

Revisiones Bibliográficas:

ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES DE LAS CÉLULAS MADRES INVOLUCRADOS EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS CON APLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Recibido para arbitraje: 10/08/2006

Aceptado para publicación: 08/05/2007

- **Juan Carlos Munévar Niño** Od. MSc, D.E.A. Coordinador Cultivo celular y Regeneración Tisular(*), **Andrea del Pilar Becerra Calixto** BCI, Investigador Asistente*, **Claudia Bermúdez Olaya** Estudiante(*),

*Instituto Unidad de Investigación Básica Oral (U.I.B.O). Facultad de Odontología. Universidad El Bosque, Bogotá Colombia. (Transversal 9A Bis No. 132 - 55) Correspondencia: munevarjuan@unbosque.edu.co

Abstract:

The medicine and dentistry entering a new era in which the new therapy approaches like genetic therapy, cellular therapy, engineering tissue and regenerative medicine they extended the arsenal of possibilities for our patients. The Stem cells in the field of regenerative medicine, by its characteristics of self renewal, expansion and differentiation, have shown to be an important alternative for the treatment of pathologies and to alterations in the teeth and periodontal structures.

The tissue regeneration it implies the replacement of tissues affected with identical cells that can be generated from the stimulation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) by different involved molecular and cellular mechanisms in the dental morphogenesis; for that reason different options look for to facilitate the use of MSCs like clinical treatment of periodontal diseases and functional oral injury.

Key words: Adult Stem cells, Engineering Tissue, Oral regeneration

Resumen:

La medicina y odontología clínica están entrando en una nueva era en la cual los nuevos enfoques terapéuticos como la terapia génica, la terapia celular, la ingeniería tisular y la medicina regenerativa ampliarán el arsenal de posibilidades para nuestros pacientes. Las células Madres en el campo de la medicina regenerativa, por sus características de autorrenovación, proliferación y diferenciación, han mostrado ser una importante alternativa para el tratamiento de patologías y alteraciones en los dientes y estructuras periodontales.

La regeneración tisular implica el reemplazo de tejidos afectados con células idénticas que pueden ser generadas a partir de la estimulación de células Madres mesenquimatosas (MSCs) por diferentes mecanismos moleculares y celulares involucrados en la morfogénesis dental; por ello se buscan diferentes opciones para facilitar la utilización de MSCs como tratamiento clínico de enfermedades periodontales y traumas bucales funcionales.

La estandarización de protocolos para la obtención de ASCs autólogas de diferentes tejidos, eliminará problemas de rechazo inmunológico, permitiendo una completa regeneración funcional de los tejidos de la cavidad bucal.

Palabras Clave: Células Madres Adultas; Ingeniería de Tejidos; Regeneración oral.

Durante décadas los tratamientos para patologías y alteraciones en los dientes y estructuras periodontales han sido un tema de intensa investigación. En efecto, las enfermedades dentales, periodontales y craneofaciales además de los traumas se presentan de manera significativa en la práctica clínica odontológica. Un reciente estudio de World Oral Health en el 2003, reveló una cifra de aproximadamente cinco millones de personas en todo el mundo que presentaban alguna patología oral (1), mientras que otro estudio reporta más de 1.4 millones de casos, en los cuales alrededor del 97% de los dientes tratados permanecen funcionales por un periodo de 8 años (2). Por estas razones, en los últimos años, se han buscado nuevas opciones para el tratamiento de enfermedades dentales, periodontales y craneofaciales que generan secuelas estructurales y fisiológicas irreversibles en los pacientes (3,4).

El remoto origen de esta fascinación se remonta a la antigua Grecia. En la mitología griega, la hidra de múltiples cabezas casi derrota a Heracles pues le crecían dos nuevas cabezas por cada una que cortara el héroe y el hígado de Prometeo encadenado devorado por un águila hambrienta cada noche, se regeneraba a la mañana siguiente. Aristóteles (384 - 322 a.c.), observaba

como se regeneraban las colas de lagartos y serpientes, así como los ojos de las golondrinas (5). En el siglo XVIII científicos como Abraham Trembley, Charles Bonnet, Peter Simon Pallas, y Lázaro Spallanzani; descubrieron notables habilidades de regeneración en una variedad de organismos como las hidras, los gusanos de tierra, los caracoles, las ranas premetamórficas, lagartijas y salamandras. Por esas razones, en el transcurso del siglo XIX y parte del siglo XX la investigación en regeneración tisular se enfocó primordialmente en la fenomenología de la regeneración y sus fundamentos celulares (6).

Hace unos años se pensaba que los tejidos humanos solo podían tratarse quirúrgicamente mediante injertos, por trasplantes procedentes de donantes, con la aplicación de biomateriales sintéticos o mediante dispositivos artificiales. Era difícil vislumbrar que se diseñarían tejidos y órganos sintetizados en el laboratorio como opción para el alivio del sufrimiento causado por el daño irreparable de los tejidos (4). Por ende, surgió la ingeniería de tejidos para diseñar estrategias terapéuticas novedosas que permitan sintetizar *in vitro* análogos de tejidos para el tratamiento de patologías con secuelas irreversibles y así mismo restituir *ad integrum* la estructura anatómica y la función tisular de los órganos afectados (1).

La medicina y odontología clínica están entrando en una nueva era en la cual los nuevos enfoques terapéuticos como la terapia génica, la terapia celular, la ingeniería tisular y la medicina regenerativa ampliarán el arsenal de posibilidades para nuestros pacientes. Una línea de investigación fundamental en ingeniería tisular y medicina regenerativa son las células madres (7).

