



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

"Uso de Células Mesenquimales de Pulpa Dental para
Reconstrucción Mandibular: Estudio Preclínico en Cerdos"

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL

P R E S E N T A:

JUAN CARLOS LÓPEZ LASTRA

TUTOR: Esp. JUAN CARLOS LÓPEZ NORIEGA

“Uso de Células Mesenquimales de Pulpa Dental para Reconstrucción Mandibular: Estudio Preclínico en Cerdos”

Facultad de Odontología



R4CMF Juan Carlos López Lastra*, CMF Juan Carlos López Noriega§

Especialidad de Cirugía Maxilofacial

Dr. Alejandro Alonso Moctezuma Coordinador

Resumen

En la actualidad existen diversos métodos para la reconstrucción de defectos en la región maxilofacial, uno de los más actuales es el uso de células troncales e ingeniería tisular con la finalidad de reducir la morbilidad de los injertos autólogos así como mejorar la calidad de los tejidos obtenidos. Las células troncales mesenquimales para ser consideradas como tal, deben de cumplir con ciertos criterios. Su fuente de obtención es muy amplia, pero la que presentamos en esta revisión son obtenidas de pulpa dental de dientes sanos extraídos indicada su extracción por diversos motivos medico-odontológicos. Durante muchos años se ha estudiado el comportamiento de estas células tanto in-vitro como in-vivo dando como resultado un comportamiento morfológico fisiológico y genético estable. En este artículo presentamos la investigación de un método novedoso para la reconstrucción mandibular de defectos críticos realizados en la mandíbula de un cerdo. Los resultados obtenidos fueron los esperados en el sitio tratado tanto en cantidad como en calidad ósea obtenida. Concluimos que el uso de este método novedoso para la

Palabras Clave: Células Troncales, Mesenquimales, Reconstrucción mandibular.

reconstrucción mandibular es seguro y eficaz.

Abstract

Currently there are various methods for the reconstruction of defects in the maxillofacial region, one of the most current is the use of stem cells and tissue engineering in order to reduce the morbidity of autologous grafts and improve the quality of the tissues obtained. The mesenchymal stem cells are stem cells derived from the mesodermal layer and to be considered as such, they must meet certain criteria. Its source is very broad, but the one we present in this review are mesenchymal cells obtained from dental pulp of healthy extracted teeth. For many years the behavior of these cells has been studied both in-vitro and in-vivo, resulting in a stable physiological, genetic and morphological behavior. In this article we present the investigation of a novel method for the mandibular reconstruction of critical size defects made in the jaw of a pig. The results obtained were those expected in the treated site, both in quantity and in bone quality. We conclude that the use of this novel method for mandibular reconstruction is safe and effective.

*Alumno de la especialidad de Cirugía Oral y Maxilofacial FO UNAM.
§ Cirujano Maxilofacial Profesor de la Especialidad de la DEPEI, FO UNAM

Rafael
V. Bo.
4/III/2019

Introducción

Históricamente se han desarrollado diversos métodos para la reconstrucción de la región maxilofacial. Actualmente el uso de ingeniería tisular y terapia celular ha ganado terreno tanto en la reconstrucción de defectos cráneo-maxilofaciales como en diferentes áreas clínicas como son la neurocirugía, neurología, cardiología, angiología, inmunología, ortopedia, oftalmología y reumatología por solo mencionar algunas.¹

La definición clásica de las células troncales (células madre como eran conocidas anteriormente) se basa fundamentalmente en una perspectiva funcional ya que estas células no poseen características fenotípicas propias. Se definen como células indiferenciadas, capaces de auto renovarse y de producir una gran cantidad de células progenitoras especializadas y funcionales, regenerar tejidos después de sufrir lesiones, siendo estas flexibles en el uso de todas estas opciones.^{2,3}

