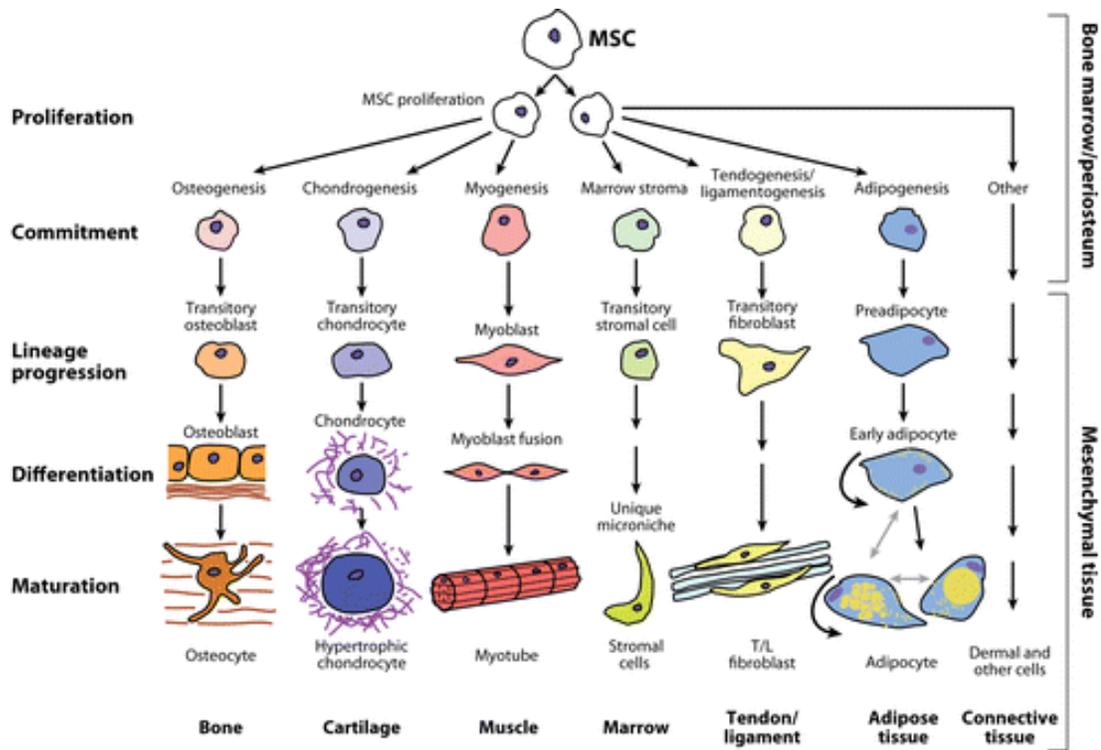


2.2.1 Multipotencialidad de las Células Troncales Mesenquimales

La multipotencialidad se define como, la capacidad de una célula para dar origen a distintos tipos celulares dentro de un mismo tejido o capa embrionaria. Una célula troncal hematopoyética es capaz de dar origen a distintos tipos celulares sanguíneos tan distintos entre sí, morfológica y funcionalmente, por ejemplo, los linfocitos y eritrocitos pero que pertenecen al mismo tejido, en este caso el hematopoyético.

Los trabajos de Friedenstein fueron los primeros en demostrar *in vivo* la capacidad multipotencial de las MSC. Estos trabajos demostraron que las células troncales mesenquimales cultivadas *in vitro* y trasplantadas en ratones secundarios, eran capaces de producir fibroblastos y osteoblastos. Los trabajos realizados por el grupo liderado por Owen demostraron, también en modelos animales, la capacidad de las MSC para producir condrocitos y tejido conjuntivo. Estos autores demostraron que la capacidad de originar células osteoblásticas, cartilagosas y fibroblásticas era única para las células mesenquimales de médula ósea, ya que fibroblastos asilados de bazo desarrollaban únicamente tejido conjuntivo. El potencial de las MSC humanas para producir células osteogénicas también ha sido demostrado por Caplan y Kuznetsov.

Los estudios de Pittenger demostraron la capacidad *in vitro* de las MSC humanas para diferenciarse en células adiposas, osteoblastos y condrocitos. Estos experimentos, realizados a partir de colonias de CFU-F aisladas, demostraron además, que la diferenciación de estas células depende de su ambiente, y que no todas las CFU-F tienen el mismo potencial de diferenciación.¹



AR Singer NG, Caplan AI. 2011. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 6:457–78

Fig. 10 Mesengensis²⁶

2.2.2 Plasticidad de las Células Troncales Mesenquimales

La plasticidad celular se define como la capacidad de una célula para diferenciarse en células maduras distintas a las de su tejido de origen; es la flexibilidad de una célula para sobrepasar la barrera de linaje y adoptar perfiles de expresión y fenotipos funcionales de células de otros tejidos.

Estudios recientes revelan que las células troncales mesenquimales pueden diferenciarse no solamente en células del mesodermo, sino también pueden adoptar un destino endodermal o ectodermal, lo que se ha designado plasticidad celular.



Gracias a los trabajos de Prockop y colaboradores, quedó demostrada la capacidad de las MSC para diferenciarse *in vivo* en células de bazo, cartílago, médula y hueso.

Sandhu (1996), realizó experimentos semejantes a los de Prockop, encontrando que estas células, al injertar, reemplazan a una proporción de las células troncales mesenquimales del receptor en la médula ósea, y que posteriormente participan en las funciones biológicas normales, sirviendo como una fuente de células progenitoras de varios tejidos.

El grupo de Sánchez-Ramos en el año 2000, demostraron que las células estromales de médula ósea adulta, tanto de humanos como de ratones, podían ser inducidas *in vitro* a diferenciarse en células neuronales. Prockop y sus colaboradores encontraron que las células troncales mesenquimales indiferenciadas expresan marcadores característicos de células neuronales como la proteína 1B asociada a microtúbulo (MAP1B) y vimentina. Recientemente, Oswald informó que las MSC pueden ser inducidas *in vitro* a diferenciarse en células endoteliales maduras. Este grupo fue el primero en utilizar células mesenquimales con un inmunofenotipo característico de MSC y no de progenitor de célula endotelial (CD34- CD133-) o de progenitor mesodermal.