Las células madres se han definido como células clonogénicas, con un amplio potencial de auto *renovación* (definida como la capacidad de generar al menos una célula hija con características similares a la célula de origen, manteniéndose al mismo tiempo en un estado indiferenciado), así como la elevada capacidad de *proliferación* (posibilidad de la célula para dividirse sin cambiar su fenotipo celular indiferenciado) y su potencial de *diferenciación* (potencial para modificar el fenotipo de la célula de origen en distintos tipos celulares diferentes al tejido embrionario original en varias líneas celulares como médula ósea, sangre periférica, cerebro, piel, pulpa dental y ligamento periodontal, entre otros) (8,9,10).

La biología, las propiedades, clasificación, fenotipos, mecanismos celulares y/o moleculares, bioquímicos, de señalización y las probables aplicaciones terapéuticas de las células madres se han estudiado durante décadas. Podemos clasificarlas según su **capacidad de proliferación y diferenciación** en *totipotenciales* (células que tienen el potencial de dar origen a un organismo completo incluyendo el tejido germinal), *pluripotenciales* (células que pueden dar origen a células de las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo); y *multipotenciales* (son células comprometidas en una línea celular específica y dan origen a células de un órgano o tejido particular) (11,12).

CÉLULAS MADRES ADULTAS

Las células madres multipotenciales, se consideran órgano-específicas y se localizan en tejidos embrionarios y fetales además en tejidos completamente formados de los organismos adultos. Se denominan Células Madres Adultas (ASCs), pues originan células progenitoras y precursoras relacionadas solo con una de las tres capas embrionarias, sin embargo, esta definición está sujeta a controversias. En efecto, en recientes estudios, se sugiere que las ASCs, pueden diferenciarse en otras líneas celulares distintas de las pertenecientes a su capa germinativa de origen, como ejemplo podemos mencionar a las células Madres Hematopoyéticas (HSCs), aisladas de médula ósea o bien de sangre de cordón umbilical humano, que además, de originar células sanguíneas, poseen *in vitro* el potencial de generar células musculares, neuronales y adiposas (6,10,13,14).

Las ASCs se han caracterizado en distintos tejidos, lo que genera una excelente opción para su posterior utilización terapéutica. En efecto, las ASCs no despiertan los dilemas éticos generados por las Células Madres Embrionarias (ESCs) responsables de grandes controversias científicas, académicas, religiosas y éticas a nivel mundial (6). Las propiedades únicas de las ASC, como el mantenimiento del fenotipo indiferenciado concomitante con la habilidad de autorreplicación por largos periodos de tiempo, la elevada capacidad de proliferación y su potencial de plasticidad o transdiferenciación, permitirán el uso de este tipo de células como alternativa de tratamiento para modular la regeneración tisular de epitelio, miocardio, médula ósea, neuronas y células de la neuroglía, células ? de páncreas, tejidos dentales, pulpares y periodontales, entre otros, para tratar enfermedades como infartos, diabetes y síndromes degenerativos (3).

Los diferentes tipos de ASCs multipotenciales identificados, con las características mencionadas anteriormente expresan un fenotipo hematopoyético (Hemopoietic Stem cells [HSCs]), mesenquimatoso (Mesenchymal Stem cells [MSCs]), estroma de médula ósea (Bone Marrow Stromal Stem Cells [BMSCs]) pulpa dental (Dental Pulp Stem Cells [DPSCs]), hepáticas, entre otras (15).

Células Madres Hematopoyéticas

Las HSCs han sido las más estudiadas e identificadas tanto *in vitro* como *in vivo* por varios laboratorios y utilizadas clínicamente desde hace más de 50 años. El trasplante alógeno de progenitores hematopoyéticos ha demostrado definitivamente que posee células madres multipotenciales hematopoyéticas en la médula ósea y en la sangre periférica (16). Además del potencial hematopoyético, diversos trabajos recientes indican que las HSCs bajo ciertas circunstancias presentan mayor plasticidad por la capacidad de diferenciarse a tejidos derivados de distintas capas embrionarias (17). Las células madres hematopoyéticas de médula ósea y de sangre periférica son capaces de contribuir a la angiogénesis y vasculogénesis *in vivo* de tal forma que las células CD34+ no sólo contienen progenitores hematopoyéticos sino también células progenitoras endoteliales (17). Hoy en día se acepta que existe un progenitor común endotelial y hematopoyético conocido como hemangioblasto, concepto sustentado por los hallazgos relacionados con el potencial endotelial de las células madres

hematopoyéticas de la médula ósea (18). Estudios recientemente publicados apoyan la capacidad de las HSCs de diferenciarse en células de músculo cardíaco al ser estimulados *in vitro*. El grupo de Orlic y Anversa han demostrado en un modelo de infarto de miocardio murino, como la inyección de células de médula ósea Lin- y c-kit+ CD34+ (fenotipo característico de HSCs) en el área lesionada del corazón colonizan más de la mitad del área infartada. Estas posibles HSCs adquirieron un fenotipo característico de células de miocardio y contribuyen a la mejora y supervivencia de los animales (18). La contribución de las células madres adultas a la regeneración cardíaca ha sido sugerida en modelos de trasplante cardíaco en humanos. El grupo de Lagasse y colaboradores han demostrado que HSCs de médula ósea con el fenotipo Lin-, c-kit+, Thy-1, Sca-1 son capaces de hepatocitos murinos en un modelo de daño hepático fulminante (19). El potencial de las HSCs para adquirir características de músculo esquelético, neuronas adultas así como células de la glía, y de contribuir a otros tejidos como el epitelio pulmonar, gastrointestinal, renal o a la piel se ha descrito recientemente *in vivo* (20).

