



Dra. Daniella Sanguino

Universidad Europea de Madrid.

Dr. Juan Carrión Bolaños

Profesor Tutor de Odontología Integrada de Adultos,
Universidad Europea de Madrid.

Regeneración de tejidos orales mediante células madre

Artículo ganador en los XI Premios Fin de Carrera de Odontología Gaceta Dental

Resumen

Desde el descubrimiento de las células madre y sus capacidades regenerativas, se han realizado diversas investigaciones en Odontología para intentar regenerar tejidos a nivel oral. Principalmente, se ha experimentado con células madre de la médula ósea, aunque ahora existen alternativas, debido al encuentro de nichos de estas células en la pulpa dental, ligamento periodontal, entre otros. En esta revisión bibliográfica, se valorarán las diversas fuentes de dichas células, las técnicas proliferativas que se están utilizando, al igual que los tipos de andamiajes, para así poder regenerar tejidos dentarios tales como la pulpa, dentina y tejidos periodontales.

Palabras clave

Células madre de la pulpa dental, regeneración de tejidos orales, regeneración del complejo dentino-pulpar, regeneración ósea, regeneración periodontal.

Abstract

Since the discovery of stem cells and its potential to regenerate tissues, this field of study is currently being applied to the area of Dentistry. The main objective is to find a way to use these cells to regenerate tissues, instead of replacing them. Bone marrow stem cells have been more commonly analyzed, however, recently there are other,

and more accessible locations in the body where stem cells can be obtained such as the dental pulp, the periodontal ligament, and the root apical papilla. This review examines the means of proliferation of stem cells, as well as the types of scaffolds that are used as tools in order to reach the main goal: regenerate dental tissues.

Key Words

Dental pulp stem cells, oral tissue regeneration, dentin-pulp complex regeneration, bone regeneration, periodontal regeneration.

Introducción

Hoy en día los dentistas dependen del uso de biomateriales para reparar, reemplazar o incluso regenerar hueso y tejidos dentales perdidos por caries o enfermedad periodontal (1, 2). Se ha investigado sobre el proceso reparativo que ocurre gracias a los odontoblastos cuando existe una lesión dental a lo largo de la vida. Según estudios, se encuentran células similares a los odontoblastos dentro de la pulpa dental capaces de reparar el tejido lesionado (3, 4).

En la actualidad existen diversas técnicas reparativas para la regeneración de hueso a nivel oral. Mediante la combinación de tres factores; osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción, el organismo es capaz de regenerar el hueso que previamente estaba perdido. La osteogénesis

es «el proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo» (5, 6) mediante células diferenciadas osteoprogenitoras (6). La osteoinducción es «el proceso de estimulación de la osteogénesis» (5), que puede ocurrir mediante materiales osteoinductivos tales como proteínas morfogenéticas (BMPs) (7, 8). Por último, la osteoconducción «son guías para el crecimiento óseo que permiten el depósito de hueso nuevo» (5, 9), como pueden ser hueso autólogo o heterólogo, fibrina autóloga rica en factores de crecimiento (PRGF) o hidroxiapatita reabsorbible, entre otros.

Desde el descubrimiento de las células madre, se han creado nuevos objetivos en la regeneración de tejidos enfocados al campo de la Odontología (1).

Existe una gran diferencia entre células madre pluripotenciales y multipotenciales: las primeras son aquellas

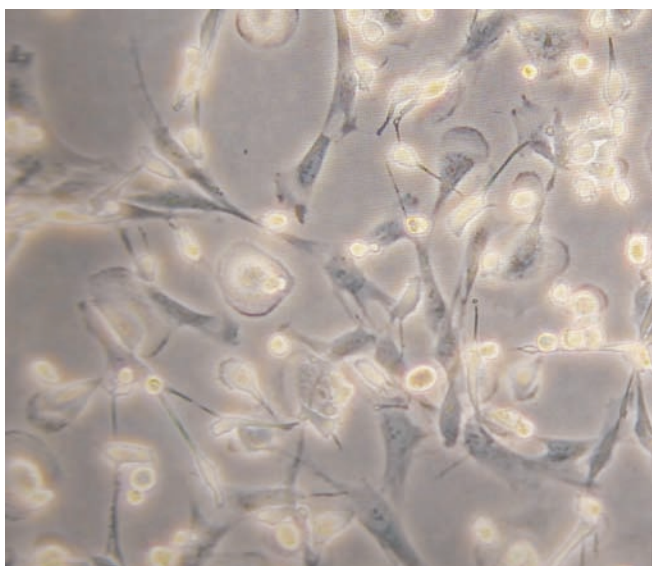


Figura 1. Cultivo primario de un aspirado de médula ósea que contiene células multipotenciales con gran capacidad de proliferación y diferenciación.

capaces de crear células de cualquier parte del cuerpo, mientras que las multipotenciales tienen una diferenciación limitada. Las células pluripotenciales que se encuentran en la médula ósea, son las más comúnmente utilizadas (10) (**figura 1**), ya que tienen muy buena supervivencia tras ser implantadas en otros tejidos (11). Asimismo, existen estudios en donde han utilizado otras células pluripotenciales provenientes del cordón umbilical para regenerar tejidos, también con óptimos resultados (12). En la actualidad se ha empezado a investigar con células madre provenientes de tejidos dentarios tales como la pulpa, folículo dental, dientes deciduos, papila apical de dientes inmaduros y ligamento periodontal, por la capacidad regenerativa de estas células a nivel oral (13, 14, 15). Incluso, existen autores que declaran que las células madre provenientes de la región orofacial tienen una mayor capacidad de proliferación que aquellas que provienen de la médula ósea

(16). A pesar de esto, el principal obstáculo es encontrar las expresiones identificativas necesarias, que son capaces de iniciar la formación de un tejido a partir de las células madre, para así convertirse en células odontogénicas (3, 17, 18).

Esta revisión bibliográfica expondrá las novedades en cuanto a la regeneración de tejidos orales mediante el uso de células madre, tanto dentales como aquellas provenientes de la médula ósea o el cordón umbilical. Asimismo, se explorarán las diferentes técnicas que existen en la actualidad para cultivar y obtener la diferenciación de dichas células en tejidos orales.

Métodos

Se utilizaron medios digitales, como EBSCO host y Medline, proporcionados por la Universidad Europea de Madrid para acceder a revistas internacionales utilizando las palabras clave listadas anteriormente en el resumen. Las revistas digitales utilizadas fueron *Journal of Periodontal Research*, *The Lancet*, *Australian Endodontic Journal*, *Clinical Oral Implant Research*, *Cells Tissues Organs*, *Orthodontic Craniofacial Research*, *Journal of Biomedical Materials Research*, *Journal of Tissue Engineering*, *Regenerative Medicine*, *European Cells and Materials*, *Stem Cell Reviews and Reports*, *Macromolecular Symposia*, *Journal of Clinical Periodontology*, *Dental Materials Journal*, *Journal of Endodontics*, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Dentistry*, *Journal of Cellular Biology*, *Journal of Material Sciences*, *Nagoya Journal of Medical Sciences*, *Journal of Cellular Physiology*, *Acta Orthoepedica* y *Journal of Dental Research*.

Discusión

Células madre dentales y medios de cultivo

Desde que se han descubierto células madre dentales se han llevado a cabo diversas investigaciones para las aplicaciones clínicas de estas células. Un gran obstáculo, que se debe intentar sobrepasar, es que las células madre dentales, gradualmente, pierden sus propiedades multipotenciales y regenerativas en su expansión *in vivo* (19, 20).