Estudios *in vivo* e *in vitro* que demuestran la plasticidad de las MSC son apoyados por los resultados de los estudios de Tremain y Seshi que demuestran, mediante la técnica de microarreglos de expresión y de microSAGE, que estas células expresan transcritos no solamente de las líneas mesenquimales, como adipocitos, condrocitos, mioblastos, osteoblastos, y de fibroblastos estromales, sino también, expresan transcritos característicos de linaje epitelial, neuronal y endotelial.¹

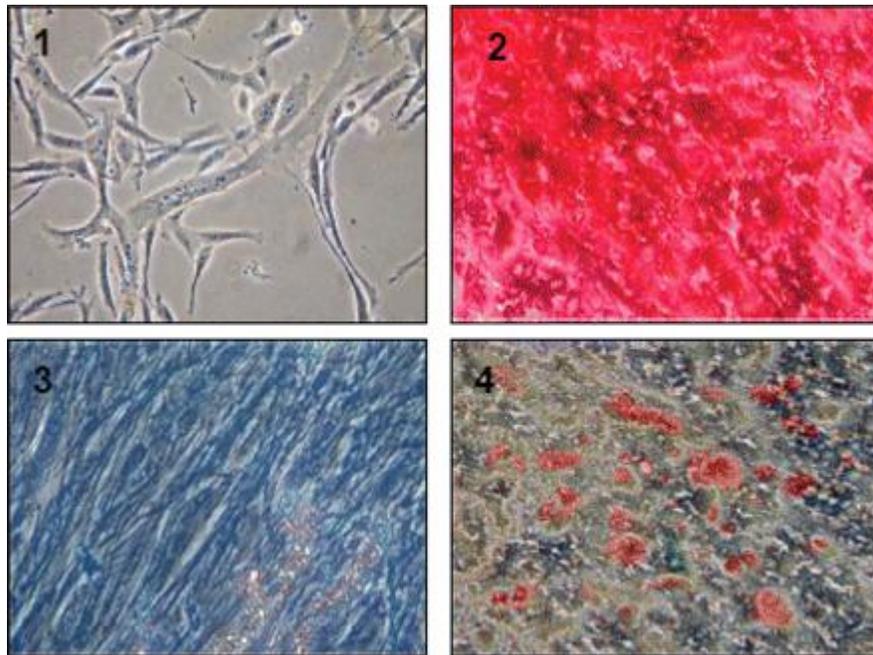


Fig. 11 Diferenciación *in vitro* de células troncales mesenquimales humanas en diferentes linajes celulares como: osteoblastos (2), condroblastos (3) y adipocitos (4). Cultivo indiferenciado (1) ²⁷

2.3 Fuentes de obtención

La principal fuente de células troncales mesenquimales es la médula ósea, aunque diversos estudios señalan la posibilidad de obtenerlas de fuentes diferentes a este tejido.¹ aunque se han aislado de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal.⁴

También se han obtenido células con características similares a las MSC de médula ósea a partir de las paredes de la vena de cordón umbilical. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse a células de linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico y expresan marcadores como CD13, CD29, CD44, CD54, CD90, HLA-Clase I y α -SMA. La detección de MSC en las paredes de la vena de cordón umbilical permite reforzar los estudios que



sugieren que este tipo de células está confinado a las paredes de los sinusoides de la médula ósea.

Cuadro 6. Comparación fuentes de obtención de células troncales mesenquimales⁴

Parámetro	Médula ósea	Sangre de Cordón umbilical	Tejido adiposo
Éxito de aislamiento	100%	30-34%	100%
Formación de monocapa adherente	4-5 días	2-4 semanas	4-5 días
UFC-F obtenidas en la monocapa adherente (número)	83+-61	0.002+-0.004	557+-673
Capacidad de diferenciación osteogénica	71.4%	100%	78.8%
Capacidad de diferenciación adipogénica	100%	0%	94%
Capacidad de diferenciación condrogénica	100%	100%	100%



Expresión antígenos (%)			
CD44	97.5+-5.1	99.7+-0.5	99.8+-0.2
CD73	90.0+-20.0	99.3+-1.3	99.6+-0.5
CD90	99.1+-2.5	97.8+-7.1	99.6+-0.2
CD105	88.1+-7.4	72.4+-20.0	90.4+-5.9
HLA I	95.2+-6.0	94.3+-6.8	98.8+-2.8

Aunque todavía no se cuenta con un protocolo estandarizado para llevar a cabo la obtención y purificación de las células troncales mesenquimales de algunas fuentes y su completa caracterización, sin duda se abra una gran oportunidad de estudio para su aplicación clínica.¹

2.4 Métodos de obtención

Desde los primeros estudios llevados a cabo por los doctores Friedenstein y Owen, encontraron que la población de células que se adhería al plástico en cultivo era heterogénea, tanto en la morfología como en capacidad de diferenciación. Estos autores y años más tarde Kuznetsov, demostraron que no todas las unidades formadoras de colonias de fibroblastos o CFU-F tenían el mismo potencial para dar origen a células de diversos linajes. Por lo tanto se hizo necesario estandarizar las condiciones para cultivarlas y diferenciarlas *in vitro*.

Friedenstein y equipo de colaboradores fueron los primeros en obtener células adherentes de médula ósea, las cuales incluían las células troncales mesenquimales. La metodología establecida por Friedenstein consistía en cultivar células provenientes de médula ósea de organismos adultos, después de un lapso de tiempo retiraba todas las células en suspensión y cultivaba a las células adheridas a la caja de cultivo. Estas células eran



heterogéneas, aunque, después de varias resiembras, predominaban células que crecían en forma de fibroblastos, denominadas células clonogénicas progenitoras de fibroblastos o unidades formadoras de colonias de fibroblastos.

En la década de los años 90, el grupo de colaboradores de Caplan lograron obtener y diferenciar MSC de humanos adultos. Su metodología consistía en obtener médula ósea de aspirados de cresta iliaca de donadores sanos y células de médula de la epífisis femoral. Las células se obtenían en la fracción de baja densidad de un gradiente de Percoll, ya que al utilizar este método se obtiene una población homogénea y pura de células troncales mesenquimales. Después de tres días de cultivo las células no adherentes eran removidas y las células adherentes seguían siendo cultivadas *in vitro*. La mayor parte de las células adheridas tenían morfología fibroblastoide, con pocas células poligonales, adipocíticas o redondas. La frecuencia que reportaron fue de 1 a 5 CFU-F por 100,000 células nucleadas de médula ósea que fueron sembradas. Las colonias se formaban entre los 14 y 21 días; sin embargo, después de ese periodo se daba un crecimiento exponencial y las células cubrían rápidamente el área de cultivo.

La obtención de células troncales mesenquimales mediante gradientes de densidad tiene la desventaja de que en las primeras resiembras se encuentran tanto células endoteliales como macrófagos contaminando los cultivos, por lo que estos son muy heterogéneos. Por esta razón se han tratado de implantar nuevas metodologías que permitan obtener MSC más puras y homogéneas.