Células Madres Mesenquimatosas

Las células Madres Mesenquimatosas (MSCs) humanas, se han aislado principalmente del estroma de la médula ósea, tejido adiposo, sangre, gelatina de Wharthon de cordón umbilical humano, dermis y piel. Las MSCs presentan un gran potencial de generar cartílago, hueso, músculo, tendón, ligamento y tejido adiposo, entre otros (13,14, 21).

Una célula es identificada por consenso internacional como célula madre o Stem cell cuando se detecta la expresión de varios marcadores fenotípicos específicos que reflejan la presencia (+) y/o ausencia (-) de antígenos característicos en esa(s) célula(s) (6). En efecto, estudios realizados han demostrado que las MSCs se caracterizan por expresar marcadores positivos para CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD117 (c-kit), CD166 y STRO-1 y negativos para CD11a, CD11b, CD14, CD33, CD34, CD28, CD45, como fenotipo característico de HSCs (9, 10, 20).

PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRES ADULTAS EN EL DESARROLLO CRANEOFACIAL.

En general, durante el desarrollo craneofacial la formación ósea se puede dar por dos vías: la osificación intramembranosa y la osificación endocondral. La osificación intramembranosa, se caracteriza por ocurrir a nivel embrionario durante la formación y desarrollo de la mayor parte del esqueleto craneofacial. La osificación endocondral es más característica del esqueleto postcraneal, también ocurre en la base del cráneo y en la articulación temporomandibular (22). El cartílago se forma a partir de la condensación de células mesenquimatosas seguido de un proceso de maduración condrocitaria. Durante este proceso, el cartílago es invadido por vasos sanguíneos de donde las células osteoprogenitoras se diferencian para sustituirlo por hueso (23). Una vez las estructuras óseas están formadas, la arquitectura morfológica del hueso es regulada por osteoclastos y osteoblastos cruciales para un constante proceso de remodelado óseo (24).

El desarrollo y crecimiento sutural podría considerarse como una forma especializada de crecimiento de hueso intramembranoso en donde las células óseas se originan a partir de MSCs localizadas en el blastema sutural bajo influencia de la duramadre subyacente y el cartílago capsular nasal (25). El crecimiento de las suturas óseas en desarrollo depende del mantenimiento del balance entre proliferación y diferenciación de las células madres a células óseas para sintetizar las moléculas de la matriz extracelular del tejido óseo y su posterior biomineralización. De este modo, la población de células madres se mantiene hasta que el crecimiento craneal este completo (24,26). Así mismo, el desarrollo y crecimiento del cóndilo mandibular (caracterizado por la presencia de cartílago) de la articulación temporomandibular, es una forma especializada de crecimiento esquelético intramembranoso asociado con células madres precursoras dentro de la capa precondroblástica o proliferativa (27,28).

Una vez formado el hueso, la resorción y aposición ósea están moduladas por el periostio, el cual depende de la generación de osteoblastos y osteoclastos derivados de poblaciones de células madres progenitoras en esta capa osteogénica (23).

Células Madres Adultas. Formación y erupción dental.

En el transcurso del proceso de erupción y formación dental la diferenciación de células Madres osteoblásticas y osteoclasticas es absolutamente necesaria para controlar la sincronía de las fases a lo largo de la vía de erupción y su respectivo movimiento dental. Para crear la vía de erupción por resorción alveolar ósea activa es fundamental el reclutamiento de osteoclastos (29). La diferenciación y proliferación de preosteoclastos pueden ser activadas por el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), el ligando del factor nuclear kappa B (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG) (28).

La activación de factores de transcripción específicos por medio de citoquinas y factores de crecimiento, estimulan la diferenciación a osteoclastos localizados en el periostio periférico al folículo dental que permite inducir la osteogénesis durante la formación del periodonto. Para la activación del osteoclasto, debe actuar el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) (localizado en osteoblastos y células del estroma de la médula ósea) acoplado al receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) (localizado en preosteoclastos). La osteoclastogénesis está regulada por la osteoprotegerina (OPG) que al unirse con RANKL neutraliza el proceso de actividad osteoclastica (30).

Durante el movimiento dental, la diferenciación y activación osteoclastica es regulada en mayor parte por RANKL posiblemente producido en células estromales y osteoblastos de tejido periodontal. Según Shiotani y colaboradores en el 2001, la molécula RANKL se localiza en tejidos periodontales durante el movimiento experimental de molares en ratas. Esa expresión de RANKL se detectó en osteoblastos, osteocitos y fibroblastos, principalmente en el citoplasma, retículo endoplasmático rugoso, y membrana plasmática (31). El RANKL, se expreso en los osteoblastos del tejido periodontal, durante la erupción dental y el movimiento ortodóntico. De este modo, la erupción dental y el movimiento ortodóntico requieren una compresión y retracción

del periodonto lo cual estimula la proliferación y diferenciación de las poblaciones de células madres lo que ocasiona una resorción ósea y regeneración en ese medio ambiente local (31). Estos hallazgos sugieren un posible papel de RANKL en la diferenciación osteogénica de las células madres.

Se ha demostrado *in vitro* que el comportamiento de las células Madres adultas está modulado por factores solubles liberados por las células óseas (16). Heino y colaboradores utilizaron la línea celular MLO-Y4 para estudiar la proliferación, diferenciación y osteoformación a partir de MSCs de médula ósea a osteocitos (32). Se observó un incremento cuatro veces mayor de formación ósea y dos veces mayor en la proliferación de MSCs, al utilizarse el medio de cultivo condicionado con la línea celular osteocítica MLO-Y4. Lo anterior indica que el medio de cultivo de osteocitos estimula la proliferación de las MSCs y su diferenciación a osteoblastos. Sin embargo, se desconocen los factores en los osteocitos que condicionan el medio para inducir a la diferenciación; se presume que las señales entre osteocitos y MSCs ejercen una actividad estimulante de distinta naturaleza desempeñando un papel importante en el control de la formación ósea.