Algunos investigadores mantienen la idea de que un medio condicionado para gérmenes dentales tiene la capacidad biológica y molecular para crear un microambiente que puede guiar a las células madre a la odontogénesis, por ende, evitando que las células pierdan sus capacidades multipotenciales (20). Han demostrado que en este tipo de medio condicionado se puede inducir a que células madre pulpares se diferencien en células de tipo odontoblasto, y que generen un complejo dentino-pulpar rectangular ectópico *in vivo* (20). Estos investigadores decidieron llevar a cabo un estudio en donde cultivan células madre provenientes de la pulpa en un medio condicionado para

gérmenes dentales porcinos, comparando su comportamiento con un cultivo para gérmenes dentales humanos, tanto *in vivo* como *in vitro* (20). Demostraron que un medio de cultivo para gérmenes dentales porcinos puede ser un sustituto, ya que tuvieron resultados similares a aquellas células cultivadas en un medio humano (20).

Actualmente, otro objetivo que se intenta alcanzar con las células madre provenientes de la pulpa es su expansión. Se ha experimentado con varios tipos de cultivos, diversos nutrientes y factores de crecimiento. Los más comúnmente utilizados provienen de sueros animales; sin embargo, existen problemas con esto debido a su riesgo asociado a la transmisión de priones o zoonosis y, por esta razón, los más aceptados son aquellos sueros alogénicos o autólogos. No obstante, sigue existiendo un problema para que estos estudios sean aceptados para experimentación clínica.

Debido a esto, un estudio propuso encontrar un medio sin suero que permitiera la expansión de células madre dentales, incluyendo aquellas que se encuentran en dientes deciduos (SHEDs) y en el ligamento periodontal (PDLSCs) (21). Pudieron demostrar que las células madre derivadas de tejidos dentales tienen la gran ventaja de ser extraídas de tejidos no funcionales (a diferencia de aquellas provenientes de médula ósea), y demuestran que estas células son capaces de expandirse y mantener su carácter multipotencial (21). Aún así, todavía se debe determinar si estas células pueden mantener su potencial regenerativo *in vivo*. Además, sería importante desarrollar o mejorar este estudio, consiguiendo que estas células sean cultivadas, aisladas y expandidas sin tener contacto alguno con suero animal (21).

El folículo dental es un tejido conectivo suelto que envuelve un diente que aún no ha erupcionado. Su presencia, según estudios realizados, regula la osteoclastogénesis y osteogénesis, necesitada para su posterior erupción (22). A medida que el diente penetra la encía, el folículo dental se diferencia en el ligamento periodontal. Se ha postulado que algunas células del folículo dental se pueden diferenciar en cementoblastos, al igual que algunos osteoblastos del hueso alveolar (22). Asimismo, las células madre parecen estar presentes en el folículo dental de los terceros molares humanos (22).

El objetivo de un estudio realizado por Yao et al (22) era determinar si se encuentran células madre en el folículo dental de ratas, para luego investigar las capacidades de diferenciación de estas células. Se demuestra que estas células presentan expresiones de células madre. Además, sus capacidades de diferenciación pudieron ser determinadas cuando, tras su cultivo, se trasladaron a un medio de diferenciación osteogénico, produciendo así nódulos de mineralización. Esto no se apreció en células que no fueron trasladadas en un medio osteogénico. La misma operación anterior fue realizada pero variando a un medio adi-

pogénico y hubo una proliferación de éste tipo de célula. Lo mismo se hizo en un medio de inducción neuronal, formándose células que se asemejan a neuronas multipolares. En conclusión, se puede observar que existen células madre en el folículo dental con capacidad regenerativa si se colocan en el medio adecuado, *in vitro* (22).

En otra investigación realizada por Li et al (3), mediante el uso de células madre de la médula ósea y neurales provenientes de ratas, se intentó reproducir las señalizaciones que ocurren en la odontogénesis para formar un diente *in vitro*, reemplazando las células embrionarias. Como resultado, en una de las variables observaron expresiones que se detectan en la odontogénesis, pero sin la formación de una estructura dentaria en concreto, mientras que en la otra sí hubo formación dentaria. Esto demuestra que las células madre pueden sustituir a las células embrionarias y llevar a cabo el proceso odontogénico (3).

Andamiaje y regeneración de tejidos orales

Regeneración de tejidos dentino-pulpaes

Se han mencionado anteriormente los medios de cultivo, o la importancia de una nutrición adecuada para las células madre. Otro factor de importancia en la ingeniería tisular es un andamio que sirva como una matriz extracelular temporal para que exista una óptima función, nutrición, adhesión, proliferación y señalización celular (23). Se consigue esto «sembrando» células en este material poroso para, así, permitir el crecimiento de las células en el material, que como finalidad terminará desarrollándose como un tejido normal y funcional (24). Generalmente, se utilizan andamiajes compuestos por polímeros debido a su capacidad biológica, química y mecánica (25). A pesar de la gran variedad de andamiajes, existe en la actualidad una falta de información veraz, en relación a cuál debe ser la naturaleza de la estructura de soporte que se debe utilizar en las investigaciones con células madre. Como hipótesis, se propuso el uso de andamiajes de tipo PLG (ácido poliláctico-co-glicólico), variando las porosidades, para investigar con células madre dentales (provenientes de conejo), para observar si se regeneran la pulpa y la dentina. Con estos andamiajes en tejidos dañados, los odontoblastos son reemplazados por poblaciones de células parecidas y así regeneran tejidos tipo dentina/pulpa (19, 4, 26, 27). Para confirmar esto, deciden regenerar este tipo de tejido, teniendo en cuenta la influencia del tipo de andamiaje utilizado. Afirman los autores de esta investigación que, en un andamio, el diámetro de poros apropiado oscila entre 100 y 350 micras para hacer regeneraciones (19). El uso del PLG demuestra que se produce regeneración de tejido dentinario/pulpar, y proponen variar el tamaño del poro según el área que se desea regenerar (19). Deducen que los poros más grandes son los más adecuados para regenerar tejidos mineralizados, mientras que los pequeños son mejores para estructuras más organizadas (19).

En otra investigación realizada por Tzong-Fu et al (4) se decide llevar a cabo la regeneración de tejidos dentinarios y pulpares, con el propósito adicional de saber si estas estructuras, tras ser trasplantadas en mandíbulas de cerdos, tendrían algún tipo de función. Utilizaron un andamiaje a base de un tri-copolímero formado por gelatina, condroitina y ácido hialurónico, con un tamaño de poro uniforme de 180 micras (4). Las células madre que fueron utilizadas eran provenientes del folículo dental (porcino) y, como resultado, demostraron la regeneración de un diente con la formación de raíz, dentina, pulpa, cemento e, incluso, ligamento periodontal (4). En 36 semanas, se regeneraron dientes en dos de los seis cerdos. El resto de ellos presentó un tejido tipo dentina-hueso sin ningún tipo de organización dental o periodontal (4). Se observó que los dientes eran más pequeños de lo normal y sin presencia de esmalte. Proponen que el tamaño de los dientes es proporcional al andamiaje utilizado, ya que las piezas dentarias regeneradas son de las mismas dimensiones del andamiaje. Por tanto, estos autores pudieron encontrar una estructura dentino-pulpar, con sus túbulos dentinarios e, incluso, cemento y el ligamento periodontal unido al hueso (4).

