



Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología

Candidate markers, culture strategies and DPSC perspectives used as cellular therapy in dentistry

Stefanny Romero,* Katherine Córdoba,* Carlos A Martínez Valbuena,* Juan G Gutiérrez Quintero,* Juan Y Durán Riveros,* Juan Carlos Munévar Niño[§]

RESUMEN

La ingeniería tisular basada en las células troncales de pulpa dental se considera como un enfoque prometedor para la odontología regenerativa, con el objetivo final de reemplazar morfológica y funcionalmente los tejidos periodontales y/o los dientes perdidos a través de la síntesis *in vitro* de sustitutos análogos tisulares o, incluso, de un diente humano denominado biodiente. Las células troncales de la pulpa dental representan una colonia de células adultas que tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación en diferentes linajes. El origen exacto de las células troncales de la pulpa dental no ha sido completamente determinado y estas células troncales parecen ser la fuente de los odontoblastos que contribuyen a la formación del complejo dentinopulpar. Recientemente, los logros obtenidos a partir de la investigación de las células troncales nos han permitido contemplar las posibles aplicaciones terapéuticas de las células troncales de la pulpa dental. Algunos estudios han demostrado que las células troncales de la pulpa dental son capaces de producir tejidos dentales *in vivo*, incluyendo la dentina, la pulpa dental y las estructuras de la corona. Mientras que otras investigaciones han demostrado que estas células troncales se diferencian *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, en osteoblastos, neuroblastos, condrocitos, fibroblastos y endotelio. En teoría, un biodiente sintetizado a partir de las células troncales de la pulpa dental debe ser la mejor opción para recuperar la totalidad de la estructura y función de un diente humano. El objetivo de este artículo de revisión es hacer una breve descripción de la localización, origen, aislamiento y marcadores candidatos de células troncales de pulpa dental, para así plantear las perspectivas de aplicación en la clínica odontológica.

Palabras clave: Células troncales dentales, ingeniería tisular, CD105+, medicina regenerativa.

Key words: Dental stem cells, tissue engineering, CD105+, regenerative medicine.

ABSTRACT

Tissue engineering based on dental pulp stem cells is considered as a promising approach for regenerative dentistry. It purports the final target of morphologically and functionally replacing periodontal tissues and/or lost teeth by means of the *in vitro* synthesis of tissue-analog substitutes, or even a human tooth (called bio-tooth). Dental pulp stem cells represent a colony of adult cells which have the ability to auto-renovate and differentiate in different lineages. Dental pulp stem cells exact origin has yet to be fully determined; these stem cells seem to be the source of odontoblasts, which contribute to the formation of the dentin-pulp complex. Recently, achievements obtained through research conducted on stem cells, have allowed us to contemplate the possible therapeutic applications of dental pulp stem cells. Some studies have shown that dental pulp stem cells are able to produce *in vivo* dental tissues, including dental pulp and crown structures. Other research has demonstrated that these stem cells differentiate *in vivo* and *in vitro* into osteoblasts, neuroblastos, chondrocytes fibroblastos, and endothelium. In theory, a bio-tooth synthesized from autogenic dental pulp stem cells should be the best option to recover the whole structure and function of a human tooth. The aim of the present review article was to undertake a brief description of the location, origin, isolation and candidate markers of dental pulp stem cells in order to thus present application perspectives to be used in the dental clinic.

www.medigraphic.org.mx

INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular basada en células troncales dentales abre nuevas puertas que parecen ser una vía prometedora para poder regenerar no sólo órganos afectados por enfermedades sistémicas o patológicas irreversibles del complejo dentinopulpar y periapical, sino también poder regenerar la totalidad de la estructura de un diente perdido, es decir, sintetizar *in*

* Estudiante de Odontología.

§ DDS, MSc, Biólogo Oral, DEA Biología Ósea, Especialista en Bioética. Docencia Universitaria, Profesor Asociado.

Universidad El Bosque, Colombia.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam>

vitro un sustituto morfológico funcional de un diente o «biodiente».