Los métodos de separación celular empleados se basan tanto en algunas características físicas de las células, como en su tamaño, así como en las características inmunofenotípicas. En el caso específico de las MSC, se



utilizan anticuerpos dirigidos contra macrófagos, linfocitos, megacariocitos y células endoteliales.¹

2.5 Aplicaciones clínicas

Al día de hoy las aplicaciones clínicas de la terapia celular se limitan a las células madre adultas por lo que de forma fundamental nos enfocaremos a este tipo de células.¹³

La gran capacidad multipotencial y la plasticidad de las células troncales mesenquimales las hacen un blanco perfecto para su aplicación clínica. Según la literatura el uso clínico, presente y futuro, abarca enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco y hematopoyético, entre otros.

Sin duda, el potencial más prometedor del uso de las células troncales mesenquimales es en aquellas enfermedades en las que hasta el momento no existe una terapia curativa, como es el caso de la osteogénesis imperfecta, el infarto al miocardio o la enfermedad de Parkinson entre otras.

Hasta el momento, el uso de estas células en la clínica ha probado no tener riesgos para el individuo, no son capaces de producir teratomas e inhiben el rechazo inmunológico al ser trasplantadas. Es por eso importante continuar con el estudio de estas células para conocer su biología, su capacidad de diferenciación y su papel en diversas enfermedades, así como su aplicación en terapia celular y medicina regenerativa.¹

Una de las principales aplicaciones de las células troncales mesenquimales consiste en la reparación de hueso, que ya ha sido demostrado *in vivo* en ratas y perros con defectos cráneo-faciales y defectos de huesos largos mediante la administración directa de MSC, con matrices como



hidroxiapatita/fosfato tricálcico mostrando resultados satisfactorios en hueso, principalmente cuando la administración de éstas células es *in situ*.

Defectos congénitos en el músculo esquelético como distrofia muscular y otras miopatías, pueden ser teóricamente restaurados con un trasplante de MSC que mejoraría la estructura y función del músculo. Células troncales mesenquimales obtenidas de la membrana sinovial han mostrado *in vivo* potencial miogénico en un modelo de ratón con distrofia muscular de Duchenne.⁴

Otra alternativa importante en la terapia celular es utilizar células troncales mesenquimales para promover la angiogénesis. Varios estudios han demostrado la capacidad de estas células para recuperación del flujo sanguíneo. Existen al menos dos mecanismos para explicar el papel de las MSC en este proceso, en primer lugar existe evidencia experimental que indica la generación e incorporación de células endoteliales derivadas de las células troncales mesenquimales, a los capilares en formación y por otra parte las MSC también promueven la angiogénesis a través de la secreción de citocinas como VEGF-A, FGF-2, IL-6, PIGF y MCP-1.¹

En el área de la endocrinología, recientemente, los resultados positivos obtenidos mediante el trasplante de islotes de páncreas en pacientes diabéticos ha incrementado el interés por utilizar células capaces de producir insulina. Mientras que el escaso número de islotes y la imposibilidad de expandir dichas células *in vitro*, impiden que el trasplante de islotes de cadáver sea utilizable en un número importante de pacientes, la posibilidad de utilizar células troncales con capacidad de diferenciarse en células productoras de insulina se plantearía como una estrategia mucho más atractiva. Aunque hasta el momento no ha sido posible caracterizar la célula madre pancreática, distintos estudios sugieren el potencial de células



obtenidas a partir de hígado, conductos pancreáticos o islotes pancreáticos o incluso células de médula ósea para producir células secretoras de insulina.¹³

En cuanto a padecimientos neurológicos, las células troncales tienen un enorme potencial como células capaces de reconstruir las neuronas y estructuras dañadas en enfermedades como la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, esclerosis en placas, infartos cerebrales o las lesiones medulares por mencionar algunas. El sistema nervioso central añade una dificultad adicional a la terapia celular. Al ser un órgano con una sofisticada organización estructural, las células implantadas han de ser capaces no solo de injertarse, sino asimismo de establecer nuevas conexiones sinápticas e integrarse con el resto del tejido circundante.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que tanto las células troncales embrionarias como las adultas (células troncales de médula ósea, células troncales neurales) son capaces de diferenciarse a neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, no está claro hasta que punto dichas células son capaces de restablecer los circuitos neuronales destruidos en la EP y por tanto eliminar los síntomas de la enfermedad.¹³

Las lesiones medulares, principalmente secundarias a traumatismos, son una de las causas más frecuentes de patología neurológica en edades jóvenes. No existe un tratamiento curativo para esta enfermedad incapacitante, por lo que la posibilidad de utilizar células troncales para restablecer las conexiones axonales aparece como una estrategia especialmente atractiva. Las células mesenquimales (o estromales) de la médula ósea también han demostrado su capacidad para favorecer el recrecimiento de los axones tal como se ha demostrado en modelos animales.



Por la gran incidencia y el elevado coste económico y humano que generan, los accidentes cerebrovasculares son uno de los objetivos más atractivos para la terapia celular. Las evidencias recientes que indican la presencia de un proceso de neurogénesis tras producirse una isquemia cerebral han estimulado el interés por utilizar células troncales para suplementar la regeneración autóloga que se produce espontáneamente. El beneficio de la terapia celular con células troncales podría deberse al aporte exógeno de células con capacidad de neurogénesis o de angiogénesis, o debido a la modulación del microambiente, estimulando la supervivencia y diferenciación de las células residentes en el tejido dañado.

Estudios realizados en animales sugieren que las células de médula ósea son reclutadas a las zonas de infarto cerebral y que contribuyen a la mejoría funcional cuando son inyectadas focalmente e incluso intravenosamente. La inyección de células se asocia con la formación de nuevos vasos, liberación de factores tróficos así como con la expresión de marcadores neurales por parte de las células implantadas.¹³

En cuanto a las enfermedades cardiovasculares, la posibilidad de utilizar células troncales para regenerar el músculo cardíaco destruido ha abierto enormes esperanzas para un número muy importante de pacientes. Es probablemente en este campo donde la experiencia clínica es mayor, habiéndose publicado en la actualidad más de 20 ensayos clínicos de terapia celular en pacientes con infarto de miocardio.

Las células troncales mesenquimales (MSC) son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos como osteoblastos, condrocitos, adipocitos o músculo esquelético, pero a su vez, estudios recientes indican que las MSC son capaces de diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* a cardiomiocitos. *In vitro*, el cultivo de MSC en presencia del agente desmetilante 5-azacitidina induce



diferenciación hacia células con características fenotípicas y electrofisiológicas de músculo cardíaco. Utilizando modelos animales de IM, varios grupos han demostrado que las células madre mesenquimales inyectadas en la cicatriz miocárdica no sólo son capaces de injertarse, sino que adquieren características de cardiomiocitos y, lo que es más importante, contribuyen a mejorar la función cardíaca.^{5, 13}

Se ha planteado la posibilidad de realizar terapia celular en el área de la oftalmología para la renovación de córneas. En dermatología para la renovación de la epidermis tras sufrir grandes quemaduras. En fin, se abre una gran perspectiva para tratar múltiples patologías con el uso de las células troncales mesenquimales como daños hepáticos y enfermedades renales.¹³

Cabe mencionar que esto aún no se ha llevado a cabo en seres humanos, ya que los estudios que se han realizado han sido únicamente *in vitro* (cultivos) e *in vivo* (la mayoría hechos en ratones). Aún falta mucho por conocer y comprender para llevar a cabo este tipo de terapias en seres humanos.