Parecido al estudio anterior, otros investigadores tuvieron como objetivo formar coronas dentales mediante andamiajes que fueron insertados en la mandíbula de ratas, conteniendo células del folículo dental (28). Demostraron en un período de 12 semanas la formación de manera desorganizada de tejidos dentales: dentina, pulpa, ligamento periodontal y, a diferencia del anterior, encontraron esmalte (28). Como consecuencia, el andamiaje utilizado pudo haber influido en el resultado en comparación con la investigación anterior, aunque no mencionan las porosidades y diámetro de poros de la matriz. Se debe tener en cuenta también que este estudio fue hecho en un modelo animal de menor tamaño, y que se formaron varios dientes pequeños, en vez de una estructura un poco más organizada, como fue demostrado en el modelo animal porcino (4).

El andamiaje, pues, funciona mimetizando la arquitectura de la matriz extracelular de los tejidos «nativos», necesaria para la regeneración tisular. Una de sus desventajas es que aún no existe una adecuada señalización celular de la regeneración, un aspecto que, como se ha mencionado previamente, es vital para el desarrollo de las células madre ya cultivadas.

Un estudio realizado por Yang et al (29) comprueba que hay maneras de disminuir este problema, sumergiendo estas estructuras fibrosas en materiales naturales gelatinosos. Utiliza hidroxiapatita (HA) para observar si promueve el proceso de diferenciación y adhesión celular en una estructura de andamiaje de poly-e-caprolactone (PCL) y gelatina (29). Se observa que la HA hace que se diluya y se precipiten iones de fosfato y calcio en la superficie de la

fibra, haciendo que se forme un microambiente que se asemeja a la pulpa; estimulando la diferenciación odontogénica (29). En este estudio también se evidenciaron en las células madre de la pulpa dental expresiones que confirman su diferenciación, e incluso, comprueban que la HA aumenta la eficacia de la diferenciación celular. También se detectaron expresiones genéticas, responsables de la mineralización de dentina y hueso. Hubo una variable que quizás se debería modificar en futuros estudios, la ausencia de homogeneidad de HA, ya que se aglomeraban entre las fibras de la matriz, en donde sería conveniente agregar un surfactante (29).

Otro estudio realizado por Yoshikawa et al (30), también realizado con células madre de la médula ósea en los poros de estructuras compuestas por HA, esta vez tratadas con laminina, observan la formación de tejidos duros. Utilizaron un andamio de HA con un centro hueco, sin mencionar el diámetro de poro (figura 9). Los resultados que obtuvieron estos investigadores son útiles para las regeneraciones a nivel de tejidos duros dentales o del complejo dentino-pulpar, ya que se comprueba que la laminina promueve la diferenciación celular y la osteogénesis. También cabe agregar que los autores de esta investigación opinan negativamente sobre la utilización de células madre mesenquimales provenientes de la pulpa, afirmando que no hay suficientes células indiferenciadas en cada diente para regenerar una pieza dentaria (30). Otro estudio afirma que en un diente se pueden conseguir suficientes células madre para su posterior aplicación regenerativa (31), aunque en el último, se refieren a las células madre provenientes del ligamento periodontal.

A diferencia de lo mencionado anteriormente, unos investigadores se propusieron generar un complejo periodontal denominado «bio-raíz», en donde utilizaron células madre de la papila apical y aquellas provenientes de ligamento periodontal, para una posterior colocación de una corona de porcelana en cerdos. Demostraron una aumentada capacidad de regeneración de las células de la papila apical de dientes inmaduros en comparación con las células madre provenientes del ligamento periodontal (13). Estas dos poblaciones celulares fueron trasplantadas a un «bloque» (con forma similar a una raíz) de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP). Esto fue colocado en el alveolo posterior a una extracción, y se pudo demostrar la presencia de ligamento periodontal y un tejido mineralizado parecido a la raíz. Luego, el lugar del trasplante fue abierto quirúrgicamente para la colocación de una corona de porcelana, cuya resistencia compresiva fue menor en comparación con la natural, aunque de igual manera, capaz de soportar la incorporación de una corona y realizar funciones normales (13) **(figura 2)**.