Otra definición que puede ser utilizada y agrega algunos conceptos importantes es la dada por Anderson y cols. en el año 2001 que nos dicen que las células troncales son aquellas capaces de auto replicarse y diferenciarse in-vitro e in-vivo y que para que realmente sean consideradas como células troncales requieren de ser positivas a ciertos marcadores celulares específicos.⁴

Las células troncales mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés) son células troncales derivadas de la capa germinativa mesodérmica, su definición dada por la Sociedad

Internacional de Terapia Celular nos menciona que estas deben cumplir ciertos criterios mínimos para ser llamadas de esta forma, estos criterios son los siguientes⁵:

- Capacidad de adherirse al plástico de las cajas de cultivo.
- Positividad y negatividad a ciertos marcadores específicos. Positivos: CD73, CD90, CD105. Negativos: CD14, CD34, CD45 y HLA-DR.
- Capacidad para diferenciarse en células de origen mesenquimal: adipocitos, condrocitos y osteoblastos.

El objetivo de este artículo es presentar la reconstrucción de defectos mandibulares críticos en cerdos con un método novedoso, el cual es el uso de células mesenquimales expandidas de origen dental para la reconstrucción de los mismos.

Antecedentes Históricos

El término "célula madre" se utilizó por primera vez en hematología en 1896, cuando Pappenheim propuso la existencia de una célula precursora capaz de dar origen a las estirpes celulares de la sangre.⁶

En 1960, Mc- Culloch y Till notaron que ratones radiados letalmente, a los que se había inyectado células extraídas de la médula ósea de ratones no radiados, podían sobrevivir y comenzaron a analizar los tejidos hematopoyéticos de estos animales con la finalidad de encontrar los componentes causales de la

regeneración sanguínea. De esta manera, hallaron masas tumorales en el bazo de los ratones que, una vez examinadas, resultaron ser colonias de células hematopoyéticas, capaces de generar las tres estirpes celulares, de donde nació el concepto y definición de la célula madre como aquella capaz de auto renovarse, diferenciarse y proliferar extensamente.⁶

Existe un grupo de investigadores los cuales marcan un parte aguas en el estudio de las células troncales mesenquimales, este grupo comandado por el investigador Alexander Friedenstein inician sus estudios a finales de los años 60 y continúan durante toda la década de los 70's. Este grupo utilizando ratones en sus experimentos identifican a la población mesenquimal por su capacidad para adherirse al plato de cultivo. Estas células fueron denominadas unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F por sus siglas en inglés) o mecanocitos estromales.^{7,8} Hasta esta época todos los estudios habían sido realizados en animales pero posteriormente Caplan y cols. desarrollan un método el cual permitía cultivar células mesenquimales de humanos adultos.⁹

Este grupo logró obtener y diferenciar células troncales mesenquimales de adultos, su método se basaba en obtener médula ósea a partir de aspirados de cresta iliaca de donadores sanos. Después de 3 días de cultivo las células que no se adherían se removían y las células que si se adherían se mantenían en cultivo in vitro. El estudio reveló que de todas las células cultivadas, solo un poco porcentaje tenía la capacidad

de adherirse y formar colonias. Estas células adheridas eran primordialmente de aspecto fibroblastoide aunque también encontraron células poligonales y redondas aunque en menor cantidad. Reportan aparición de 1 a 5 CFU-F por cada 100,000 células nucleadas de médula sembradas. Las colonias eran formadas entre 14 y 21 días pero reportan que posterior a eso hubo un crecimiento exponencial de las células.⁹

Caplan también describe la capacidad de diferenciación de las células mesenquimales adultas y reporta que tienen la capacidad de dar linajes celulares a cartílago y hueso. En conclusión de todos sus estudios, Caplan propone que estas células son un muy buen candidato en Medicina Regenerativa, siempre y cuando sean expandidas y caracterizadas previamente in-vitro.¹⁰