La proliferación y diferenciación de osteoblastos y osteoclastos a partir de células Madres progenitoras mesenquimatosas y/o hematopoyéticas respectivamente son importantes en el crecimiento y el desarrollo postnatal controlado por factores solubles locales como; morfogenes, factores de crecimiento, citocinas, neuropéptidos y hormonas. Los factores de crecimiento estimulan la proliferación y diferenciación celular mediante la activación de receptores específicos en células blanco. Muchos de los factores de crecimiento se encuentran en forma activa asumiendo diversas funciones en diferentes periodos durante el crecimiento y desarrollo de órganos y tejidos corporales (33,34). La vía de señalización del factor de crecimiento transformante (TGF) ocupa una posición central dentro de las vías de señalización desencadenadas por factores solubles que controlan el crecimiento, diferenciación y destino en las células (35). El TGF induce las células alterando la expresión de los genes como el c-myc y junB controlando la proliferación celular. Warner y colaboradores en el 2003, demostraron que la familia del TGF son reguladores críticos en el desarrollo orofacial de los mamíferos debido a diferencias de expresión por gradientes espaciotemporales en sitios tisulares específicos controlando la proliferación celular y crecimiento del tejido (36). Hormonas como la de hormona de crecimiento, también están involucradas en la formación ósea por medio de la estimulación de precursores óseos o células madres para su proliferación, seguido de una expansión clonal y promoción de la diferenciación hacia linajes osteogénicos (37).

Moléculas de señalización implicadas en la diferenciación y regeneración dental.

Los morfogenes, son señales secretadas a nivel extracelular, dirigiendo la morfogénesis durante las interacciones epitelio-mesénquima. Las vías de señalización morfogenética incluyen cinco clases de genes altamente conservados durante la evolución: proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), proteínas internas wingless (Wnts), proteínas Hedgehog (Hhs), y las moléculas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (29,38). Estas familias de genes están principalmente involucradas durante el inicio de la morfogénesis y cito diferenciación (39).

La familia de las BMP, relacionada con la formación y erupción dental, están formadas por seis diferentes clases (BMP2 a BMP7) que son co-expresadas según gradientes temporoespaciales (40). Diez miembros de la familia de las BMP's (BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP8), factor de crecimiento de diferenciación (GDF) 1, GDF5, GDF6, GDF7, GDF11 y factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF); han sido clonados de la pulpa de incisivos en ratas (41). La BMP4 sintetizadas por el epitelio, inducen al mesénquima hacia un linaje odontogénico, mientras que la BMP2, BMP4 y BMP7 estimulan la expresión sostenida de enamelinina e influyen a las células epiteliales y mesenquimatosas a inducir posteriormente la morfogénesis del epitelio (42). Así mismo, la BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 y GDF11 se expresan durante la diferenciación de los odontoblastos; mientras que la BMP4 y BMP5 durante la diferenciación de los ameloblastos (43,44). Las vías complejas de señalización de las BMP's están reguladas por la interacción con sitios extracelulares de los receptores transmembranales específicos (45). Existen antagonistas de BMP's como noggin, cordina y folistatina, que modulan la bioactividad de los morfogenes (46). En las células de la pulpa dental, se expresan receptores transmembranales BMP tipo I y II con actividad serina treonina kinasa, que intervienen en los procesos de comunicación e interacción celular epitelio - mesénquima; estos permiten que las señales de las BMP's sean transducidas desde la membrana plasmática hacia el núcleo por medio de proteínas SMADS, receptor activador de Smads (R-SMADS), mediador común de Smads (Co-SMADS) e inhibidor de Smads (I-SMADS) (47).

Los morfogenes son señales que funcionan como factores de diferenciación y crecimiento implicados en el establecimiento de patrones específicos en la arquitectura de órganos y tejidos. Las BMP's originalmente fueron aisladas de matrices de hueso descalcificado; la utilización de BMP2 recombinante humana estimula la diferenciación *in vitro* de células pulpares indiferenciadas en odontoblastos en cultivos en monocapa y organotípicos establecidos en matrices 3D (tridimensionales) (48). La proteína recombinante humana BMP2, BMP4 y GDF11 en matrices de gel de agarosa, y TGF 1 asociado con una fracción inactiva soluble de EDTA estimula diferenciación en odontoblastos de cultivos de células de papila dental (49). Efectos similares han sido demostrados en cultivos de dientes con TGF 1-3 y BMP7 (50,51). La proteína recombinante humana BMP2, BMP4 y BMP7 inducen a la formación de dentina reparativa/ regenerativa *in vivo* (52,53,54). El factor de crecimiento insulínico recombinante humano I en membranas de colágeno induce a una completa restauración y formación de dentina y dentina tubular (55).

Aún no esta totalmente clara la regulación y la transición abrupta de células madres de un estado quiescente a uno activado en términos de proliferación, migración, diferenciación y secreción de la matriz, después de un daño en el tejido pulpar; el control de los mecanismos moleculares de estos diferentes morfogenes es necesario para elucidar el buen uso terapéutico en endodoncia regenerativa.

CARACTERIZACIÓN DE CELULAS MADRES EN EL COMPLEJO PULPODENTINAL

Una posible fuente de MSCs se encuentra en la pulpa dental, este es un tejido conectivo de baja vascularidad rodeado por dentina, conformado por una población heterogénea de células como: odontoblastos, fibroblastos, células estromales, células endoteliales y perivasculares, células nerviosas, entre otras; estas células mantienen la homeostasis 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 (56). Estas células, junto con los vasos sanguíneos se encuentran en matrices extracelulares creando un microambiente ideal para permitir procesos de reparación.