Regeneración de tejidos periodontales

Al igual que las regeneraciones del complejo dentino-

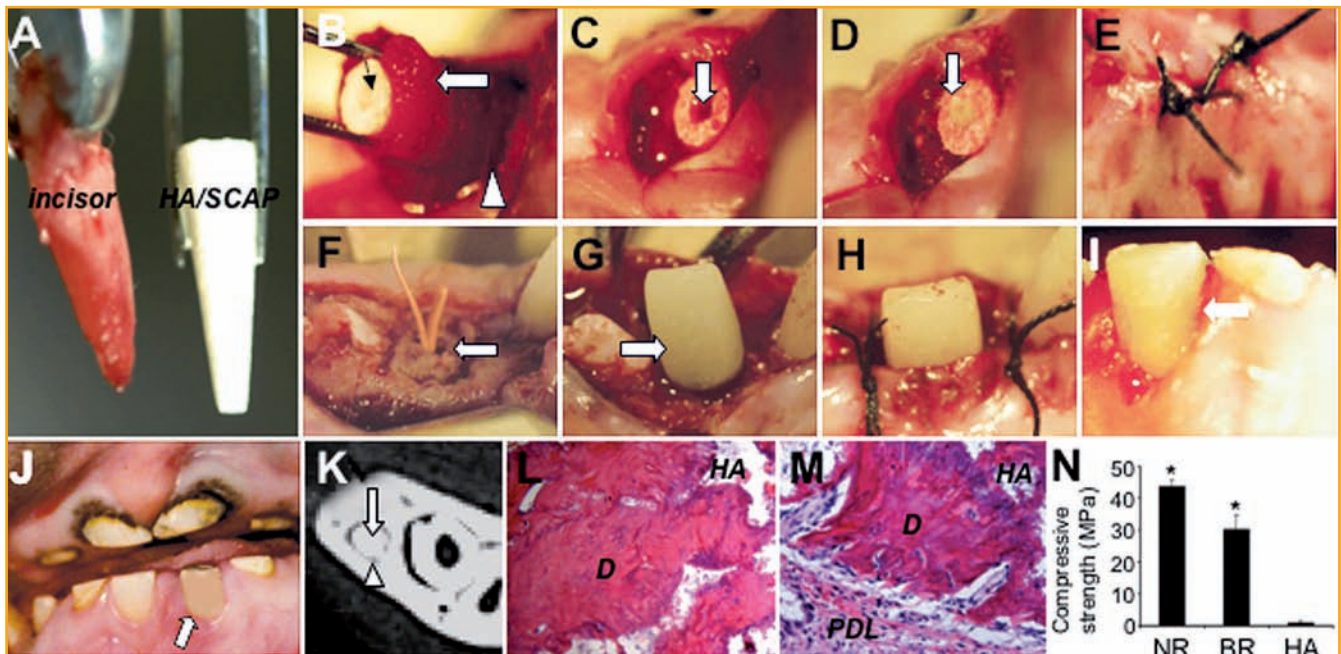


Figura 2. (A) Incisivo porcino extraído y estructura en forma de raíz, sembrada con células madre de la papila apical. (B) Andamio sembrado con células madre del ligamento periodontal, cubriendo el andamio cargado con células madre de la papila apical. Estas se implantan en el alveolo del incisivo inferior. (C) Implantación en el alveolo tras la extracción del incisivo inferior. Se observa un canal creado previamente en el centro del andamio (flecha). (D) Se sella el canal con un relleno temporal para cementar la corona de porcelana en el próximo paso. (E) Se sutura el implante para 3 meses. (F) Se expone el implante y se remueve el relleno temporal, descubriendo de nuevo el canal del andamio. (G) Una corona prefabricada se cementa en la estructura. (H) Sutura de la porción expuesta (I, J) Tras cuatro semanas, se pudo observar cómo la corona se retuvo, tras el funcionamiento normal de esa pieza. (K) Después de 3 meses, el implante formó una estructura dura a nivel radicular en el área incisal, demostrada con la imagen de una tomografía computerizada. Se observa un espacio de ligamento periodontal entre el implante y el tejido óseo (flecha). (L, M) Se aprecia que el implante contiene dentina nuevamente regenerada dentro del implante (L) y tejido periodontal (PDL) en la parte externa (M). (N) Análisis de las fuerzas compresivas. Las bio-raíces nuevamente formadas tienen una mayor fuerza que el andamio original, pero menor que una raíz natural.

pulpar, la regeneración periodontal es otro reto en la actualidad, especialmente para los periodoncistas en su búsqueda para el tratamiento de la periodontitis crónica. Como se ha mencionado anteriormente, se utilizan estructuras en donde se «siembran» células madre con factores de crecimiento, para así obtener cementoblastos, osteoblastos, fibroblastos periodontales, cemento, hueso alveolar e, incluso, para secretar matriz extracelular del ligamento periodontal (3). Además, se pueden obtener células madre en el propio ligamento periodontal (32, 33, 34, 35).

Un estudio realizado por Coura et al (36) intenta determinar si existe un nicho de células madre (procedentes de la cresta neural) a nivel del ligamento periodontal, ya que en ratas se han encontrado células madre con potenciales mesodérmicos y neurales (36). Se aisló, en 10 dientes, ligamento periodontal humano de siete individuos diferentes y 4 de un solo individuo. Las células fueron cultivadas en un medio inductivo, tratadas y analizadas en donde los resultados expresaron marcadores de mRNA (de la cresta neural), neuronas y células indiferenciadas gliales (36). Existieron expresiones que confirman el origen del ligamen-

to periodontal utilizado, la cresta neural. Estos resultados sugieren que el ligamento periodontal humano puede ser una fuente de células madre o progenitores multipotenciales con características de la cresta neural (36).

En otro estudio también se propone la existencia de células multipotenciales que se pueden utilizar para regenerar cemento y ligamento periodontal *in vivo*. Al igual que el estudio anterior (36), se pudo demostrar una población de células madre postnatales, multipotenciales. Por tanto, a base de células madre del ligamento periodontal humano, se pueden regenerar tejidos para el tratamiento de enfermedades periodontales. Continuando con la investigación, observaron fibras colágenas muy parecidas a las fibras de Sharpey, conectándose a un tejido muy similar al cemento, sugiriendo los potenciales regenerativos de la unión periodontal (31). También pudieron apreciar que las células madre periodontales intervienen en el proceso de reparación periodontal en ratas inmunocomprometidas (31). Es importante mencionar que estos resultados están basados en animales y defectos óseos pequeños. Por tanto, sería útil un estudio similar, pero en animales de mayor

tamaño, para evidenciar si efectivamente se pueden regenerar estos tejidos con estas células madre (31).

Otro factor a tener en cuenta es que existen alteraciones que se pueden producir tras la criopreservación de las células madre al ser extraídas. La criopreservación se efectúa normalmente debido a que las células madre con el tiempo disminuyen y, además, van perdiendo sus capacidades proliferativas (3). Si existiera alguna alteración, muchos resultados de diversos estudios estarían comprometidos, ya que quizás algún cambio molecular podría alterar sustancialmente un resultado. Se utilizaron células madre provenientes de la médula ósea de perros de la raza Beagle para examinar si serían capaces de regenerar defectos de fenestración periodontal de 5 mm apical a la unión amelocementaria. Para la regeneración, se colocó en los defectos óseos un andamiaje de colágeno (previamente se habían «plantado» las células madre extraídas de la médula ósea). Las células madre procedentes de la médula ósea, antes de ser colocadas en las fenestraciones, se analizaron para verificar si, tras la criopreservación, estaban alteradas. El resultado fue que existe cierto cambio en la estructura superficial de las células, sin embargo, tras varios días de ser cultivadas, las capacidades de adhesión se recuperaron y no se comprobaron cambios, en comparación con células que no fueron criopreservadas. Por ende, se mantienen las habilidades osteogénicas de las células (3, 37). Bajo el microscopio se pudo comprobar la existencia de tejido periodontal, al igual que hueso alveolar, aunque con poca calcificación y con un gran componente celular. Estos resultados se compararon con un grupo control, en donde las fenestraciones se intentaron regenerar con matrices de colágeno sin la presencia de células madre. Se apreciaron allí restos de matriz de colágeno, sin cemento nuevamente formado y con menos formación ósea, en comparación con el grupo anterior.

Para la corrección de defectos mandibulares, otros investigadores utilizaron dientes temporales provenientes de cerdos (SPD) como fuente de células madre. Utilizaron las SPD, ya que se asemejan a las células madre que provienen de los dientes temporales humanos, y comprobaron que, tras el trasplante en zonas con defectos óseos, hubo diferenciación celular.

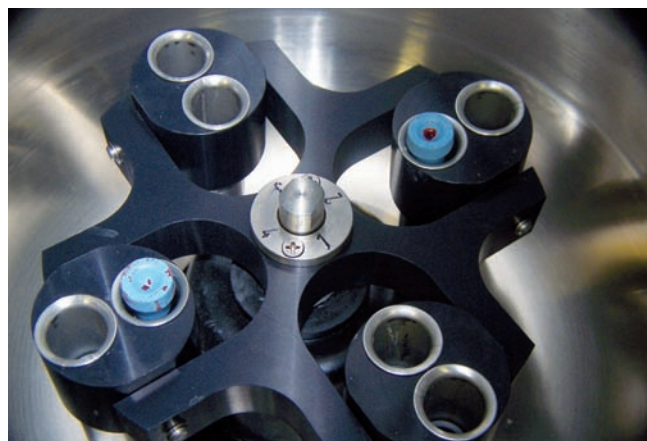
Otro estudio realizado por Xu et al (12) comprueba que células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea pueden ser cultivadas y expandidas para reparar defectos óseos, al igual que células madre procedentes del cordón umbilical (12). Estos investigadores discuten que los andamiajes que existen hoy en día no son adecuados para la ingeniería de tejidos, ya que las células tienen dificultad para «sembrarse» profundamente, y tampoco pueden ser inyectadas, ya que mencionan que las membranas disponibles que sí pueden ser inyectadas son débiles (12). Acentúan la importancia de que estas membranas

deben presentar una estructura adecuada para definir la forma del tejido, además de tener propiedades mecánicas adecuadas para soportar las cargas a las que son sometidas. Argumentan que cementos de fosfato cálcico pueden ser útiles para las grandes reconstrucciones maxilares tras resecciones por traumas o tumores y reparaciones ortopédicas (12). Afirman que este cemento sí puede ser inyectado y moldeado para reparaciones dentales o craneofaciales, para que luego *in situ* forme una membrana bioactiva que se una al hueso (12).