CAPÍTULO 3

APLICACIÓN CLÍNICA EN ODONTOLOGÍA

La odontología clínica está incursionando en una nueva era en donde el enfoque terapéutico es el uso de terapia génica, terapia celular, ingeniería tisular y la medicina regenerativa ampliando múltiples posibilidades al paciente. Una línea de investigación fundamental en ingeniería tisular y medicina regenerativa son las células madre o células troncales.¹⁴

3.1 Células troncales mesenquimales de origen dental

Las células troncales mesenquimales de origen dental poseen un potencial de multidiferenciación y por lo tanto pertenecen al grupo de células troncales mesenquimales, teniendo la capacidad de formar células de carácter osteo/odontogénico, adipogénico y neurogénico.¹⁵ El doctor Songtao Shi fue el primer científico en lograr aislar las células de la pulpa dental.

Los estudios con células troncales enfocadas al área dental han reportado que estas células pueden formar estructuras que parecen complejos pulpa-dentina y ligamento periodontal-cemento radicular respectivamente al ser trasplantadas subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos.

Estos y otros datos experimentales, resaltan el potencial de las células troncales para lograr la regeneración de tejidos dentarios humanos *in vivo*, sin embargo, no se conocen las señales necesarias para la diferenciación a un fenotipo celular específico, por lo que la investigación actual está encaminada a desentrañar cuales son los mecanismos moleculares involucrados en el tránsito de una población celular progenitora con

característica de célula madre a una población comprometida hacia un linaje dental o célula diferenciada.¹⁶

Las células troncales mesenquimales de origen dental se localizan en:

- Pulpa dental de dientes permanentes como terceros molares y dientes supernumerarios.
- Ligamento periodontal.
- Ápice
- Pulpa dental de dientes primarios
- Papilas dentales
- Folículo dental



Figura 12. Ubicación de las células troncales dentales²⁸

Las características que debe poseer el órgano dentario son: que esté libre de caries, excelente salud periodontal, después de la extracción del órgano dentario se debe colocar inmediatamente en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) frío para garantizar el estado celular del tejido pulpar.¹⁶

En la siguiente tabla se detallan las características *in vitro* e *in vivo* más importantes de las células troncales de origen dentario.¹⁵



Tipo de célula	Abreviatura	Características <i>in vitro</i>	Características <i>in vivo</i>
Células troncales de la pulpa dental	DPSC	Multipotencialidad con capacidad: - Osteo/dentinogénica - Adipo y neurogénica* - Condro y miogénica**	Formación de tejido ectópico - Complejo dentino-Pulpar - Células similares a odontoblastos - Tejido óseo similar al original
Células troncales 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 - Células similares a odontoblastos - No existe formación del complejo dentino-pulpar**** -Formación ósea***
Células troncales del ligamento periodontal	PDLS	Multipotencialidad con capacidad: - Osteo/cementogénica - Adipo y neurogénica - Condro y miogénica	Formación de tejido ectópico: - Tejido similar al cemento - Células similares a odontoblastos.



Células troncales de la papila dental	SCAP	Multipotencialidad con capacidad: - Dentonogénica - Adipo y neurogénica Condro y miogénica	Formación de tejido ectópico: - Complejo similar al dentino-pulpar - Células similares a odontoblastos
--	------	---	--

Células troncales 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 cementaría
--	------	---	--

*Una de las 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.

3.2 Localización de células troncales mesenquimales

3.2.1 Tejido Pulpar

Fueron las primeras células troncales que se aislaron. Por analogía con las células troncales de la médula, se consideró que había una comunidad de células multipotenciales en el tejido pulpar de dientes permanentes.

La pulpa dental es un tejido conectivo de baja vascularidad rodeado por dentina, conformado por una población heterogénea de células como:



periodontoblastos, fibroblastos, células estromales, células endoteliales y perivasculares, células nerviosas, entre otras; estas células mantienen la homeóstasis de los diferentes tejidos dentinales mineralizados. La mayoría de las células pulpares son postmitóticas; sin embargo, algunas de estas células aún se dividen y forman capas de nuevas células pulpares con habilidad de diferenciación a odontoblastos y formación de dentina.¹⁴

El origen y la localización exacta de estas células sigue siendo incierto. La producción de estas células es muy pequeña (1 por 100 de todas las células) y según aumenta la edad del individuo, la disponibilidad de estas células se ve reducida. Se han estudiado sobre todo las células que provienen de terceros molares y dientes supernumerarios. Es de suma relevancia que, si las células troncales son aisladas durante la formación de la corona las DPSC son más proliferativas que si se aíslan más adelante. En uso terapéutico ha de tenerse en cuenta su interacción con biomateriales. Las células troncales de la pulpa dental han demostrado que pueden resolver varias cuestiones como: el acceso al lugar donde se encuentran estas células es fácil y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y su mostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular.

Las SBP-DPSCs son otra subpoblación de células troncales dentales capaces de diferenciarse hacia osteoblastos, sintetizando chips de tejido óseo tridimensionales *in vitro* que se pueden diferenciar en osteoblastos y en endotelios. Su asombrosa capacidad de diferenciación les permite dar lugar *in vivo* a hueso adulto con canales de Havers y la apropiada vascularización.¹⁵