Las células troncales de la pulpa dental (DPSCs) representan un nicho de células troncales mesenquimales, obtenidas de un tejido adulto que tiene la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples linajes en el momento que el organismo lo requiere. La autorrenovación involucra a la mitosis, la cual puede ser simétrica y asimétrica; la forma simétrica es cuando resultan de la división celular dos células troncales hijas totalmente idénticas a la progenitora con elevado potencial de diferenciación y autorrenovación, y la forma asimétrica es cuando resultan de la división celular una célula troncal idéntica a la progenitora y otra célula troncal comprometida en una línea celular con limitada capacidad de renovación y diferenciación.

Otro aspecto importante es que estas células poseen un alto potencial terapéutico cuando hay una lesión tisular en diferentes órganos humanos, tales como el sistema nervioso central, el tejido óseo, el cartílago y el hígado. Según lo reportado por Huang y cols.,¹ en el cual promueven la diferenciación y proliferación de las DPSCs en neuronas en el hipocampo de ratones y el estudio de Ikeda y cols.,² en el cual estas células previenen eficazmente la fibrosis en el hígado de las ratas inducidas por drogas, incrementando así su función hepática. Además de sus aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades sistémicas, las DPSCs han sido considerablemente exploradas con el fin de conseguir la regeneración *in vivo* del complejo dentinopulpar del tejido dental. Por lo tanto, hoy en día se consideran como una estrategia prometedora en ingeniería de tejidos dentales, debido no sólo a la ausencia de dilemas éticos al obtener el tejido de fuente de células troncales, sino esencialmente al fácil acceso quirúrgico durante la recolección de la muestra, la conservación de la viabilidad celular y la baja morbilidad después de la extracción pulpar, ya que las DPSCs pueden generar dentina más típica dentro de un corto periodo de tiempo en comparación con las células troncales no dentales, lo que hace que sean más competentes a la hora de crear *in vitro* un biodiente.

El objetivo de este artículo de revisión es hacer una breve descripción de la localización, origen, aislamiento y marcadores candidatos de células troncales de pulpa dental, para así plantear las perspectivas de futura aplicación en la clínica odontológica.

LOCALIZACIÓN Y ORIGEN DE LAS DPSCS

La pulpa dental básicamente se compone de cuatro capas: la zona odontoblástica, una zona libre de

células, una zona rica en células y la zona central. Shi y cols.^{3,4} han demostrado que la expresión de los marcadores CD146+ y STRO-1+ de estas células troncales en la pulpa dental es restringida en las paredes de los vasos sanguíneos y está ausente en los alrededores del tejido fibroso y perineuro, indicando que las DPSCs se localizan en la región perivascular de la pulpa.

Aunque se han aislado las DPSCs en los dientes temporales recién exfoliados, permanentes e, incluso, en los dientes supernumerarios, aún no se conoce claramente el origen de estas células troncales.

El análisis de microarreglos de ADN demuestra que las células troncales de la pulpa dental humana comparten un perfil de expresión génica similar a las células troncales mesenquimales de la médula ósea. La expresión de una variedad de marcadores mesenquimales comunes, implicaría entonces que las DPSCs tendrían un probable origen en la cresta neural craneal, ya que embriológicamente, al igual que la médula ósea, la mayor parte de los tejidos orales se originan de la cresta neural.⁵⁻⁷ En efecto, las DPSCs pueden ser originadas desde la cresta neural, pues comparten cierta actividad génica similar, así como comportamientos biológicos. Además de esto, se cree que después de la histodiferenciación y morfogénesis del germen dentario, la pulpa sigue varias etapas de desarrollo odontogénico mesenquimatoso en cierto orden (células troncales de la cresta neural, las células troncales ectomesenquimatosas de la papila dental, células troncales de la pulpa dental, células precursoras de la pulpa dental, los preodontoblastos y odontoblastos).⁸

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS Y REACTIVOS

Medidas de esterilización

Todos los medios deben ser esterilizados por filtración a través de un filtro de membrana de 0.22 micras y se almacenan a 4 °C.

Protocolos detallados para cultivos

Medidas de seguridad

El estado de salud de los donantes es un requisito que debe ser conocido, ya que este podría alterar la viabilidad de la muestra poniendo en riesgo el éxito del posible tratamiento. Por lo tanto, se debe tener un cuidado especial con los instrumentos y materiales empleados para evitar la transmisión de enfermedades. Además, cumplir con todos los protocolos éticos

incluyendo la firma en un consentimiento informado aprobado por un comité institucional de ética.