Posteriormente Thompson y cols. en 1998 logra aislar células troncales de un embrión humano. Las células fueron obtenidas de la masa interna del blastocisto de un embrión previamente cultivado in-vitro. Estas células que tienen la característica de ser pluripotentes habían sido obtenidas anteriormente de embriones de ratones pero nunca de humanos.¹¹

En el año 2000 se realiza una publicación sumamente importante para quienes estudian las células troncales mesenquimales. Gronthos y cols. logran aislar células mesenquimales de la pulpa dental de terceros molares extraídos. Estas células obtenidas fueron cultivadas y comparadas en varios aspectos contra células mesenquimales de la médula ósea arrojando resultados

sorprendentes. En primer lugar las células obtenidas de la pulpa dental forman un mayor número de colonias que las células obtenidas de médula ósea. En su análisis inmunohistoquímico ambas células resultaron ser similares a los marcadores positivos y negativos específicos de MSC. Por último demostraron que las células de origen dental tienen un potencial de diferenciación mayor al de las células obtenidas de la médula ósea.¹²

Como último punto de los antecedentes históricos nos pareció importante mencionar a los ganadores del Premio Nobel de Medicina en el año 2012 Sir John B. Gurdon y el Dr. Shinya Yamanaka los cuales obtienen este premio gracias a su descubrimiento de que las células adultas diferenciadas pueden ser inducidas y reprogramadas para volverlas células troncales indiferenciadas y así volverlas pluripotentes.¹³

Materiales y métodos

Manejo de las células

Todas las muestras obtenidas de pulpa dental fueron de donadores humanos sanos, los cuales fueron previamente informados del procedimiento a realizar y firmaron consentimiento informado. Una vez asiladas las células mesenquimales, con los métodos mencionados por Gronthos y cols.¹², se siembran en un frasco con medio de cultivo y son llevadas a la cámara de cultivo, la cual se encuentra a 37°C con 5% de Co₂ y oxígeno atmosférico. Estos frascos de cultivo son monitoreados microscópicamente cada tercer día

para observar y verificar el desarrollo de unidades formadoras de colonias. Previo a la criopreservación mediante un análisis de polimerasa de reacción en cadena se descarta que estas células hubieran estado en contacto con patógenos virales (Hepatitis B, Hepatitis C, Citomegalovirus), hongos, y bacterias (*Mycoplasma oralis*).

Se realiza la criopreservación de las mismas en nitrógeno líquido a -196° C y previo a su uso el descongelamiento de las mismas.

Sujetos de Estudio

Los cerdos domésticos jóvenes se obtuvieron de una granja veterinaria de cerdos mantenida con fines de investigación. Se incluyeron en el estudio dos cerdos de entre 35 a 41 kg. Se les realizaron defectos mandibulares críticos previamente descritos por Sun et al.¹⁴ Se realizaron abordajes submandibulares y eliminación del periostio pterigoideo y maseterino así como la ligadura de la arteria dentaria inferior previo a la realización del defecto mandibular crítico. (Fig.1, 2 y 3) El Comité de Bioética del Instituto de Investigación Biomédica (Universidad Nacional Autónoma de México) y el Comité de Estudios Preclínicos de "Innovaciones y Desarrollo en Biotecnología Celular SA DE CV", México, aprobaron el uso de cerdos domésticos para este estudio.

Células Injertadas

Las células mesenquimales indiferenciadas previamente

marcadas con proteína verde fluorescente y se colocaron 6×10^6 células por cm^2 de defecto creado. Estas fueron cultivadas en una matriz de colágena bovina y combinadas con hueso desmineralizado de cadáver humano como osteoconductor, todo esto contenido por una malla de titanio. (Fig. 4, 5)

Grupo Control

En el grupo control se realizó el mismo procedimiento en el cual se desperiostizan los músculos, se liga la arteria y se realiza el defecto óseo. En este grupo se coloca la matriz de colágeno con el hueso desmineralizado de cadáver humano y la malla de titanio sin células mesenquimales. (Fig 6.)