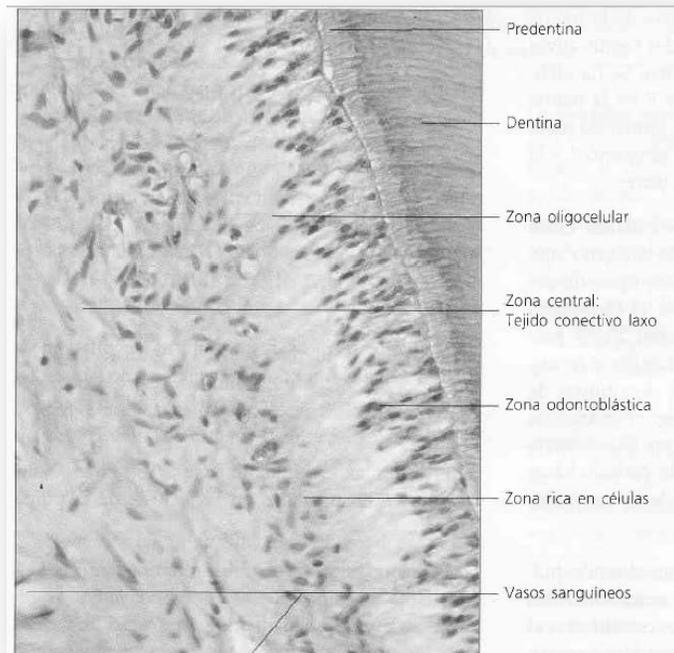


Figura 13. Complejo dentino-pulpar²⁹

Gronthos y colaboradores; caracterizaron estas células por medio de marcadores específicos de MSC y observaron su capacidad de autoregeneración, diferenciación a múltiples linajes celulares y su capacidad clonogénica; hallando DPSC capaces de formar dentina asociada con tejido pulpar *in vivo*. Loara y colaboradores, por medio de la expresión de mRNA de dentina sialofosfoproteína y metaloproteínas de la matriz 20 confirmaron la diferenciación de DPSC en odontoblastos al ser estimuladas por proteínas morfogenéticas óseas.¹⁴

3.2.2 Ligamento Periodontal

Diversos estudios afirman que el ligamento periodontal tiene poblaciones de células que pueden diferenciarse tanto hacia cementoblastos como hacia osteoblastos. La presencia de múltiples tejidos en el periodonto sugiere que

este contiene células troncales llamadas PDLSC (Periodontal Ligament Stem Cells) que mantienen la homeostasis y la regeneración del tejido periodontal.

Los análisis *in vivo* con PDLSC realizados en ratones inmunocomprometidos, sugirieron la participación de éstas células en la regeneración de hueso alveolar al propiciar la formación de una capa fina de tejido muy similar al cemento que, además de contar entre sus componentes como fibras colágenas, se asociaron íntimamente al hueso alveolar próximo del periodonto regenerado.



Figura 14. Periodonto de Inserción. Se observa cemento celular, cemento acelular y ligamento periodontal.²⁹

Las fibras colágenas generadas *in vivo* en humanos, fueron capaces de unirse con la nueva estructura formada de cemento, imitando así la unión fisiológica de las fibras de Sharpey.¹⁵

Estudios publicados por Shi y col. Muestran la expresión de marcadores de MSC como STRO-1 Y CD46 en ligamento periodontal además de una



diferenciación de este tejido en odontoblastos, cementoblastos, adipocitos y células productoras de colágeno *in vitro*.¹⁴

3.2.3 Dientes temporales exfoliados

Se han aislado células de la pulpa remanente de los dientes deciduos exfoliados, denominadas SHED. Los resultados revelaron que ésta, contenía una población de células troncales multipotenciales diferentes a las aisladas anteriormente de la pulpa dental de dientes permanentes.

Conservadas las SHED se consideran una importante fuente de células troncales de fácil obtención. Los dientes deciduos y los permanentes tienen marcadas diferencias en cuanto a su función, proceso de desarrollo y estructura celular y al comparar las SHED con las DPSC, se encontró una mayor velocidad de proliferación y una mayor capacidad de especialización. Un ejemplo revelador es de la existencia, hasta ahora desconocida, de células epiteliales en la pulpa de estos dientes. Aisladas de manera exitosa, se estudia la posibilidad de que jueguen un papel importante en la composición epitelial para reparación o regeneración del diente, ya que sus características morfológicas se correspondían con el fenotipo de células troncales epiteliales pudiendo llegar a expresar marcadores epiteliales.

Las células troncales SHED pueden estimular la nueva formación de hueso por lo que tienen posible aplicación en regeneración ósea craneofacial.¹⁶ Así los dientes deciduos no sólo favorecerían la guía eruptiva de los dientes permanentes también pueden estar involucrados en la inducción ósea durante la erupción del diente permanente.¹⁵

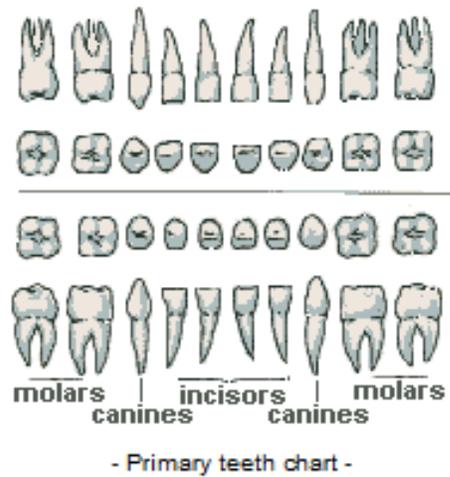


Fig. 15 Dentición primaria. El órgano dentario viable para obtención de células troncales no debe presentar caries.³⁰

3.2.4 Ápice dental

Existe una zona muy rica en células entre la papila apical y la pulpa. Es interesante destacar que, sin estimulación neurológica, las SCAP se muestran positivas para varios marcadores neurológicos, pero cuando se someten a estimulación neurológica, el número de marcadores aumenta notablemente.

Parece que las SCAP son las precursoras de odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular, mientras que las células troncales o madre de la pulpa dental (DPSC) son, probablemente, las precursoras de los odontoblastos que forman la dentina de reparación. Se utilizaron SCAP para conseguir raíces mediante ingeniería tisular utilizando cerdos como modelo experimental y así probar que son una fuente prometedora para las futuras aplicaciones clínicas.¹⁵ La doctora Margarita Zeicher de la Universidad del Sur de California las células troncales del ápice dental son las más viables.

3.2.5 Folículo dental

El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila del germen del diente permanente en formación. Este tejido contiene células troncales que son las que acabaran formando el periodonto, constituido por cemento, ligamento hueso alveolar y encía. Las DFPC han sido aisladas de los folículos dentales de los terceros molares impactados. Son semejantes al resto de las células troncales de origen dental pero constituyen colonias clonogénicas en menor número que los demás tipos.