Diferentes estudios, han buscado definir el fenotipo de células madres mesenquimales de pulpa dental (DP-MS), el crecimiento *in vitro* en comparación con MSCs de médula, y su plasticidad *in vitro* por lo menos en tres tipos de células: osteoblastos, condroblastos y adipositos (57). Gronthos y col; caracterizaron estas células por medio de marcadores específicos de MSCs y observaron su capacidad de autoregeneración, diferenciación a múltiples linajes y su capacidad clonogénica; hallando DPSCs capaces de formar dentina asociada con tejido pulpar *in vivo* (58). Iohara y colaboradores, por medio de la expresión de mRNA de Dentina sialofosfoproteína (Dsp) y metaloproteinasas de la matriz 20 (MM20) confirmaron la diferenciación de DPSCs en odontoblastos al ser estimuladas por proteínas morfogenéticas óseas (59).

Otros estudios como los publicados por Shi y col. Muestran la expresión de marcadores de MSCs como STRO-1 y CD46 en ligamento periodontal además de una diferenciación de este tejido en odontoblastos, cementoblastos, adipositos y células productoras de colágeno *in vitro*; al ser transplantadas en ratones inmunosuprimidos muestran la formación de estructuras dentales que pueden contribuir a una eventual reparación (60).

En el Instituto Unidad de Investigación Básica Oral (U.I.B.O) de la Universidad El Bosque estamos realizando un proyecto de investigación con el propósito de determinar la presencia de células madres en muestras de pulpa dental humana. La caracterización de estas células la realizamos identificando la expresión de los marcadores CD 117, FGFR3, CD 90, STRO-1, CD34, CD44 y CD45 mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo. Los resultados previos obtenidos revelan un inmunomarcaje del 13.2 % de células CD117 +, mientras un porcentaje del 17.5 % de células FGFR3+ (61). Estos resultados demuestran la presencia de células precursoras en la pulpa dental, probablemente de la línea hematopoyética o mesenquimatosas. Se requieren estudios de caracterización adicionales de las células que expresan el fenotipo FGFR 3+ / CD 117+ con otros marcadores específicos de células Madres como STRO-1, CD-90, SH2, SH3, flujo, técnicas de biología molecular como RT-PCR para analizar el nivel de expresión de ARNm de genes propios de células madres mesenquimales (hMSC's) o células madres Hematopoyéticas (hHSC's).

Estos trabajos de investigación son el pilar fundamental para desarrollar nuevos tratamientos en el futuro basados en células madres. En efecto, existen varios ensayos clínicos con terapia celular basados en células madres que en este momento se efectúan en sujetos humanos. Estas estrategias terapéuticas novedosas tendrán aplicación en la práctica clínica odontológica.

INGENIERÍA DE TEJIDOS Y SU FUTURO EN LA ODONTOLOGÍA

El diente y las estructuras periodontales, son importantes órganos del complejo craneofacial, por esto, las enfermedades dentales y periodontales se consideran una amenaza que contribuyen a la pérdida dental; los tratamientos utilizados para estas enfermedades, no restauran completamente el diente después de la patología o el trauma sufrido, produciendo anquilosis, reabsorción de la raíz y pérdida del diente; la incidencia de agénesis dental congénita en niños y pérdida de dientes en la población adulta se ha convertido en un gran problema de salud pública en los últimos años (62). La utilización de diferentes estrategias para el reemplazo de los dientes afectados, es uno de los objetivos de la ingeniería de tejidos en el campo odontológico (63).

En las últimas décadas, se ha investigado el potencial de ASCs para formar estructuras dentales funcionales (Tabla 1); el laboratorio Sharpe (64), reemplazó células mesenquimatosas adultas con células mesenquimatosas generadas de células madres no dentales (MSCs) en ratones con epitelio bucal embrionario; la recombinación entre MSCs y epitelio bucal embrionario estimularon odontogénesis en ESCs, NSCs, BMSSCs además de la expresión de genes odontogénicos. Estas células recombinadas fueron transferidas en cápsulas renales, observándose el desarrollo de estructuras dentales y asociaciones óseas. Estos resultados proveen un significativo avance hacia la creación de primordios de dientes artificiales originados de cultivos celulares que pueden ser usados en reemplazo a dientes faltantes, por medio del trasplante dentro de la cavidad oral adulta (65).

Las MSC o células progenitoras multipotentes adultas (MAPC), también pueden diferenciarse en fenotipos celulares que permiten la restauración de las células involucradas en el daño dental. Múltiples estudios buscan diferentes opciones para facilitar la utilización de MSCs como tratamiento clínico de enfermedades periodontales y traumas orales (Figura 1), partiendo de estudios realizados que se enfocan en la regeneración y reparación del tejido de cavidad oral. Co-cultivos de MSCs y ligamento periodontal han mostrado un incremento en la población de MSCs expresando osteocalcina, osteopontina y una disminución en la expresión de sialoproteína ósea, característico del ligamento periodontal, estos hallazgos indican, que el contacto de factores celulares de ligamento periodontal induce a las MSCs a poseer características de este tejido (65).

Tabla 1.
Potencial de ASC para diferenciarse en distintas estructuras y tipos de células craneofaciales (3).