Resultados

En el defecto crítico creado en el cerdo de grupo de estudio, se obtuvo una regeneración ósea del 100% del defecto preexistente, a los 4 meses post trasplante (Fig. 7). El hueso obtenido y disecado mostró hueso tipo cortical, similar al hueso normal del área del ángulo mandibular del cerdo. Este hueso cortical se encontraba cubierto por un nuevo periostio y las figuras 8 y 9 muestran este hueso cortical de la misma morfología del defecto inicial y un periostio grueso y bien vascularizado mostrando la impronta de la malla de titanio que contenía el injerto con las células mesenquimales.

En la figura 10 en el cerdo control en el cual se realizó el mismo tipo de defecto y se reconstruyó con los mismo elementos pero sin células

mesenquimales, se observa la lisis parcial del hueso injertado el cual presentaba datos de infección aguda; no se demostró la regeneración ni de hueso cortical ni de periostio.

Discusión

Con el fin de brindar una mejor calidad de vida a nuestros pacientes, durante muchos años se han estudiado diversos métodos para la reconstrucción mandibular como son los injertos autólogos en bloque y particulados, injertos autólogos libres, uso de distracción osteogénica, alo o xenoinjertos solos o en combinación con proteína morfogenética recombinante, todos estos con diversos efectos positivos y negativos en su utilización, lo cual nos impulsa a buscar métodos novedosos y menos invasivos.

Existen diversos reportes de uso de ingeniería tisular así como diferentes fuentes de células mesenquimales para la reconstrucción de defectos óseos en el maxilar y la mandíbula^{15,16,17,18}, pero no fué hasta el año 2009 que se realiza la primer publicación de uso de células mesenquimales de pulpa dental para defectos post extracción de terceros molares en humanos.¹⁹

En la actualidad hay reportados diversos usos de estas células para las diferentes ramas de la odontología. En endodoncia, la regeneración pulpar a través de células mesenquimales de pulpa dental obteniendo buenos resultados en la regeneración pulpar, sin efectos adversos ni toxicidad.²⁰

En la rama de la periodoncia existen reportes actuales del tratamiento de defectos intraóseos con células obtenidas del ligamento periodontal humano, en el artículo se trataron a 30 pacientes con periodontitis y el seguimiento fue de 12 meses, obteniendo adecuados resultados y concluyen que el uso de estas células es seguro y no producen efectos adversos significativos.²¹

En la reconstrucción de la región maxilofacial existen múltiples reportes del uso de MSC obtenidas de diferentes fuentes, principalmente de médula ósea y de grasa, para su uso clínico, tanto en rebordes alveolares atróficos como en defectos por hendiduras por labio y paladar hendido.^{22, 23, 24}

Actualmente el único reporte para reconstrucción mandibular con células mesenquimales obtenidas de pulpa dental es la regeneración de un defecto mandibular post resección de un ameloblastoma en el cual tienen un seguimiento a 1 año y medio sin recurrencia del tumor, colocación y carga de implantes en el hueso obtenido a partir de estas células.²⁵

En esta publicación demostramos que el uso de las células obtenidas de pulpa dental humana es efectivo en la regeneración de defectos mandibulares críticos, en corto tiempo y con hueso en adecuada cantidad y calidad.

Conclusiones

Desde hace muchos años se ha intentado corregir los defectos óseos cráneo-maxilofaciales con diversos métodos, los cuales hasta el día de

hoy, cuando se utilizan de manera adecuada, normalmente se obtienen resultados adecuados. Cuando existen defectos críticos el uso de estos métodos de reconstrucción normalmente son demasiado invasivos para el paciente.

Por sus diversas fuentes sabemos que las células mesenquimales son una fuente de fácil acceso ya que podemos obtenerlas de dientes deciduos, ligamento periodontal, premolares y molares sanos extraídos y grasa entre otras.