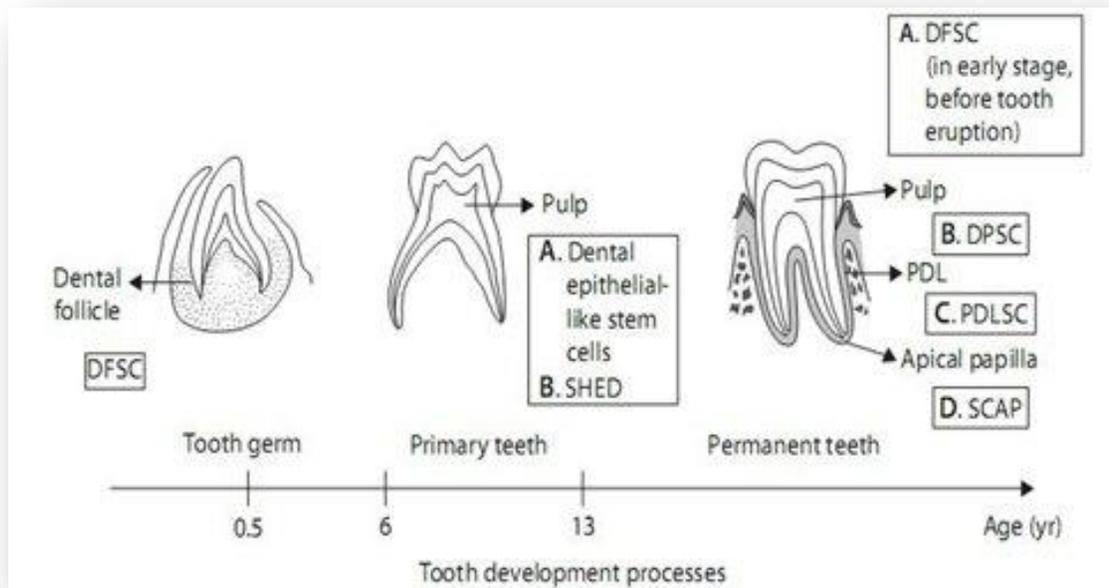


Fig. 16 Diferentes sitios de localización de las células troncales mesenquimales de origen dental ³⁴

In vitro, estas células muestran una morfología típica de fibroblastos. Después de inducción, se ha mostrado diferenciación osteogénica. *In vivo* se ha identificado el antígeno STRO-1 en los folículos dentales. El trasplante de estas células genera una estructura constituida de tejido fibroso rígido. No se ha observado ni dentina, ni cemento, ni formación ósea en el trasplante *in*



vivo. Distintos autores han explicado la posibilidad de que sea debido al reducido recuento celular de los cultivos.¹⁵

Recientemente el Doctor Shi, descubrió que en los restos de *Malasses* abunda una considerable cantidad de células troncales que se mantienen en los tejidos bucales. En Japón se descubrió que en los dientes que sufren algún traumatismo, los restos de *Malasses* aumentan por lo que se consideran células troncales que regeneran cemento y el ligamento periodontal.³⁷

3.1 Aplicaciones clínicas en odontología

La ingeniería tisular basada en células troncales dentales tiene un futuro prometedor dentro de las ciencias sanitarias.¹⁵

Se han descrito evidencias en las que las células troncales de tejido no neural pueden ser capaces de diferenciarse en células neurales. Las células troncales de la pulpa dental son capaces de producir factores neurotróficos e incluso rescatar motoneuronas después de una lesión de la médula espinal.³⁵

Por tanto, podrían ser un recurso importante para reparar lesiones de tejidos dentarios, inducir regeneración ósea y posiblemente tratar lesiones del tejido nervioso e inclusive enfermedades degenerativas. Se requieren más estudios en cuanto a su importancia biológica y su posible aplicación en terapias celulares.

Los implantes se han convertido en una de las terapéuticas más frecuentes en la presente década. El mayor problema de la técnica implantológica reside en su falta de contorno natural y la relación con el hueso alveolar: no tiene ligamento periodontal. Éste hecho ha sido suficiente para buscar otro tipo de



alternativas y, así, la regeneración dentaria experimental ha sido probada en la formación ectópica de tejidos parecidos a los dentarios en estructuras *in vivo* dando excelentes resultados.

Las células troncales mesenquimales de origen dental pueden ser usadas para promover la apicogénesis y apicoformación. La repoblación del ápice abierto, propio de los dientes inmaduros, con células troncales capaces de ser dirigidas hacia una estirpe tisular concreta y que regeneren el tejido natural podría suponer una nueva alternativa de tratamiento para los pacientes que han sufrido un gran daño en un diente inmaduro. Una combinación de células troncales y los factores de crecimiento pueden usarse en regeneración tisular *in vivo* o *in vitro*. Estudios periodontales sugieren que las células pueden proliferar y migrar desde el ligamento sano adyacente hasta el área dañada.¹⁵

De gran relevancia, es el uso que se les da a las células troncales dentales en la reparación de defectos óseos debidos a una lesión, enfermedad y/o desordenes congénitos.¹⁴ El 5 de julio del año 2010 se realizó en México, el primer trasplante de células troncales dentales por especialistas e investigadores del hospital Juárez de México, la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y BioEden Inc. México (empresa dedicada a la preservación de células troncales dentales con sede en Austin, Texas) a un joven paciente que presentaba quistes en la zona mandibular y al cual le fue practicada una resección parcial de mandíbula. Se le trasplantaron células troncales las cuales fueron generadas a partir de su tercer molar, El Cirujano Maxilofacial Rodrigo Liceaga dijo que lo más importante en esta cirugía es que las células que serán trasplantadas provienen del mismo organismo del paciente, lo cual es un avance en la medicina regenerativa mexicana.³² El propósito de este procedimiento es la regeneración de tejido óseo en la zona mandibular del



paciente en tan sólo una tercera parte del tiempo que tardaría de manera natural, de seis meses a alrededor de mes y medio.¹⁷

Después de realizar la extracción de los órganos dentales 38 y 48, los investigadores de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, extrajeron su pulpa, que contiene células troncales para así comenzar los procedimientos que las hicieran proliferar. Pero este tipo de células —que pueden dividirse y transformarse en otras para producir órganos y tejidos, además de reparar el sistema inmunológico— tienen varios y particulares puntos de origen, de hecho toda persona cuenta con ellas, pero mientras más jóvenes mejor, dicen.

Sin embargo, el caso de las células troncales dentales es especial, según los científicos mexicanos, puesto que su obtención no es invasiva, o dolorosa como una aguja en la médula ósea, además de ser “relativamente barato” en su reproducción, conservación e implantación.³³

La posibilidad de almacenar estas células, mediante la extracción en la niñez de un órgano dental primario, por ejemplo, y utilizarlas en un futuro cuando se pueda desarrollar algún padecimiento en la adultez, es igual para el mismo donador como para sus padres, hermanos o hijos. “Los mismos hijos pueden ser donadores de sus padres”, puntualizó Marc Saadia, director del banco de células troncales dentales BioEden México. Sin embargo, recalcó que, son tecnologías que se podrán usar de manera más común en al menos cinco o diez años más.



Fig. 17 Procedimiento del trasplante de células troncales en el Hospital Juárez de la Ciudad de México ³¹

Algunos investigadores de la Universidad del Sur de California se han planteado la posibilidad de crear raíces dentales para sustituir a los dientes perdidos por piezas más biocompatibles que los actuales implantes metálicos. Han conseguido generar nuevas raíces dentales en cerdos gracias a células troncales procedentes de dientes de seres humanos. Seis meses después de su implantación los investigadores comprobaron que, aunque el nuevo diente no era tan resistente como los naturales tenían la suficiente calidad como para cumplir su función. ¹⁴

Esta terapia sería la indicada en pacientes que no son candidatos a los implantes convencionales ya sea porque no cuentan con suficiente tejido



óseo para soportar el implante o aquellos pacientes que prefieran tejidos vivos derivados de sus propios órganos dentarios.