Origen de Células Madres Adultas	Estructuras o tipos de células diferenciadas	Laboratorios
Médula ósea	Estructura dental y hueso	Paul T. Sharpe(60)
Pulpa dental	Dentina, odontoblastos, pulpa dental, estructuras de cemento y ligamento periodontal	Songtao Shi (63)
PDL	Estructuras de cemento y PDL	Songtao Shi (66)
Brote dental	Estructuras dentales	Pamela C. Yelick (67)
Médula ósea	Células hematopoyéticas osteoblastos, osteocitos	Edwin M. Horwitzf (68)

PDL. Ligamento periodontal

La reparación del tejido periodontal por medio de células progenitoras permite la formación de fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos. En la investigación realizada por Shi y col, aislaron células madres de ligamento periodontal (PDLSCs) de 25 pacientes, de los cuales extrajeron sus molares, mostrándose la expresión de marcadores de MSC en las células aisladas, como son STRO-1 y CD146/ MUC18 por medio de citometría de flujo (69). Dentro de condiciones definidas en cultivo, las PDLSC se han diferenciado en cementoblastos, adipositos y células productoras de colágeno que muestran capacidad para regenerar el cemento al ser transplantadas en ratones inmunocomprometidos, contribuyendo a la reparación del tejido periodontal (70).

En tejidos duros de la cavidad oral, donde no se pensaba hallar ASC, se encontraron células clonogénicas con gran capacidad de proliferación (71), adicionalmente, *in vivo* el transplante de estas células, permiten la generación de tejido duro. Se han encontrado también, células madres en pulpa (PDSC), estas tienen alto poder proliferativo y se obtienen de la disociación enzimática de la pulpa dental humana, que esporádicamente, *in vitro* puede producir calcificación; y transplantadas en ratones inmunosuprimidos forman fibras de colágeno y mineralizaciones (70).

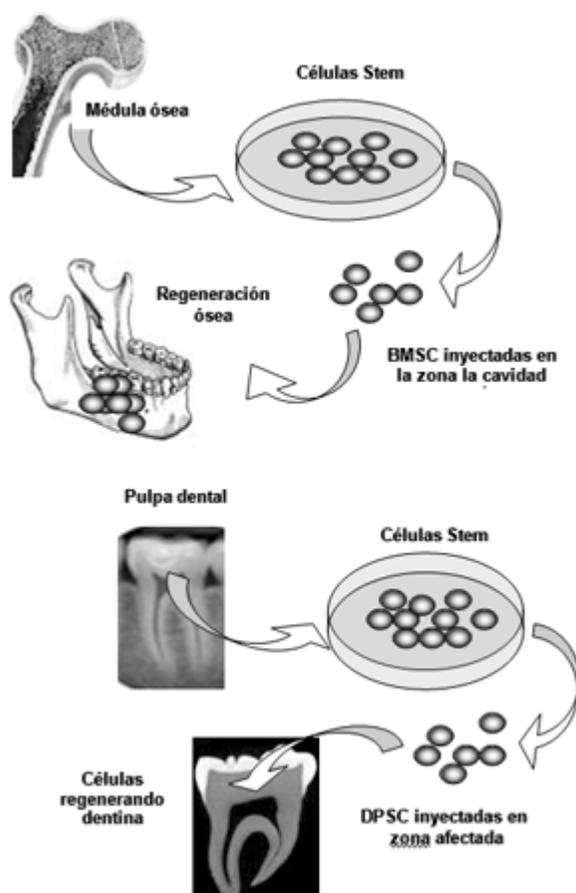


Figura 1. Células Madres adultas pueden ser tomadas de varios tejidos y cultivadas *in vitro*. Cuando se implantan en el sitio que se encuentran alterado las células Madres tienen el potencial de regenerar hueso y estructuras dentales.

PERSPECTIVAS

La regeneración dental y periodontal, es un proceso más complejo que la regeneración de otro tipo de tejidos como músculo, sistema nervioso y hematopoyético. La regeneración tisular implica el reemplazo de tejidos afectados con células idénticas que pueden ser generadas a partir de la estimulación de MSC's. Debido a su capacidad de transdiferenciación en condiciones apropiadas, las células madres aisladas del complejo craneofacial podrían ser candidatas para el diseño de estrategias terapéuticas novedosas con aplicaciones en la práctica clínica (72). Por eso se estudian los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la morfogénesis dental, caracterizados por una serie de interacciones recíprocas entre el epitelio dental y el mesenquima subyacente, proceso biológico que involucra numerosas moléculas, vías de señalización y factores de crecimiento mediadores de estas interacciones (73). Estudios *in vitro* e *in vivo* enfocados en la comprensión del papel que desempeñan durante el desarrollo embrionario esos distintos factores solubles, permitirán determinar la función de estas diferentes señales e interacciones en ingeniería tisular, para sintetizar análogos de tejidos funcionales que se puedan transplantar en animales y seres humanos. La modulación de la inducción tisular por este tipo de señales en un futuro contribuirá a la regeneración de tejidos orales. Por estas razones, es fundamental un completo entendimiento de los mecanismos moleculares durante el desarrollo de órganos como sucede durante la Odontogénesis (74).

Actualmente, la investigación en células madres se consideran como una de las líneas de investigación más atractiva para modular la reparación y regeneración de tejidos u órganos como el tejido dental y periodontal (75). La obtención de ASC en diferentes tejidos como médula ósea, complejo pulpo dental, cordón umbilical, entre otros; del propio paciente, serán necesarios para permitir una completa regeneración funcional de los tejidos de la cavidad oral, eliminando los problemas de

rechazo inmunológico, debido que el trasplante es autólogo (76,77). Los avances en técnicas de terapia génica, tecnología del ADN recombinante, terapia celular y observación de expresión génica de las células madres durante su proliferación *in vivo* y *ex vivo*, ofrece una alternativa terapéutica funcional para mejorar el estado del paciente.