Otra punto importante es que estas células han sido profundamente estudiadas por muchos años en cuanto a su comportamiento una vez colocadas en los sujetos de estudio y no existen reportes de efectos secundarios importantes ni tampoco de formación de tumores.

En esta publicación concluimos que el uso de células mesenquimales humanas obtenidas de pulpa dental es seguro y efectivo para el tratamiento de defectos críticos mandibulares. Así mismo creemos en la necesidad de continuar estudiando este tipo de terapias para su futuro uso en humanos.

Referencias Bibliográficas

- 1.- Kim N, Cho SG. (July 2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells . The Korean Journal of Internal Medicine, 28-4, 387-407.
- 2.- Loeffler M. Roeder I. Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self- Organization and Models – A Conceptual Approach. Cells Tissues Organs. 2002;171(1):8-26
- 3.- Pelayo R. Santa-Olalla J. Velasco I. Células Troncales y Medicina Regenerativa. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 2011.
4. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. 2001. Can stem cells cross lineages boundaries? Nature 7: 393-395.
5. Dominici. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for

Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317.

6. Andreas-Holger Maehle. Ambiguous cells: The emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes & Records of The Royal Society of the History of Science*. 2011.

7. 41.- Friederstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968 ; 6: 230-47.

8.- Friederstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pigs bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393-403.

9.- 45.- 6.- Haynesworth SE, Goshima H, Golberg VM, Caplan I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992; 13: 81-8.

10. Arnold I. Caplan. Mesenchymal Stem Cells. *Journal of orthopaedic Research*. 9;641-650. 1991 Orthopaedic Research Society.

11. James A. Thompson, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, Jeffrey M. Jones. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145. 1998.

12.S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P. Gehron Robey, and S. Shi. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Diciembre 5 del 2000. vol. 97, no. 25, 13625-13630.

13.http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/

14. Sun Z. et al. Establishing a Critical-Size Mandibular Defect Model in Growing Pigs: Characterization of Spontaneous Healing. *J Oral Maxillofac Surg* -1-17,

15. Schmelzeisen R, Schimming R, Sittlinger M. Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg* 2003;31:34-9.

16. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:724-9.

17. Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M, Uematsu K, Ogawa S, et al. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone* 2012;50:1123-9.

18. Kulakov AA, Goldshtein DV, Grigoryan AS, Rzhabinova AA, Alekseeva IS, Arutyunyan IV, et al. Clinical study of the efficiency of combined cell transplant on the basis of multipotent mesenchymal stromal adipose tissue cells in patients with pronounced deficit of the maxillary and mandibular bone tissue. *Bull Exp Biol Med* 2008;146:522-5.

19. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater* 2009;18:75-83.

20. Nakashima et al. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study *Stem Cell Research & Therapy* (2017) 8:61

21. Chen et al. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial. *Stem Cell Research & Therapy* (2016) 7:33

22. Behnia, H., Khojasteh, A., Soieimani, M., Tehranchi, A., & Atashi, A. (2012). Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth

factors: a preliminary report. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*, 40(January (1)), 2-7.

23. D. Gladysz, K.K. Hozyasz. Stem cell regenerative therapy in alveolar cleft reconstruction *Archives of Oral Biology* 60 (2015) 1517-1532.

24. Gjerde et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Research & Therapy* (2018) 9:213

25. Manimaran, et al.: Regeneration of mandibular ameloblastoma defect with the help of autologous dental pulp stem cells and buccal pad of fat stromal vascular fraction. *Annals of Maxillofacial Surgery*. 2016, Vol 6 (1).

Imágenes

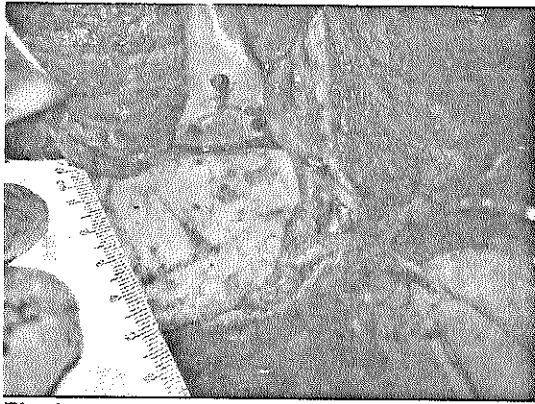


Fig 1.