También se ha propuesto la creación de nuevas pulpas dentales para depositarlas en un diente permanente con necrosis pulpar al que previamente se le ha realizado un tratamiento de conductos.¹⁴



CAPÍTULO 4

REALIDAD DE LAS CÉLULAS TRONCALES

Hasta este momento resulta muy atractivo el amplio campo de aplicaciones clínicas de las células troncales mesenquimales en especial de origen dental.

Existe gran desinformación al respecto, los bancos privados que preservan células dentales han dado una publicidad exagerada de los innumerables beneficios que nos darían éstas células. Ellos aseguran que estas células son milagrosas, una esperanza de vida, que pueden curar muchas enfermedades con sólo preservar un diente, ¿En realidad las células troncales que se encuentran en los dientes tienen el potencial para curar múltiples patologías?, ¿Duran toda la vida?, ¿Pueden ser utilizadas por todos los miembros de la familia desde los abuelos, padres y hermanos?, estas y muchas preguntas son respondidas afirmativamente por ellos, desgraciadamente la realidad es otra.

El uso de las células troncales mesenquimales es limitado aunque es verdad que se pueden diferenciar en múltiples tejidos. Aún no se cuenta con una técnica estándar en la que las células que se encuentran en cultivos se mantengan en estado de proliferación ya que inmediatamente éstas pasan al estado de diferenciación. Estando en cultivo pueden formar grandes colonias y producirse en número mayor, esto puede considerarse como una ventaja pero aplicadas en seres humanos puede que no sea así. El número de células troncales mesenquimales que se encuentran en un órgano dental son mínimas.

Las células troncales mesenquimales *in vitro* son las que se han empleado para llevar a cabo la mayoría de los estudios y los estudios que se han realizado *in vivo* se practican principalmente en ratones.

Una ventaja importante es que no producen teratomas como las células troncales embrionarias, aunque en cierta medida el hecho de que se produzca un teratoma refleja que en realidad son células troncales o células madre.

Cabe destacar que sólo existe la **posibilidad** de curar diversas enfermedades pero esto no quiere decir que sea **funcional**, ya que falta mucha información al respecto y todo lo que dicen los bancos son promesas que no sabemos a ciencia cierta si se cumplirán.

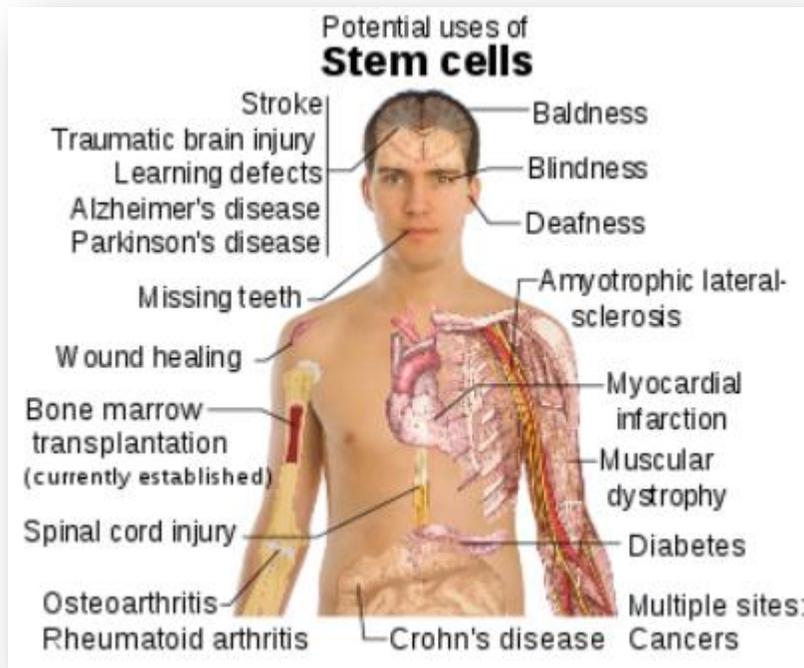


Fig. 18 Lista de las enfermedades que prometen curar con células trocales³⁶

Las células troncales mesenquimales de la pulpa ayudan a formar la dentina de reparación pero esto no significa que puedan llegar a formar un diente con todas las características biológicas que posee un diente natural, con la adecuada resistencia que le devuelva la eficiencia masticatoria al paciente. Lograr crear un diente es muy complicado.



Fig. 19 Diente creado en cultivo por el doctor Jeremy Mao en la Universidad de Colombia, el cual sólo está conformado por dentina³⁸

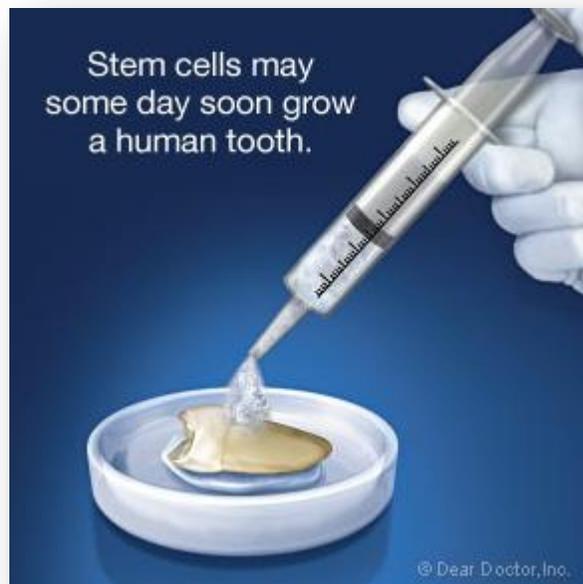


Fig. 20 ¿Algún día se podrá crear un diente con células troncales? Realidad o Ficción³⁹



Los usos que se proponen son en los tratamientos periodontales, no extrayendo las células troncales sino trabajando con las que se encuentran en los tejidos para que puedan multiplicarse.

Las células troncales mesenquimales de la médula ósea son la alternativa más viable. Aunque el tratamiento es doloroso y generalmente se extrae la médula ósea del hueso ilion.³⁷

En cuanto a la pregunta ¿Pueden ser utilizadas por todos los miembros de la familia desde los abuelos, padres y hermanos? Las células troncales mesenquimales de origen dental de un paciente pueden no ser compatibles con el resto de la familia, un claro ejemplo: Cuando un paciente con leucemia, se le va a realizar un trasplante de médula ósea en muchas ocasiones el donante no puede ser uno de los padres o hermanos porque entre ellos no existe compatibilidad.