Pudieron concluir con el uso de este cemento y una calidad de fibra específica, una membrana capaz de encapsular células madre y, así, tener el potencial en un amplio campo de aplicaciones craneofaciales. Como resultado, demostraron que las células madre del cordón umbilical incluso eran más potentes y capaces de producir más minerales de hueso en comparación con aquellas de la médula ósea mediante la técnica sin cemento. Asimismo, tanto las células madre umbilicales como las de médula ósea, demostraron una excelente viabilidad, osteodiferenciación y mineralización *in vitro*.

La regeneración ósea es algo imprescindible, especialmente en la actualidad, en donde la implantología es una práctica habitual. Existen diversos métodos de regeneración ósea, aunque este campo sigue en constante evolución. Se ha utilizado regeneración guiada en donde un coágulo rico en factores de crecimiento provenientes de las plaquetas autólogas (PRGF) acelera la osificación (38) (**figuras 3-7**) y, por tanto, una rápida osteointegración del implante (39, 40, 41); o también, tras la formulación de PRGF líquido, utilizado para humedecer y bioactivar la superficie de un implante y así conseguir mejorar su osteointegración (40, 42) (**figura 8**). El empleo de células madre para la regeneración ósea es una opción válida y, por tanto, una alternativa. Existen varios estudios que han tenido resultados prometedores debido a que la exposición

Figura 3. Centrífuga: obtención de plasma de la sangre del paciente; posteriormente, se extraerá PRGF (imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños).



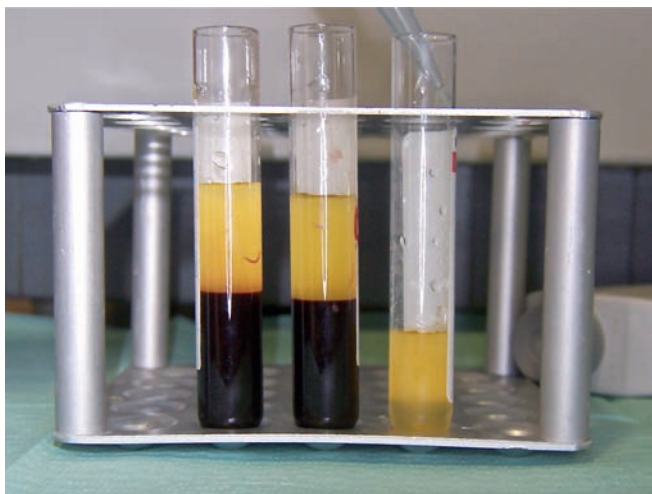


Figura 4. Tubos de ensayo: sangre del paciente para obtener el PRGF (imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños).

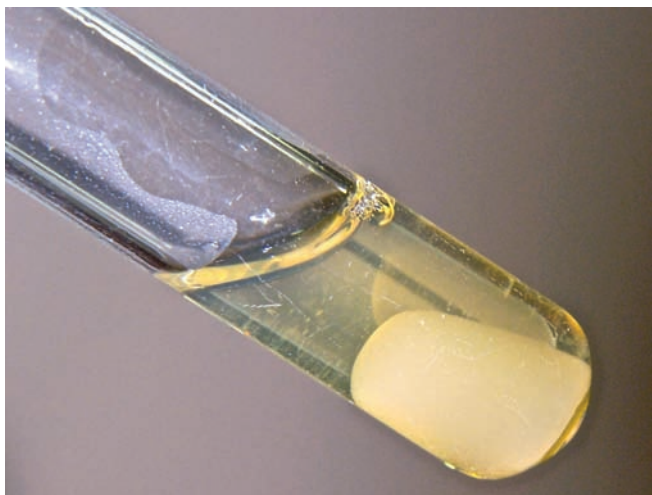


Figura 5. Tubo de ensayo con coágulo de PRGF (imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños).

Figura 6. Coágulo de PRGF con hueso bovino (imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños).

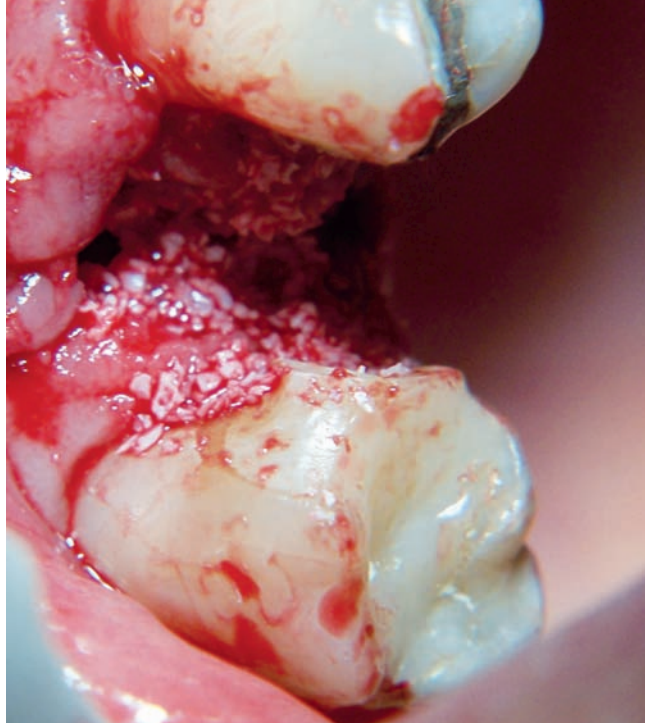


Figura 7. Colocación del coágulo en área que precisa regeneración ósea (imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños).

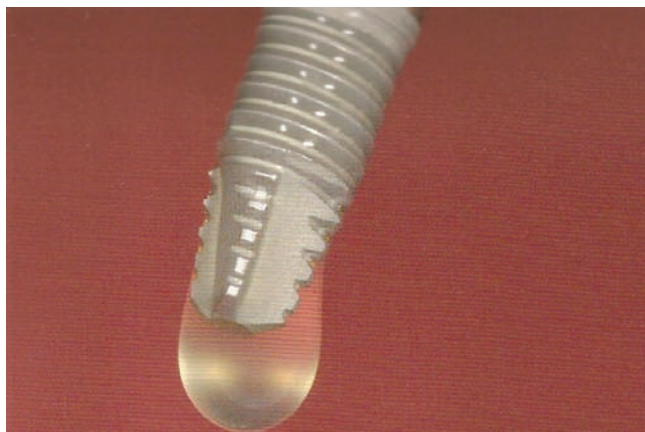


Figura 8. PRGF líquido activado empleado para bioactivar la superficie de los implantes dentales.

de estas células a la superficie del titanio demuestra proliferar y expresar genes identificativos óseos (43). Unos investigadores intentaron buscar una alternativa regenerativa con «hueso inyectable», que se obtuvo combinando células madre mesenquimales de la cresta ilíaca y plasma rico en plaquetas (PRP) (44).

Tras la colocación de un implante, esta sustancia fue inyectada en el área que precisaba regeneración ósea, que fue cubierta con una membrana de colágeno. Se pudo demostrar que es una técnica segura y eficaz en el 100 por 100 de los pacientes tratados (44), a pesar de que esta técnica la discutan otros estudios (12). Unos investigadores propusieron utilizar pegamento de fibrina, un hemostático que promueve la neovascularización del hueso y formación del mismo (45), conjuntamente con células madre mesenquimales de médula ósea provenientes de perros y plasma rico en plaquetas para regenerar tejido óseo (1).