Fig 2.

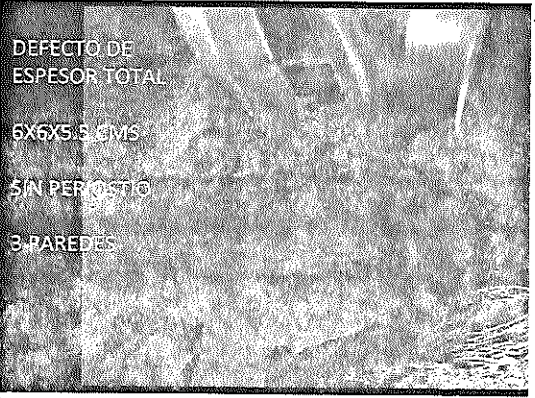


Fig 3.

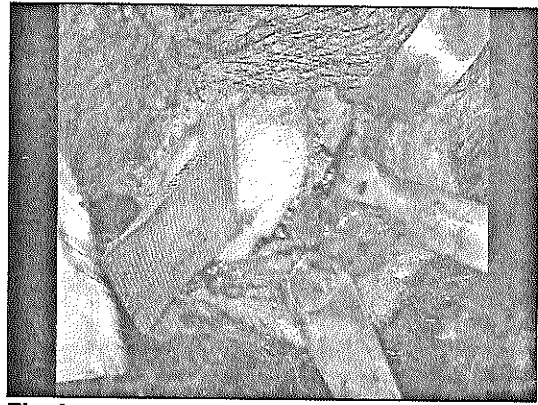


Fig 4.

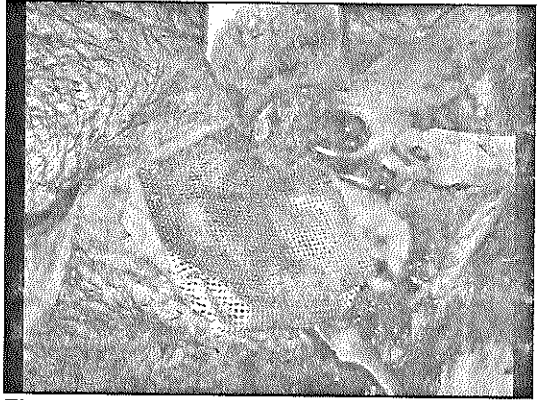


Fig 5.



Fig 6.

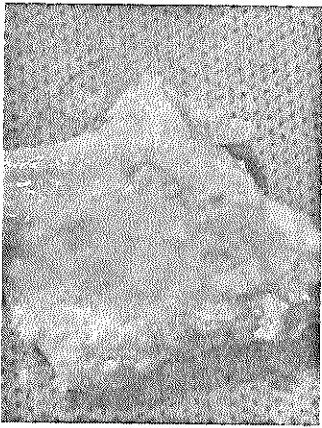


Fig. 7.

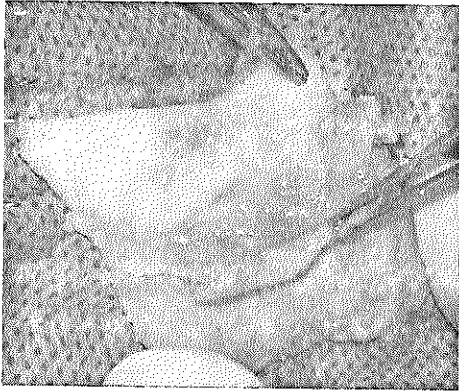


Fig. 8



Fig. 9

4 meses post injerto



Fig 10.