La vida máxima de las células troncales mesenquimales es de 20 o 30 años, sin embargo, puede que durante ese periodo se modifiquen sus propiedades. Esto aún no se sabe, todo depende de la criopreservación de las células. Cabe recordar que al momento de congelar se pierden muchas células. Muchos bancos de células madre dentales no están certificados por lo que se duda que las células troncales mantengan sus propiedades hasta que el paciente las requiera.³⁷



4. CONCLUSIONES

El estudio de las células troncales mesenquimales representa un área de la biomedicina que ha tenido y tendrá un crecimiento significativo, no solo por su relevancia en la terapia celular sino para el estudio y el tratamiento de diversas patologías.

Las células troncales mesenquimales son una importante alternativa al uso clínico de las células troncales embrionarias ya que esto representa una enorme controversia ética, además de que las células troncales embrionarias pueden llevar a provocar teratomas y terocarcinomas debido a que son células pluripotenciales.

A pesar de tener en la actualidad una idea de lo que son las células troncales mesenquimales, todavía queda mucha información faltante en la biología de estas células, por lo que será muy importante que en los próximos años surjan trabajos que aclaren estos aspectos, por ejemplo, su funcionalidad puede variar dependiendo de la interacción directa con otras células o de la liberación de factores solubles específicos de cada microambiente; por eso es importante no generalizar su uso terapéutico ya que se debe considerar las variaciones observadas según la fuente de obtención, el número de células utilizadas y el microambiente donde se desean utilizar.

En el área odontológica, las aplicaciones clínicas que se prometen con la preservación de un diente todavía no se pueden comprobar debido a que la cantidad de células que se encuentran en los órganos dentales son insuficientes para llevar a cabo tratamientos. Existe mucha desinformación al respecto, generada por los bancos que preservan estas células, ellos tergiversan la información que obtienen de múltiples publicaciones científicas; haciendo creer al público que guardando un diente temporal, se



pueden curar múltiples enfermedades que puede presentar el niño más adelante. En el caso de la cirugía que se llevó a cabo en México aún falta ver si existe una publicación científica referente a ello y lo más importante los resultados que se obtuvieron.

10 años o más, es el tiempo que se estima para poder utilizar las células troncales mesenquimales en seres humanos. Aún falta mucho por conocer y comprender. Sin embargo, la terapia celular está considerada la medicina del futuro y no dudo que se logren grandes avances, siempre y cuando sea con evidencia científica y no con publicidad.

En la fase inicial del desenvolvimiento científico, en la formulación de hipótesis, el investigador se guía por la imaginación lo mismo que el artista. Solamente después, cuando surge la prueba crítica de la experimentación, la ciencia se separa del arte y sigue una vía distinta.

*François Jacob
Noviembre, 1997*



5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Flores-Figueroa E y col. Células troncales mesenquimales. Rev Invest Clin 2006; 58 (5): 498-511.
2. Stewart Sell, MD, Stem cell handbook. Estados Unidos, Humana Press, 2004 p. 143.
3. Owen M, Friedenstein AJ Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. Ciba Foundation Symposium 1988; 136: 42-60.
4. Arévalo Romero JA, et al. Células madre mesenquimales. Nova Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 2007; 5 (8): 177-184.
5. González G, Sánchez D y Sosa C. Terapia celular con células madre y medicina regenerativa, México D.F, editorial Alfil, 2009.
6. Maillet, M. Biología celular. 2ª edición. Masson, 2003.
7. Jacobi, J. Textos esenciales de Paracelso. 2ª edición, ed. Siruela, España 2007.
8. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther 2007.
9. Sánchez GDJ, Trejo BNI. Biología celular y molecular. México, Alfil, 2007.
10. Flores Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic síndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. Leuk Res 2005; 29:215-24.
11. Hebertson A, Aubin JE. Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures. Bone 1997; 21: 491-500.
12. Bianchi C, Callero F, Hidalgo A, Argibay P. Células mesenquimales de médula ósea. Diferenciación y potencial reemplazo neuronal. Medicina (Buenos Aires) 2004; 64: 543-549.



13. Prósper F, Gavira J.J, Herreros J. Trasplante celular y Terapia regenerativa con células madre. Anales Sis San Navarra v.29 supl.2 Pamplona mayo-ago. 2006.
14. Mérida I. "Bioingeniería y su aplicación en ortodoncia". Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría "Ortodoncia.ws edición electrónica Abril 2011.
15. González O. Investigación con células madre de origen dentario. Gaceta dental. España, 2011.
16. Magallanes M, Carmona B, Álvarez M. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. Rev. Odontológica Mexicana (2010). 14(1): 15-20.
17. <http://www.celulasdentales.com/primer-trasplante-de-celulas-madre-dentales-en-mexico/>
18. Trainini J, Lago N, Chachques J. Células madre lo que sabemos. Presente y Futuro. Ed Lumen México. Argentina, 2010.
19. Nombela C y Vallés C. Células madre. Debates científicos. Ed Catarata, España, 2010.
20. <http://www.equinoxio.org/paul-niehans/>
21. <http://www.reproduccionasistida.org>
22. <http://www.sciencestage.com>
23. <http://edgarlpz.blogspot.com/2011/03/mitosis-y-meiosis.html>
24. <http://www.ctt-journal.com/1-3-afanasyev-et-al-2009june13.html>
25. <http://www.bjcvs.org/article/1319>
26. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-011110-130230>
27. http://bjr.birjournals.org/cgi/content/full/80/Special_Issue_1/S49/F1
28. <http://www.store-a-tooth.com/sp/index#.TpyOuLk-ul>
29. Gómez de Ferraris ME. Histología y embriología bucodental, 2ª edición. Ed. Panamericana, 2002.
30. <http://users.forthnet.gr/ath/abyss/dep1171.htm>



-
-
31. <http://www.celulasdentales.com>
 32. <http://impreso.milenio.com/node/8793536>
 33. <http://odonto-cucs.blogspot.com/2010/08/realizan-el-primer-trasplante-de.html>
 34. http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_genomics_and_proteomics/volume_6_number_1_50/article_printable/paving-the-way-for-future-solutions-through-human-exfoliated-deciduous-teeth-shed.html
 35. Huang GTJ, Grothos 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.
 36. <http://juanaymell.blogspot.com/>
 37. Ponencia: La verdadera historia de las células madre en odontología por la Doctora Margarita Zeichner David. Médica Sur, 2011.
 38. <http://www.healthjockey.com/2010/05/27/tooth-regeneration-now-possible-by-bodys-own-stem-cells-suggest-new-technique/>
 39. <http://www.deardocor.com/articles/stem-cells/>