Tras la extracción de un diente control y otras dos para

usarlos como variables, se dejaron cicatrizar por 1 mes. Las variables eran fibrina; células madre mesenquimales y fibrina; y plasma rico en plaquetas, fibrina y células madre. En el último, se observaron unos excelentes resultados en cuanto a la regeneración, y hubo un elevado porcentaje de BIC (contacto implante-hueso) (1, 46). Incluso, reportaron que la combinación de pegamento de fibrina con células madre favorece la migración de estas células indiferenciadas a su estructura, ocasionando una proliferación de las mismas y, además, favorecen la angiogénesis (1).

En un estudio realizado por Ishikawa et al (47), se combinan las capacidades osteoinductivas de las proteínas morfogenéticas (BMP) con células madre mesenquimales provenientes de la médula ósea. Compararon *in vitro* la diferencia entre un cultivo de células madre con BMP-2 recombinante, y un cultivo de células sin BMP-2 recombinante. El primer grupo produjo mayores números de expresiones osteogénicas. Posteriormente, las células que se diferenciaron con BMP-2 recombinante fueron implantadas en ratas y formaron tejidos óseos y cartilagosos (51). Esto demuestra que las células madre mesenquimales pueden diferenciarse mediante BMP-2 recombinante, potenciando la inducción y formación ósea (47).

Una investigación realizada por Pieri et al (48), asocia el plasma rico en plaquetas (PRP) con células madre mesenquimales de la cresta ilíaca (osteodiferenciadas) para hacer elevaciones de seno para la posterior colocación de implantes en cerdos. En un grupo agregaron PRP y células madre asociadas a un andamio de fluorohidroxia-

patita (FH), mientras que en el otro sólo colocaron la FH. La cantidad de formación ósea tras la elevación de seno fue mayor en el primer grupo. Demostraron que las células madre mesenquimales de la cresta ilíaca y el PRP mejoran la formación ósea e incrementan el contacto hueso implante (48). La aplicación clínica de células madre pulpares también fue utilizada para mejorar la regeneración ósea tras las extracciones de terceros molares impactados. Generalmente, tras la extracción de las piezas dentarias mencionadas, existe una pérdida de la cortical alveolar, dejando el área sin paredes y generando a largo plazo la extracción de los segundos molares (49). Como consecuencia, decidieron colocar las células madre pulpares (en matrices o andamios de colágeno) de los mismos terceros molares, y se compararon las densidades óseas con otra zona de extracción (control) (49) (**figuras 9 y 10**). En 7 días se apreciaba cómo en el lado con la matriz de células madre existía mayor densidad ósea. Esos resultados se mantuvieron en el tiempo y, además, se analizaron 3 meses después, tras una muestra del mismo, que demostraba una arquitectura adecuada, vascularizada y organizada (49). El lado control presentaba un hueso fibroso, con evidencia de reabsorción ósea. Esto comprueba que con una matriz adecuada y células madre pulpares se puede conseguir eficazmente la regeneración ósea (**figura 11**). A pesar de los resultados positivos, este procedimiento sólo se pudo seguir con 7 pacientes, por tanto, se debería repetir en una población más amplia para comprobar si efectivamente funciona (49).

Figura 9. Lado control: exodoncia y extracción pulpar del diente. Se coloca una esponja de colágeno sin células madre pulpares en el lugar de la exodoncia. Se sutura.



Figura 10. Lado variable: extracción del tercer molar. Entre la esponja de colágeno y las células madre se forma un biocomplejo. Injerto del biocomplejo. Se acaba la cirugía con la colocación de los puntos de sutura.



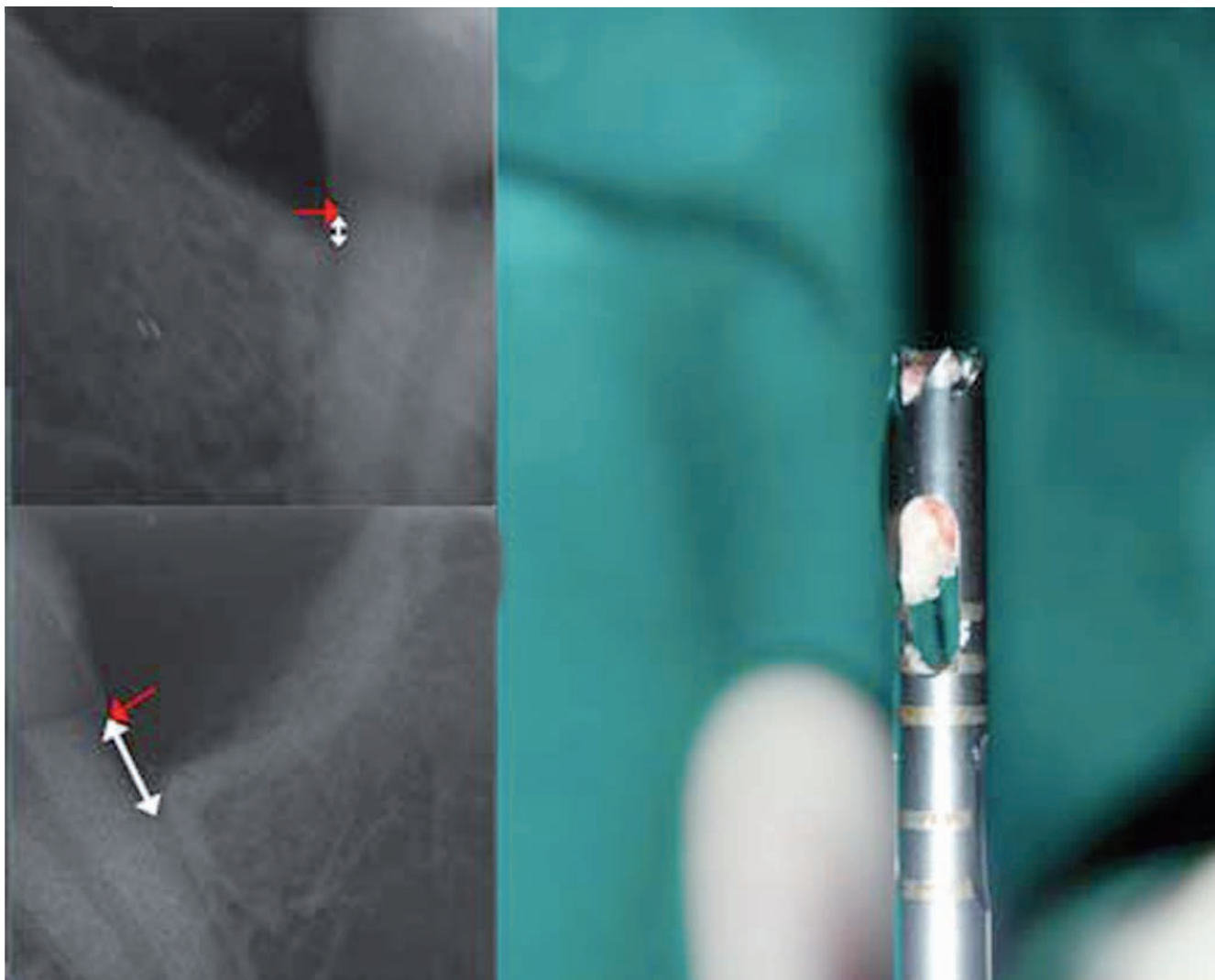


Figura 11. Radiografía (control y variable) y muestra del hueso 3 meses después de la intervención quirúrgica.