Medio de cultivo

Medio de células troncales mesenquimales (MSC medium)

Preparar a- medio mínimo esencial modificado (a-MEM) suplementado con glutamina 2 mM, suero fetal bovino 15% (FBS), 100 ug/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomycin. Posteriormente, se suplementa el medio con los factores específicos que inducirán la diferenciación a los linajes celulares deseados (odontogénico, adipogénico, neural y óseo).

Medio de diferenciación de odontoblastos

Añadir 0.01 mM de dexametasona fosfato sódico y fosfato monopotásico 1.8 (KH₂PO₄) en el MSC medio.

Medio de diferenciación adipogénico (adipocitos)

Añadir 0.5 mM de isobutil metilxantina, 60 mM de indometacina, hidrocortisona 0.5 mM, y 10 insulina g/mL al medio MSC.

Medio de diferenciación de neuroblastos

Preparar medio neurobasal A con suplemento B27, 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 40 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), 100 ug/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomycin.

Manipulación de los tejidos

El diente extraído debe ser sumergido en una solución estéril, solución salina normal o solución salina tampón fosfato (PBS), pH 7.4 inmediatamente después de la extracción. La adición de antibióticos de doble concentración, por ejemplo, penicilina y estreptomycin es opcional, pero aconsejable. Cuando un diente decíduo es exfoliado inesperadamente y no se puede mantener en solución estéril como se describió anteriormente, debe ser desechado por la alta probabilidad de contaminación. Luego debe ser almacenado a 4 °C para mantener la viabilidad celular. Aunque entre más rápido se efectúe la obtención de la muestra, el aislamiento de la población celular en el laboratorio, mayor será la probabilidad de obtener células troncales mesenquimales dentales.

Aislamiento del tejido pulpar

Para preservar la viabilidad celular es importante mantener el tejido de la pulpa a una temperatura baja, en una condición húmeda y bajo control de la contaminación bacteriana, incluso durante la sección del diente. El diente podría estar contaminado porque está expuesto a una gran cantidad de bacterias en la cavidad oral, aunque la pulpa dental está rodeada por tejidos duros dentales (esmalte, dentina y cemento) en la cavidad oral. Sin embargo, durante el aislamiento de células troncales de dientes deciduos exfoliados (SHED), la pulpa dental del diente temporal se expone al medio ambiente de la cavidad oral y al medio exterior. Por consiguiente, es crítico para evitar contaminación bacteriana durante el procesamiento de las muestras y el aislamiento exitoso de células troncales, desinfectar los dientes con ácido hipocloroso 250 ppm, pH 5.2 antes de la extracción del tejido pulpar dental humano.

Cultivo primario de DPSCs/SHED

Este protocolo de aislamiento se basa en la capacidad de las células troncales para adherirse a las placas de cultivo y formar colonias celular.^{9,10} Para obtener colonias derivadas de cada una de las células, lo podemos realizar de dos maneras:

- 1) Cultivo por explantes: en el cual se corta la pulpa en segmentos de 3 a 5 mm y posteriormente llevado a una caja de polipropileno, luego se coloca medio para que las células migren del tejido y realicen confluencia, es muy importante cambiar el medio cada tres días.
- 2) Realizar disgregación enzimática: la cual consiste en aplicar colagenasa-dispasa en una caja de polipropileno con la pulpa entera y posteriormente llevada a incubación durante un lapso de dos horas a una temperatura de 37 °C, seguido a esto, ayudaremos por medio de pipetas cada vez de menor diámetro en su boquilla para hacer una completa disociación mecánica.

Se recomienda que el medio se cambie un día después del aislamiento de células, lo que minimiza la incidencia de contaminación. Sin embargo, cuando el riesgo de contaminación es alto, el medio puede ser cambiado cinco horas después del aislamiento.