Esta claro, que las ASCs juegan un papel crucial en el desarrollo, remodelado, regeneración y reparación del complejo craneofacial a lo largo de la vida. El reciente reconocimiento del papel de las células madres en la regeneración tisular, provee una fuerte base de conocimiento que genera un gran impacto en el tratamiento clínico de diversas patologías. A través de la investigación para la utilización clínica de células madres, se podrán generar diferentes protocolos estandarizados para el tratamiento de patologías bucales.

REFERENCIAS

1. Smith A. J., Tooth tissue Engineering and regeneration a translational vision. (Editorial). 2004. J. Den Res. 83 (7): 517.
2. Salehrabi R, Rotstein I. Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study. J Endod 2004; 30:846 -50
3. Giannoudis P. V., Pountos I. Tissue regeneration. The past, the present and the future. Injury, Int. J. Care Injured. 2005. 36S: 2S-5S
4. Guan G, Shi S, Kramer P. Role of Adult Stem Cells in Craniofacial Growth and Repair. Semin Orthod. 2005.11:227-233
5. Munévar JC. *in vitro* obtention and characterization of Stem Cells from the human umbilical cord as an alternative of embryonic Stem Cells for regenerative Medicine. Rev. Lat. Bioética. 2005 9: 40-71
6. Munévar JC., Becerra A., Hernández A., Biología de las Células Stem. NOVA. 2005. (3)3: 92-105
7. La cadena JR. Stem Cells and Bioethics. Rev. Latin. Bioética. 2005. 9:
8. Fuchs E, Segre J. Stem cell: a new lease on life. Cell. 2000; (100): 143-155.
9. Verfaillie, C. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. TRENDS in Cell Biology. 2002; 12(11): 502-508.
10. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potencial stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci. 1999. 96 (25): 14482-6
11. Ma L, Feng X.Y, Cui B.L, Law F, Jiang X.W, Ying LY. Human Umbilical Cord Warthon´s Jelly derived Mesenchymal Stem Cells differentiation into nerve like cells. Chin. Med. J (Engl). 2005 118 (23): 1987-93.
12. Chaparro O. Stem Cells: dream and reality. Rev. Lat. Bioética. 2005. 9: 22-39
13. Neubauer M., Hacker M, Bauer- Kressel p, Weiser B, Fischbech C, Schulz MB, Goepferich A, .Adipose tissue engineering based on mesenchymal stem cells and basic fibroblast growth factor *in vitro*. 2005. Tissue Eng. 11 (11-12): 1840-51
14. Zhou DH, Huang SL, Wu YF, Wei J, Chen GY, Li Y, Bao R. The expansion and biological characteristics of human mesenchymal stem cells
15. Gimeno MJ, Maneiro E, Rendal E, Ramallal M, Sanjurjo L, Blanco FJ. Cell therapy: a therapeutic alternative to treat focal cartilage lesions. Transplant Proc. 2005 Nov; 37(9):4080-3

16. Armitage JO. Medical progress: bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330: 827-838
17. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8: 607-612
18. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705
19. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
20. Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 2003; 122: 877-891
21. Tsmark N, Tanoka K, Arikawa- Hirasawa L, y col. Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis promotion of mesenchymal cell recruitment and condrocyte differentiation. *J. Cell. Biol.* 1999. 144: 151-173
22. Hinton RJ, Carlson DS: Regulation of growth in mandibular condylar cartilage. *Semin Orthod* (In press)
23. Tsumaki N, Tanaka K, Arikawa-Hirasawa E, et al: Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J Cell Biol* 144: 161-173, 1999
24. Guoqiang Guan, Songtao Shi, and Phillip R. Kramer. Role of Adult Stem Cells in Craniofacial Growth and Repair. *Sem in Ortho.* 2005. 07.007. 227-233
25. Opperman LA: Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn* 219:472-485, 2000
26. Johnson D, Iseki S, Wilkie AO: Expression patterns of Twist and Fgfr1-2 and -3 in the developing mouse coronal suture suggest a key role for twist in suture initiation and biogenesis. *Mech Dev* 91: 341-345, 2000
27. Carlson DS: Growth of the temporomandibular joint, in Zarb GA, Carlsson GE, Sessle B, Mohl ND (eds): *Temporomandibular Joint*. 2nd ed. Copenhagen, Munksgaard, 1994, pp 128-158
28. Fuentes MA, Opperman LA, Bellinger LL, et al: Regulation of cell proliferation in rat mandibular condylar cartilage in explant culture by insulin-like growth factor-1 and fibroblast growth factor-2. *Arch Oral Biol* 47:643-654, 2002
29. Wise GE, Frazier- Bowers S, D` Souza RN: Cellular molecular and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*.2000. 13: 323-334.
30. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 2003;116:1647- 8.
31. Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Localization of receptor activator of NFkappaB ligand, RANKL, in periodontal tissues during experimental movement of rat molars. *J Electron Microsc* . 2001;50(4):365-9.
32. Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK: Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res* 294: 458-468, 2004
33. Carlson DS: Growth modification: from molecules to mandibles. *Growth Modification: What Works What Doesn't and Why*. *Craniofac Growth Ser* 1999. 35:17-65,