Conclusiones

- Para hacer regeneraciones de tejidos orales, se pueden emplear células madre que provienen de la médula ósea, el cordón umbilical o, incluso, células madre de más fácil acceso (ligamento periodontal, pulpa dental, células madre de la papila apical radicular y dientes deciduos) (50, 51, 52).
- Las células madre provenientes de tejidos dentales son una útil alternativa para la regeneración de tejidos (26), ya que se pueden expandir y cultivar (51).
- En el ligamento periodontal humano existe una población de células de distinto nivel de madurez, incluyendo progenitores multipotenciales (36), aunque también se ha demostrado la capacidad de diferenciación de las células madre provenientes de la papila apical radicular (13, 14).
- Existe un riesgo asociado a la transmisión de priones o zoonosis en las técnicas de cultivo que actualmente se utilizan en estas células; como consecuencia, dificultan la aplicación de estos estudios a nivel clínico (36).
- El mayor reto en las técnicas de regeneración de tejidos es encontrar un buen andamiaje: con óptimas propiedades mecánicas y biológicas, capaces de recibir un gran número de células y permitir la proliferación de éstas (21, 25).
- En la regeneración de tejidos dentarios, el tamaño de los dientes es proporcional al andamiaje utilizado, ya que las piezas dentarias regeneradas son de las mismas dimensiones del andamiaje (4, 12).
- El uso de BMP, PRP, PRGF, fibrina, andamios de colágeno y laminina potencian la regeneración ósea, aunque demuestran mejores resultados si son asociados a células madre (1, 3, 30, 44, 47, 48).

PROCEDENCIA DE LAS FIGURAS

- Anitua E.** Un Enfoque Biológico de la Implantología. SL Vitoria, España. Team Work Media España: 2008. Figura 11, Cultivo primario de un aspirado de médula ósea que contiene células multipotenciales con gran capacidad de proliferación y diferenciación. p. 28.
- Wataru Sonoyama, Yi Liu, Dianji Fang, Yamaza Takayoshi, Byoung-Moo Seo, Zhang Chunmei, He Liu, Gronthos Stan, Cun-Yu Wang, Songtao Shi, Songlin Wang.** Mesenchymal stem cell mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS ONE. 1:1:9. 2006. Figura 5, Células madre provenientes de la papila apical radicular/ligamento periodontal. Las células se alojan en una raíz artificial para luego restaurar la función dentaria. Incisivo inferior extraído (cerdo) y andamio de HA/TCP con células madre de la papilla apical radicular. p. 5.
- Carrión J.** Imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños.
- Carrión J.** Imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños.
- Carrión J.** Imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños.
- Carrión J.** Imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños.
- Carrión J.** Imagen por cortesía del Dr. Juan Carrión Bolaños.
- Anitua E.** Un Enfoque Biológico de la Implantología. SL Vitoria, España. Team Work Media España: 2008. Figura 61, PRGF líquido activado empleado para bioactivar la superficie de los implantes dentales. p. 61.
- D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Iaino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G.** Human Mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge complexes. European Cells and Materials. 2009. Vol 18: 75-83. Figura 2, Procedimiento quirúrgico. p. 78.
- D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Iaino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G.** Human Mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge complexes. European Cells and Materials. 2009. Vol 18: 75-83. Figura 2, Procedimiento quirúrgico. p. 78.
- D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Iaino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G.** Human Mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge complexes. European Cells and Materials. 2009. Vol 18: 75-83. Figura 5, Radiografía y muestra del hueso 3 meses tras la intervención quirúrgica. p. 79.

BIBLIOGRAFÍA

- Ito Kenji, Yamada Yoichi, Naiki Takahito, Ueda Minoru.** Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. Clinical Oral Implant Research. 17, 2006: 579-586.
- Lee Jue-Yeon, Choo Jung-Eun, Choi Young-Sook, Shim In-Kyong, Lee Seung-Jin, Seol Yang-Jo, Chung Chong-Pyoung, Park Yo-on-Jeong.** Effect of immobilized cell-binding peptides on chitosan membranes for osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. Biotechnology and Applied Biochemistry 2009: 52: 69-77.
- Li Houxuan, Yan Fuhua, Lei Lang, Li Yanfen, Xiao Yin.** Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs. Cells Tissue Organs 2009: 190: 94-101.
- Tzong-Fu Kuo, An-Ting Huang, Hao-Hueng Chang, Feng-Huei Lin, San-Tai Chen, Rung-Shu Chen, Cheng-Hung Chou, Hsin-Chi Lin, Han Chiang, Min-Huey Chen.** Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine. Journal of Biomedical Materials Research. 2008: 86 A: 1062-1068.
- Anitua E.** Un nuevo enfoque en la regeneración ósea: Plasma rico en factores de crecimiento. SL. Vitoria, España: Puesta al Día publicaciones: 2000.
- Li Zhi, Li Zu-Bing.** Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. ANZ J Surgery. 2005: 75: 1017-1021.
- Okubo Yasunori, Bessho Kazuhisa, Fujimura Kazuma, Kusumoto Kenji, Ogawa Yutaka, Iizuka Tadahiko.** Expression of bone morphogenetic protein in the course of osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2. Clinical Oral Implantology Research. 2002: 13: 80-85.
- Draenert GF, Draenert K, Tischer T.** Dose-dependent osteoinductive effects of bFGF in rabbits. Growth Factors. 2009: 27 (6): 419-424.
- Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Mittlbock M, Sanroman F, Watzek G.** Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs. Journal Clinical Periodontology. 2004: 31: 784-790.
- Baba Shunsuke, Inoue Takeomi, Hashimoto Yoshiya, Kimura Daisuke, Ueda Masatoshi, Sakai Kana, Matsumoto Naoyuki, Hiwa Chiaki, Adachi Taiji, Hojo Masaki.** Effectiveness of scaffolds with pre-seeded mesenchymal stem cells in bone regeneration—Assessment of osteogenic ability of scaffolds implanted under the periosteum of cranial bone of rats—. Dental Materials Journal. 2010: 29 (6): 673-681.
- Ueda Minoru, Tohnai Iwai, Nakai Hidetaka.** Tissue Engineering Research in Oral Implant Surgery. Artificial Organs. 2001: 25 (3): 164-171.
- Xu HHK, Zhoo L, Weir MD.** Stem Cell- Calcium Phosphate Constructs for Bone Engineering. Journal of Dental Research. 2010: 89 (12): 1482-1488.
- Wataru Sonoyama, Yi Liu, Dianji Fang, Yamaza Takayoshi, Byoung-Moo Seo, Zhang Chunmei, He Liu, Gronthos Stan, Cun-Yu Wang, Songtao Shi, Songlin Wang.** Mesenchymal stem cell mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS ONE. 2006: 1: 1: 9.
- Ding Gang, Liu Yi, An Yunqing, Zhang Chunmei, Shi Songtao, Wang Wei, Wang Songlin.** Suppression of T Cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. Cells Tissues Organs. 2010: 191: 357-364.
- Huang George TJ, Sonoyama Wataru, Liu He, Wang Songlin, Shi Songtao.** The hidden treasure in apical papilla: The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. Journal of Endodontics. 2008: 34: 645-651.
- Zhen Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, Shi S, Le AD, wang Le, Wang SL.** Stem Cells from Deciduous Tooth Repair Mandibular Defect in Swine. Journal of Dental Research. 2009: 88:249.
- Bluteau, G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA.** Stem Cells for Tooth Engineering. European Cells and Materials. 2008: 16.
- Harichane Y, Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Granja I, Goldberg M, Kellermann O, Poliard A.** Pulp Progenitors and Dentin Repair. Advances in Dental Research 2011: 23: 307.
- El-Backly Rania M, Massoud Ahmed G, El-Badry Azza M, Sherif Raef A, Marei Mona K.** Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. Australian En-