Expansión celular *in vitro*

Por lo general, alrededor de una semana después de que las células son aisladas, las colonias son fá-

ilmente identificables en los recipientes de cultivo. Cuando las células alcanzan aproximadamente el 80% de confluencia (por lo general después de aproximadamente dos a tres semanas), debe realizarse un pasaje celular como se describe a continuación. Cada colonia teóricamente se deriva de una sola Unidad Formadora de Colonias-Fibroblastos (CFU-F)⁹⁻¹¹ y se puede aislar mediante el uso de aros de clonación. Además, las colonias individuales pueden ser recogidas por una serie de pasajes, posterior a una dilución o por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando STRO-1 y anticuerpos CD146.¹²

La criopreservación y recuperación

Los puntos más importantes en el procedimiento son los siguientes:

Cuando las células cultivadas alcanzan un 80 a 90% de confluencia, son candidatas para ser criopreservadas. El número de células debe ser alrededor de 1-2 x 10⁶/vial que contiene 1.5 mL de medio de congelación. Demasiado baja o demasiado alta un número de células puede disminuir la tasa de recuperación.

El agente criopreservante dimetilsulfóxido (DMSO) debe añadirse gradualmente hasta un 10% a una temperatura baja, más una alta concentración de suero (90% de FBS y 10% de DMSO) debe ser utilizada para ayudar en la supervivencia celular.

Marcadores mesenquimales comunes

En el 2009 Lin H y cols., Beyer Nardi y cols. 2006, reportaron que fenotípicamente las células troncales mesenquimales expresan los siguientes marcadores: CD49a/CD29+, CD44+, STRO-1+, CD90+, CD105+, CD106+, CD146+, CD140b+, CD166+, CD34/45- y CD271+. La expresión de éstos ayuda a la clasificación acertada dentro del grupo de hMSCs (células troncales mesenquimales humanas).

CD24: el antígeno de superficie celular CD24 humano es una sialoglicoproteína que está anclado a la superficie celular por un glicosilfosfatidilinositol considerado un marcador específico para las células troncales de papila apical (CSPA).

CD90: es una proteína que pertenece a la súper familia de la inmunoglobulinas y cuyo principal ligando es el CD45¹³ y es expresada en un 10-40% en células CD34+. Está involucrada en la interacción célula-célula. Se piensa que este marcador se expresa en precursores mesenquimales tempranos que tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos. La CD90+ se puede expresar en neuronas, células de cordón

umbilical, células de médula ósea y en el estroma de células mesenquimales.

CD105: también llamado endoglina, es una glicoproteína de membrana homodimérica asociada principalmente con el endotelio vascular humano. También se encuentra en pre-eritroblastos médula ósea, los monocitos activados y los linfoblastos en la leucemia infantil. El CD105 es un componente del complejo receptor de factor de crecimiento transformante beta (TGFB) y se une TGFB1 con alta afinidad. Se expresa en monocitos activados, macrófagos activados, precursores eritroides, fibroblastos, células foliculares dendríticas, melanocitos, células cardíacas, células vasculares de músculo liso y células endoteliales.¹⁴

STRO-1: es un marcador que se expresa en el desarrollo temprano de las células troncales mesenquimales, declinando su expresión cuando los genes asociados a la diferenciación y expansión osteogénica como el Factor de Unión Core A1 (CBFA1) interactúa con osteopontina y osteocalcina. Esta molécula identifica precursores estromales de médula ósea y se expresa en células de tejido deciduo (el componente materno de la interface materno-fetal compuesta predominantemente por células tipo estromales como células glandulares y leucocitos), además de placenta, tejido adiposo y pulpa dental. El STRO-1 se identificó como un antígeno específico para células troncales mesenquimales aisladas de la médula ósea.¹⁵

CD146: glicoproteína de superficie celular MUC18, un miembro de la súper familia de las inmunoglobulinas es homóloga a varias moléculas de adhesión celular y está asociada con la progresión tumoral y el desarrollo de la metástasis en el melanoma maligno humano. Está expresado en varias líneas de células endoteliales como el estroma de la médula ósea y algunos subtipos de linfocitos T.