34. Sperber GH: Craniofacial Embryogenesis: Normal Developmental Mechanisms in Understanding Craniofacial Anomalies: Etiopathogenesis of Craniosynostoses and Facial Clefing. New York, Wiley-Liss, 2002
35. Massague J, Blain SW, Lo RS: TGFbeta signaling in growth control cancer and heritable disorders. *Cell* 103:295-309, 2000
36. Warner DR, Pisano MM, Roberts EA, Et al: Identification of three novel Smad Binding proteins involved in cell polarity. 2003. *FEBS Lett* 539: 167-173.
37. Haase HR, Ivanovski S, Waters MJ, et al: Growth hormone regulates osteogenic marker mRNA expression in human periodontal fibroblast and alveolar bone-derived cells. *J Periodontal Res* 38:366-374, 2003
38. Ohazama A, Sharpe PT. TNF signalling in tooth development. *Curr Opin Genet Devel* 2004;14:513-9.
39. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 2003;116:1647- 8.
40. Dominici M, Pritchard C, Garlits JE, et al: Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11761-11766, 2004
41. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49, 2002
42. Bhattacharyya A, Svendsen CN: Human neural stem cells: a new tool for studying cortical development in Down's syndrome. *Genes Brain Behav* 2:179-186, 2003
43. Dominici M, Pritchard C, Garlits JE, et al: Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci SA* 101:11761-11766, 2004
44. Labat ML: Stem cells and the promise of eternal youth: embryonic versus adult stem cells. *Biomed Pharmacother* 55:179-185, 2001
45. Markakis EA, Palmer TD, Randolph-Moore L, et al: Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells. *J Neurosci* 24:2886-2897, 2004
46. Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002;250:231-50.
47. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al: SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5807-5812, 2003
48. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, et al: Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec* 219:233-242, 1987
49. Almeida-Porada G, Porada C, Zanjani ED: Adult stem cell plasticity and methods of detection. *Rev Clin Exp Hematol* 5:26-41, 2001
50. Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by BMP7 *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2000;45:173-7.
51. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 *in vitro*. *Arch Oral Biol* 1999;44:149 -56
52. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human

- bone morphogenetic protein (BMP)-2 and -4. J Dent Res 1994;73:1515-22.
53. Decup F, Six N, Palmier B, et al. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. Clin Oral Investig 2000;4:110 -9.
 54. Nakashima M. An ultrastructural study of the differentiation of mesenchymal cells in implants of allogeneic dentine matrix on the amputated dental pulp of the dog. Arch Oral Biol 1990;35:277-81
 55. Lovschall H, Fejeskov O, Flyvbjerg A. Pulp- camping with recombinant human insulin- like growth factor I (rhIGF-I) in rats molars. Adv Den Res 2001; 15:108-112.
 56. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. PNAS 2000; 97: 13625.
 57. Laura Pierdomenico, Laura Bonsi, Mario Calvitti, Damiano Rondelli, Mario Arpinati, y col. Multipotent Mesenchymal Stem Cells with Immunosuppressive Activity Can Be Easily Isolated from Dental Pulp. Immunobiology and genomics. 2005. 80: (6) 836-84
 58. S. Gronthos, J. Brahim, W. Li, L.W. Fisher, N. Cherman¹, A. Boyde, P. DenBesten, P. Gehron Robey, and S. Shi. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. J Den Resch. 2002. 81 (8): 531-535
 59. K. Iohara, M. Nakashima¹, M. Ito, M. Ishikawa¹, A. Nakasima, and A. Akamine¹ Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. J. Den Res. 2004. 83(8):590-595
 60. Byoung-Moo Seo, Masako Miura, Stan Gronthos, Peter Mark Bartold, Sara Batouli, Jaime Brahim, Marian Young, Pamela Gehron Robey, Cn-Yu Wang, Songtao Shi. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 2004; 364: 149-55.
 61. Munévar JC, Forero J, Lafaurie G, Bautista G. y colaboradores. Determinación de los Marcadores CD117 y FGFR3 en Muestras de Pulpa Dental sana Humana por Inmunohistoquímica. Instituto U.I.B.O. Universidad el Bosque. 2006.
 62. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, et.al: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. 2000. 97: 13625-13630.
 63. Chai Y, Slavkin HC. Prospect for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. Micros Res Tech. 2003. 60: 469-479
 64. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS. Et. al. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. J. Dent res. 2004. 83: 523-528
 65. Bianco P., Robey PG: Stem cells in tissue engineering. Nature. 2001. 414 (6859): 118-121
 66. Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 364:149- 155, 2004
 67. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, et al: Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. J Dent Res 83:523-528, 2004
 68. Dominici M, Pritchard C, Garlits JE, et al: Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 101:11761-11766, 2004
 69. Seo B.M., Miura m., Gronthos S., Et. al : Investigation of multipotent post natal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004. 364-: 149-155.

70. Jervall and Thesleff, 2000, <http://bite-it.helsinki.fi/>.
71. Ohazama A, Modino S.A., Miletich I., Et.al: Stem cell- based tissue engineering of murine teeth. J. Dent. Res 2004. 83: 518-522
72. Harada H, Ohsina H. new perspectivas on tooth developenment and the dental stem cell niche. Arch Histol. Cyto. 2004. 67 (1): 1-11
73. Garin NC: Autologus bone marrow tranplation in acurate leucemia. J. Natl cáncer Inst. 1986. 76: 1281-1287
74. Pereira RF, O´Ittec MD, lapter AV, et.al.. marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tisúes in transgenic mice whit a phenotype of osteogenesis imperfecta. proa. Natl Acad Sci. USA. 1998. 95: 1142-1147
75. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. Nat Med 2002; 8: 607-612.
76. Arinze T.L., Peter S.J., Archambault M.P., van den B.C., Gordon S., Kraus K., Smith A., Kadiyala S., Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defe ct, J. Bone Joint Surg. Am., 85-A: 1927-1935, 2003
77. Grinnemo K.H., Mansson A., Dellgren G., Klingberg D., Wardell E., Drvota V., Tammik C., Holgersson J., Ringden O., Sylven C., Le Blanc K., Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 127: 1293-1300, 2004