- dodontic Journal 2008; 34: 52-67.
20. **Wang Yin-Xiong, Ma Zhao-Feng, Huo Na, Tang Liang, Han Chun, Duan Yin-Zhong, Jin Yan.** Porcine tooth germ cell conditioned medium can induce odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2010; DOI: 10. 1002/term.
 21. **Tarle SA, Shi S, Kaigler D.** Development of a serum-free system to expand dental-derived stem cells: PDLSCs and SHEDs. *Journal of Cellular Physiology* 2010; 226: 66-73.
 22. **Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE.** Differentiation of stem cells in the dental follicle. *Journal of Dental Research* 2008; 87 (8): 767-771.
 23. **Teixeira S, Yang L, Dijkstra PJ, Ferraz MP, Monteiro FJ.** Heparinized hydroxyapatite/collagen three dimensional scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med* 2010; 21: 2385-2392.
 24. **Mina Mina, Braut Alen.** New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs.* 2004; 176: 120-133.
 25. **Hacking SA, Khademhosseini A.** Applications of microscale technologies for regenerative dentistry. *Journal of Dental Research.* 2009; 88: 409.
 26. **Joenoos, Hedjanti, Yuniastuti Mindia, Bachtiar Endang W, Bachtiar Boy M.** Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1/BMP-2 and its involvement in differentiation of human dental pulp-derived cells into an odontoblastic lineage. *Makara of Health Sciences.* 2009; 13: 1: 5-8.
 27. **Ando Yusuke, Honda Masaki J, Ohshima Hayato, Tonomura Akiko, Ohara Takayuki, Itaya Thoshimitsu, Kagami Hideaki, Ueda Minoru.** The induction of dentin bridge-like structures by constructs of subcultured dental pulp-derived cells and porous HA/TCO in porcine teeth. *Nagoya Journal of Medical Sciences.* 2009; 71: 51-62.
 28. **Duailibi S.E, Duailibi M.T, Zhang W, Asrican R., Vacanti J.P, and Yelick PC.** Bioengineered Dental Tissues Grown in the Rat Jaw. *Journal of Dental Research:* 2008; 87: 8.
 29. **Yang Xuechao, Yang Fang, Walboomers Frank, Bian Zhuan, Fan Mingwen, Jansen John A.** The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/15. gelatin/nHA scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* 2010. 93 A: 247-257.
 30. **Yoshikawa Masataka, Tsuji Norimasa, Shimomuta Yasunori, Hayashi Hiroyuki, Ohgushi Hajime.** Effects of laminin for osteogenesis in porous hydroxyapatite. *Macromolecular Symposia.* 2007; 253: 172-178.
 31. **Byoung-Moo Seo, Masako Miura, Gronthos Stan, Bartold Perter Mark, Batouli Sara, Brahim Jaime, Young Marian, Robey Pamela Gehron, Cu-Yu Wang, Songtao Shi.** Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet* 2004; 364: 149-155.
 32. **Trubiani O, Orsini G, Zini N, Di Iorio D, Piccirilli M, Piattelli A, Caputi S.** Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: a morphological report. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2008; 87 A: 986-993.
 33. **Inanc Bulend, Elcin Eser A, Koc Aysel, Balos Koksak, Parlar Ates, Elcin Murat Y.** Encapsulation and osteoinduction of human periodontal ligament fibroblasts in chitosan-hydroxyapatite microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2007; 82 A: 917-926.
 34. **Trubiani O, Isgro A, Zini N, Antonucci I, Aiuti F, Di Primio R, Nanci A, Caputi S, Paganelli R.** Functional interleukin-7/Interleukin-7Ralpha, and SDF-1alpha/CVCR4 are expressed by human periodontal ligament derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology* 2008; 214: 706-713.
 35. **Lin Y, Gallucci GO, Buser D, Bosshardt D, Belser UC, Yelick PC.** Bioengineered periodontal tissue formed on titanium dental implants. *Journal of Dental Research:* 2011; 90(2).
 36. **Coura GS, Garcez RC, Mendes de Aguiar CBN, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG.** Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *Journal of Periodontal Research.* 2008; 43: 531-536.
 37. **D'Aquino R, Papapccio G, Laino G, Graziano A.** Dental Pulp Stem Cells: A promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008; 4: 21-26.
 38. **Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden Alan T.** Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
 39. **Anitua E.** Enhancement of Osseointegration by generating a dynamic implant surface. *Journal of Oral Implantology* 2006; 2: 72-76.
 40. **Anitua E, Orive G, Pla R, Roman P, Serrano V, Andia I.** The effect of PRGF on bone regeneration and on titanium implant osseointegration in goats: A histologic and histomorphometric study. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2009; 91 A: 158-165.
 41. **Mozzati M, Martinaso G, Pol R, Polastri C, Cristiano A, Muzio G, Canuto R.** The impact of plasma rich in growth factors on clinical and biological factors involved in healing processes after third molar extraction. *Journal of Biomedical Materials* 2010; Part A: 95 A: 741-746.
 42. **Anitua E, Prado R, Orive G.** A lateral approach for sinus elevation using PRGF technology. *Clinical Implant Dentistry and Related Research.* 2009; 11: supplement 1.
 43. **Stiehler M, Lind M, Mygind T, Baatrup A, Dolatshahi-Pirouz A, Li H, Foss M, Besenbacher F, Kassem M, Buner C.** Morphology, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum and chromium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2008; 86 A: 448-458.
 44. **Ueda Minoru, Yamada Yoichi, Kagami Hideaki, Hibi Hideharu.** Injectable bone applied for ridge augmentation and dental implant placement: Human Progress Study. *Implant Dentistry.* 2008; 7: 1.
 45. **Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Sanroman F, Watzek G.** Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. *Clinical Oral Impl. Research.* 2004; 15: 301-307.
 46. **Yamada Yoichi, Ueda Minoru, Naiki Takahito, Nagasaka Tetsuro.** Tissue engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res.* 2004; 15: 589-597.
 47. **Ishikawa Hisato, Kitoh Hiroshi, Sugiura Fumiaki, Ishiguro Naoki.** The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Acta Orthopaedica* 2007; 78: 2: 285-292.
 48. **Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli a, Giardino R, Bassi M, Donati D, Marchetti C.** Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 539-546.
 49. **D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Iaino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G.** Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge complexes. *European Cells and Materials.* 2009; 18: 75-83.
 50. **Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S.** The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontic Craniofacial Research* 2005; 8: 191-199.
 51. **Ohazama A, Modena SAC, Miletich I, Sharpe PT.** Stem-cell-based tissue engineering of Murine Teeth. *Journal of Dental Research* 2004. 83: 7: 518-522.
 52. **Modino Sonie AC, Sharpe Paul T.** Tissue Engineering of teeth using adult stem cells. *Archives of Oral Biology.* 2005; 50: 225-258.