CD34: es un antígeno de células precursoras del sistema hematopoyético. Es una proteína transmembranal, inicialmente detectada en las células del sistema linfohematopoyético, precursoras de la serie mielóide y presentes en la médula ósea. Este antígeno se observa también en el endotelio vascular en las células dendríticas de la dermis superior, en el endoneuro y en diversos tumores de partes blandas. Al igual que el marcador CD34, éste no es expresado por las hMSCs, pero son utilizados para su caracterización inmunofenotípica.

CD44: es una glicoproteína de membrana celular. El CD44 es un marcador de muchos tipos de células troncales cancerígenas, también es expresado en las células mesodérmicas, hepatocitos y fibroblastos.

CD271: receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR), también se conoce como p75 debido a

su masa molecular. Puede ser encontrado en el sistema nervioso central y periférico, en las células de Schwann y en la médula ósea.

REGENERACIÓN DEL COMPLEJO DENTINOPULPAR POR DPSCS

Muchos estudios han demostrado que las DPSCs juegan un papel primordial en la regeneración de los tejidos dentinopulpares.¹⁶⁻²² Gronthos y cols. han re combinado DPSCs humanos con hidroxapatita-fosfato tricálcico (HA-TCP), y los trasplantaron por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes. Los tejidos recuperados en este estudio contienen las estructuras típicas de la dentina rodeadas por las células como el odontoblasto, con largos procesos citoplásmicos en la matriz mineralizada. Algunas pulpas dentales, al igual que las estructuras que contienen los vasos sanguíneos, se pueden observar alrededor de la matriz de la dentina.^{16,19-21} Formaciones similares de dentina pueden ser detectada *in vivo* en SHEDs re combinados con HA-TCP. Por otra parte, las DPSCs son capaces de generar un bosquejo de complejo dentinopulpar y de dentina reparativa sobre una matriz.^{22,23}

BIODIENTE A PARTIR DE DPSCs

La ingeniería tisular basada en las células troncales de pulpa dental se considera como un enfoque prometedor para la regeneración dental, con el objetivo final de reemplazar los dientes perdidos a través de un sustituto análogo de diente humano denominado biodiente. Las células troncales de pulpa dental (DPSCs) representan un nicho de células troncales mesenquimales obtenidas de un tejido adulto que tiene la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en diferentes linajes.

El origen exacto de las DPSCs no ha sido completamente determinado y estas células troncales parecen ser la fuente de los odontoblastos que contribuyen a la formación de complejo dentinopulpar. Recientemente, los logros obtenidos a partir de la investigación de las células troncales han permitido contemplar las posibles aplicaciones terapéuticas de las DPSCs. Algunos estudios han demostrado que las DPSCs son capaces de producir tejidos dentales *in vivo*, incluyendo la dentina, pulpa y las estructuras de la corona. Mientras que otras investigaciones han demostrado que estas células troncales puede dar lugar a la formación de tejidos como los huesos. En teoría, un biodiente a partir de la DPSCs autógenos debe ser la mejor opción para recuperar la totalidad de la estructura y función de un diente humano.

La pérdida de dientes es una enfermedad común y ocurre con frecuencia en las poblaciones, afectando negativamente la eficiencia masticatoria, la función del lenguaje, la estética facial y la autoestima del paciente. Los enfoques terapéuticos actuales se centran principalmente en la rehabilitación protésica convencional o implantosoportada que inevitablemente pueden no cumplir las expectativas funcionales y estéticas del paciente.

El biodiente se diseña como un antólogo sustituto de diente humano que puede volver a integrarse en la mandíbula y realizar las funciones normales de un diente natural, incluyendo la capacidad de regeneración en caso de una lesión. Varios estudios han demostrado que un biodiente podría ser reconstruido a partir de células troncales dentales sobre una matriz.^{18,20,24} Nakao y cols. demostraron a través de bioingeniería, que los gérmenes de los dientes incisivos pueden ser reconstituidos completamente utilizando las células epiteliales y mesenquimales dentales en un gel de colágeno de tres dimensiones.²⁵ Estos gérmenes dentarios pueden replicar la organogénesis embrionaria dental. Además, Ikeda et al.²⁶ han demostrado que estos biodientes en el hueso alveolar pueden desempeñar las funciones de un diente natural, incluyendo la erupción, la oclusión y la masticación, lo que pone en manifiesto una perspectiva nueva y emocionante de los biodientes en futuras aplicaciones clínicas.

Otros estudios indican que la proporción de las células epiteliales y mesenquimales es mucho más importante en la regulación de la morfogénesis normal de la corona.^{18,27,28} Sin embargo, como se ha observado, ninguna estructura de la raíz se ha formado durante la regeneración basada en las DPSCs, debido al complejo mecanismo en el desarrollo de raíces. Recientemente, muchos tipos de células incluyendo las DPSCs (células troncales de pulpa dental), las SHEDs (células troncales de dientes deciduos en exfoliación) y las SCAPs (células troncales de papila apical) han sido exitosamente reprogramadas en células pluripotenciales inducidas (iPS) que son una gran promesa para la medicina regenerativa.^{29,30}

Por último, el mayor reto de la bioingeniería es la formación del germen del biodiente y que pueda ser trasplantado en los maxilares del paciente para el crecimiento continuo y erupción oportuna.

PERSPECTIVAS DE LA APLICACIÓN DE LAS DPSCs EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Durante años la odontología se ha preocupado por restaurar los dientes de manera tradicional o convencional donde se restaura el diente con materiales sintéticos, también vemos como a través del tiempo se

empezó a hablar de la generación de un «biodiente» a partir de células troncales extraídas de terceros molares del paciente. La investigación en este campo ha avanzado de tal manera que ya varios de los obstáculos que se tenían hace unos años para poder obtener este biodiente han sido resueltos. Sin embargo, hay obstáculos técnicos que superar. La generación de un diente a partir de DPSCs será, por necesidad, una oportunidad impredecible para el tratamiento de la pérdida de dientes y otras enfermedades dentales. Las DPSCs como células pluripotenciales tienen un papel fundamental en la regeneración de diferentes tejidos humanos, sin embargo, el principal compromiso de estas células dentales se encuentra en el área de la regeneración del diente, donde se puede encontrar una aplicación inmediata en las prácticas odontológicas. Las células troncales de pulpa dental se pueden utilizar *in situ* para diferentes tipos de tratamientos autólogos. Las estrategias futuras, sin duda, se concentran en el mecanismo de diferenciación *ex vivo* e *in situ* de estas células troncales dentales, la optimización de las matrices y la exploración del microambiente odontogénico necesario para la diferenciación de odontoblastos.

Es evidente que en los últimos años de estudio de las células troncales dentales, éstas han proporcionado una base importante sobre la cual podríamos comenzar a explorar su potencial terapéutico en el ámbito clínico. Sin embargo, sintetizar un biodiente con función masticatoria, neurovascular sensorial y tejidos de sostén, a partir de las células troncales dentales puede ser mucho más complejo de lo esperado.

La parte más desafiante de la ingeniería de tejidos es tal vez la regeneración vascular, nerviosa así como la regeneración funcional. Varias cuestiones involucran la elaboración de un biodiente, incluyendo:

- **La identificación y el «estado primordial indiferenciado» de las células troncales:** comprender los mecanismos de auto-renovación nos permitirá regular el crecimiento de células troncales adultas *in vitro* para generar un número suficiente de células necesarias para diferentes aplicaciones. Una alternativa son las células troncales embrionarias (CME) a través de las tecnologías de transferencia nuclear. Sin embargo, este proceso implica el uso de óvulos donados fertilizados y embriones desechados. Otro enfoque es la manipulación *in vitro* de células troncales para permitir el mantenimiento de su estado primordial indiferenciado conocido como «troncalidad». Los recientes métodos experimentales para reprogramación de células somáticas se efectúan mediante la introducción de factores inductores que
- arrojan la posibilidad de manipular las células troncales en células pluripotentes para una amplia variedad de aplicaciones.³¹⁻³³
- **La morfogénesis dental y determinación del tipo de diente.**
- **El crecimiento controlable del biodiente y la erupción:** el control y la prevención de expansión anormal debe ser bajo vigilancia y la observación cuidadosa de esta posibilidad son de suma importancia. Ya que la evidencia ha demostrado que las MSCs pierden la estabilidad genética en el tiempo y son propensas a la formación de tumores.³⁴
- **La revascularización:** la vascularización puede ser difícil para los dientes que tengan la entrada del canal apical de los vasos sanguíneos pequeña (< 1 mm). El tamaño del orificio apical afectaría el crecimiento interno de los vasos sanguíneos en el tejido de la pulpa procesado. Cuanto mayor sea la abertura, es más probable que la angiogénesis pueda ocurrir. Por lo tanto, los dientes inmaduros con ápices abiertos son los mejores candidatos para la regeneración del tejido pulpar. Se consideró que el uso de factores inductores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y/o derivado de factor de crecimiento plaquetario (PDGF) debe mejorar y acelerar la angiogénesis pulpar. Además, se cuenta con la posibilidad de fabricar matrices sintéticas impregnadas con estos factores de crecimiento.^{35,36}
- **Regeneración neuronal:** con respecto a la inervación, es probable que la pulpa regenerada contenga fibras nerviosas de los tejidos adyacentes. Las DPSCs han demostrado ser capaces, ya sea de producir factores neurotróficos o poseer potencial de diferenciación neuronal.³⁷ Sin embargo, el desarrollo de técnicas *in vitro* o *in vivo* para que el complejo dentino-pulpar esté inervado es un tema no muy sencillo. La razón por la cual la dentina es tan sensible a diversas irritaciones son las actividades hidrodinámicas de los túbulos dentinarios, en asociación con las fibras sensoriales A-delta que se extienden en los túbulos dentinarios en la capa de la predentina. Dado que la dentina recién generada no parece tener bien organizados los túbulos dentinarios, las fibras regeneradas A-delta que alcanzan la unión pulpodental, no provocarían la sensibilidad normal de la dentina como en los dientes naturales.
- **Capacidad para generar nuevos odontoblastos que recubran la superficie de la dentina existente y producir nueva dentina:** la comprensión de la regulación de las células troncales durante la diferenciación y la producción de tejido específico

requieren la producción de materiales especializados extracelulares, tales como hueso, dentina, los cartílagos y los tendones. La producción de la matriz extracelular y su maduración en tejidos especializados implican una activación secuencial de cascadas de señalización. El control y la disponibilidad para estas señales artificialmente en una etapa particular pueden facilitar la regeneración del tejido deseado.³⁸ También debe tenerse en cuenta que mientras mejor sea el suministro sanguíneo se puede lograr que la densidad celular sea óptima y así se debe producir matriz extracelular de buena calidad. Huang G y cols. demostraron que nuevas células, como los odontoblastos formados en la pared de dentina existente que ha sido desinfectada químicamente.³⁹ Otro problema en la regeneración funcional de la pulpa/dentina es la regeneración de esmalte. Intacta la dentina es necesaria la superposición del esmalte para reparar el diente dañado. El esmalte no se puede autorregenerar, sin embargo, la regeneración del esmalte ha sido probada por varios métodos que utilizan proteínas del esmalte como la amelogenina, o el uso de productos químicos, como la hidroxiapatita.^{40,41} Sin embargo, estos enfoques parecen ser difíciles de aplicar clínicamente o sólo puede producir cantidad mínima de esmalte regenerada en el esmalte natural existente. Así, el reto final de la restauración biológica de dientes después de la regeneración de la pulpa y la dentina es el esmalte, aunque es probable que requieran todavía el uso de materiales artificiales.

- **Rechazo de injerto del huésped:** la comprensión de las interacciones entre las células troncales y el sistema inmunológico es importante para el uso de las células en la clínica. Las DPSCs no son inmunógenas y además modulan la respuesta inmune durante el injerto o trasplante celular. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para determinar si las DPSC salogénicas pueden presentar un rechazo del injerto a corto y largo plazo.

Como se mencionó, la disponibilidad de fuente de células para la regeneración de tejidos a base de células es un problema. Un banco de dientes y de células troncales es la infraestructura esencial a establecer con el fin de desarrollar terapias basadas en células troncales de pulpa dental, ya sea para aplicaciones autólogas o alogénicas. En última instancia, la escasez de las células troncales postnatales podría resolverse mediante la generación de células pluripotentes inducidas (iPS) a partir de células somáticas o de células troncales dentales.

REFERENCIAS

1. Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Troncales Cells*. 2008; 26: 2654-2663.
2. Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Ohshima A, Sobajima S et al. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*. 2008; 76: 495-505.
3. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2003; 18: 696-704.
4. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001; 29: 532-539.
5. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch D et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000; 127: 1671-1679.
6. Clouthier DE, Williams SC, Yanagisawa H, Wieduwilt M, Richardson JA, Yanagisawa M. Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. *Developmental Biology*. 2000; 217: 10-24.
7. Zhang J, Duan X, Zhang H, Deng Z, Zhou Z, Wen N et al. Isolation of neural crest-derived stem cells from rat embryonic mandibular processes. *Biology of the Cell*. 2006; 98: 567-575.
8. Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Rev*. 2011; 7: (1) 161-171.
9. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976; 47: 327-359.
10. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393-403.
11. Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Haematol. Blood Transfus*. 1980; 25: 19-29.
12. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. *In vitro* characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006; 324: 225-236.
13. Wiesmann A, Buhning HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med*. 2006; 31: 2-8.
14. Duff S, Li C, Garland J, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *The FASEB Journal*. 2003; 17 (9): 982-992.
15. Gonçalves R, da Silva C, Cabra J, Zanjani E, Almeida-Porada G. STRO-1+ human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture sytroncales. *Exp Hematol*. 2006; 34: 1353-1359.
16. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (25): 13625-13630.
17. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 (10): 5807-5812.
18. Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J et al. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biology of the Cell*. 2007; 99: 465-474.
19. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002; 81: 531-535.
20. Yu JH, Deng ZH, Shi JN, Zhai HH, Nie X, Zhuang H et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Engineering*. 2006; 12: 3097-3105.

21. Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, Akamine A. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). *Gene Therapy*. 2002; 9: 814-818.
22. El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. 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 Endodontic Journal*. 2008; 34: 52-67.
23. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2013; 82 (12): 976-981.
24. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yellick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res*. 2004; 83: 523-528.
25. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nature Methods*. 2007; 4: 227-230.
26. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 13475-13480.
27. Yu JH, Jin F, Deng ZH, Li YF, Tang L, Shi JN et al. Epithelial-mesenchymal cell ratios can determine the crown morphogenesis of dental pulp stem cells. *Stem Cells and Development*. 2008; 17: 475-482.
28. Yu J, Shi J, Jin Y. Current approaches and challenges in making a bio-tooth. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008; 14: 307-319.
29. Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells and Development*. 2010; 19: 469-480.
30. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007; 448: 313-317.
31. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-872.
32. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Franke JL, Tian S et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318: 1917-1920.
33. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T et al. Generation of induced pluripotent stem cells without myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008; 26: 101-106.
34. Rubio D, García-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005; 65 (8): 3035-3039.
35. Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M, Noguchi T, Kanatani I, Ogawa O et al. Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors. *Biomaterials*. 2004; 25: 4513-4520. [PubMed: 15046942]
36. Stiver SI, Tan X, Brown LF, Hedley-Whyte ET, Dvorak HF. VEGF-A angiogenesis induces a stable neovasculature in adult murine brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004; 63: 841-55. [PubMed: 15330339]
37. Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons *in vitro*; implications for tissue engineering and repair in the nervous system stem cells. *Eur J Neurosci*. 2004; 19: 2388-2398. [PubMed: 15128393]
38. Kolf C, Cho E, Tuan R. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9: 204.
39. Huang GTJ, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model. *Tissue Engineering Part A*. 2010; 16: 605-615. [PubMed: 19737072]
40. Fan Y, Sun Z, Wang R, Abbott C, Moradian-Oldak J. Enamel inspired nanocomposite fabrication through amelogenin supramolecular assembly. *Biomaterials*. 2007; 28: 3034-3042. [PubMed: 17382381]
41. Yin Y, Yun S, Fang J, Chen H. Chemical regeneration of human tooth enamel under nearphysiological conditions. *Chem Commun (Camb)*. 2009; (39): 5892-5894. [PubMed: 19787132]

Dirección para correspondencia:
Juan Carlos Munévar Niño
E-mail: munevarjuan@unbosque.edu.co