



Dr. Miguel Ángel Iglesia Puig

Doctor en Odontología.
Ejercicio Privado, Zaragoza.
Director científico de Criodental Biopharma.

CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN EN APLICACIONES EXTRAORALES PARA MEDICINA REGENERATIVA (...Y DOS)

RESUMEN

El presente artículo revisa el estado actual de la investigación con células madre de pulpa dental (DPSC) en aplicaciones extraorales para medicina regenerativa. Desde su identificación en el año 2000, estas células madre mesenquimales adultas han destacado por sus interesantes propiedades, como son la capacidad de diferenciación y de proliferación, que les confieren un gran potencial en medicina regenerativa. En la primera parte se revisaron las investigaciones con DPSC para regeneración neuronal y neural, regeneración cardíaca, diabetes y regeneración de glándulas salivares. En esta segunda parte se revisan las investigaciones con DPSC para reconstrucción de córnea, tratamiento de distrofias musculares, regeneración ósea, angiogénesis y tratamiento de trastornos autoinmunes.

Palabras clave: Célula madre de pulpa dental, aplicaciones terapéuticas extraorales, medicina regenerativa, reconstrucción de córnea, distrofias musculares, regeneración ósea, angiogénesis, enfermedades autoinmunes.

INTRODUCCIÓN

En la primera parte de esta revisión se analizaron los estudios más recientes en aplicaciones extraorales con células madre de pulpa dental (DPSC). Estas células madre mesenquimales adultas tienen una gran capacidad de diferenciación y de proliferación, lo que, unido al hecho de que soportan los procesos de criopreservación, las convierten en posibles candidatas como fuente celular para terapias celulares futuras.

En la primera parte se revisaron investigaciones en mo-

delo animal con DPSC para regeneración neuronal y neural, regeneración cardíaca, diabetes y regeneración de glándulas salivares. En esta segunda parte de la revisión se detallan investigaciones acerca de otras aplicaciones extraorales con DPSC, tales como la reconstrucción de córnea, el tratamiento de distrofias musculares, la regeneración ósea, la angiogénesis y el tratamiento de trastornos autoinmunes.

RECONSTRUCCIÓN CÓRNEA

Existen varios grupos de investigación realizando con éxito en animales reconstrucción de córnea, ya que las DPSC comparten características con las células límbicas del epitelio corneal (1). Pereira y cols. (2) evaluaron en conejos el tratamiento del déficit total de células madre del limbo con una matriz celular generada *in vitro* compuesta por DPSC humanas inmaduras. A los 3 meses evidenciaron una mejora en la transparencia corneal de los casos tratados con DPSC frente a una total conjuntivalización y opacificación de las córneas de los controles, con menor vascularización. Estos datos clínicos fueron confirmados mediante estudio histológico en el que se observó un epitelio corneal sano uniforme en los casos tratados con DPSC. También en estos casos se detectó la presencia de anticuerpos antiDPSC e inmunotinción con anticuerpos anti-humanos. En las córneas de control no se encontraron ninguno de estos antígenos. Todos estos datos muestran que el trasplante de matrices con DPSC obtenidas por ingeniería tisular es capaz de reconstruir el epitelio corneal en modelo animal, proporcionando, según opinión de los autores, una alternativa válida en este campo de la oftalmología con implicaciones clínicas importantes.

DISTROFIAS MUSCULARES

Otra área de investigación con DPSC es su aplicación terapéutica en casos de distrofias musculares. Así, por ejemplo, la Dra. Kerkis y su equipo (3) han investigado su utilización en casos de distrofia muscular progresiva en modelo animal. A estos perros se les administró por vía intravenosa 60.000.000 de DPSC criopreservadas, observando en las sucesivas evaluaciones una ausencia de rechazo inmune, a la vez que una integración de las DPSC en los músculos de los animales tratados. También se observó una disminución en la progresión del proceso distrófico frente a los controles, a la vez que una mejoría en la situación clínica en relación a la movilidad, el tono postural, poder estar de pie y saltar barreras. Según los autores, estos hallazgos abren importantes vías para futuras investigaciones con DPSC en distrofias musculares.

REGENERACIÓN ÓSEA

Las DPSC pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo, habiéndose observado que hasta 80 pases de placa no hay signos de senectud (4,5). Ya en 2007 el equipo del Dr. D'Aquino demostró que las DPSC, tras múltiples pases, siguen mostrando plasticidad y capacidad de formación de nódulos que, a su vez, pueden formar chips de hueso *in vitro* (figura 1) (6). Estos autores denominan este tejido óseo LAB (Living Autologous Bone) y observan que se remodela hueso lamelar al trasplantarlo en ratas (4,5), debido a la co-diferenciación de las DPSC en osteoblastos y

endotelioцитos (figura 2) (6). De esta manera se consigue *in vivo* una integración completa de los vasos sanguíneos dentro de los chips de hueso, lo que lleva a la formación de tejido óseo vascularizado (7). Este tejido óseo se llegó a convertir en hueso adulto, manteniendo además las dimensiones originales ya que no se reabsorbe durante este proceso (8).

También, en relación con la regeneración ósea con DPSC, cabe destacar el estudio del mismo grupo italiano (9) en el que emplearon DPSC, junto a una matriz de esponja de colágeno para regeneración ósea en humanos. La investigación se realizó en pacientes con reabsorción de la cresta alveolar distal al segundo

molar inferior debido a la impactación del tercer molar, lo que generaba un defecto sin paredes de, al menos 1,5 cm de altura, que no permitía la reparación ósea espontánea tras la exodoncia del tercer molar. Se extrajeron los terceros molares superiores y se aislaron y cultivaron sus DPSC. Se rellenaron en el mismo acto quirúrgico los defectos óseos post-extracción de los terceros molares inferiores con matrices de esponja de colágeno impregnadas en unas 50.000 DPSC en un lado, y esponjas de colágeno sin DPSC en el lado de control. A los 3 meses el lado tratado con el injerto autólogo de DPSC y colágeno mostró reparación vertical óptima (6,2 mm. frente a 4,4 mm). Las observaciones histológicas a los 3 meses mostraron claramente una regeneración ósea completa en la zona tratada con DPSC, con un hueso bien organizado, bien vascularizado y con una estructura lamelar ro-

«EN ESTA SEGUNDA PARTE DE LA REVISIÓN SE DETALLAN INVESTIGACIONES ACERCA DE OTRAS APLICACIONES EXTRAORALES CON DPSC, TALES COMO RECONSTRUCCIÓN DE CÓRNEA, EL TRATAMIENTO DE DISTROFIAS MUSCULARES, LA REGENERACIÓN ÓSEA, LA ANGIOGÉNESIS Y EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS AUTOINMUNES»



Figura 1. Nódulos de Living autologous bone (LAB). (A) Nódulo calcificado dentro de DPSC cultivadas durante 40 días. Magnificación original x100. (B) Chip de Living autologous bone (LAB) obtenido tras 60 días de cultivo de las DPSC. Reproducido con permiso de d'Aquino (6).

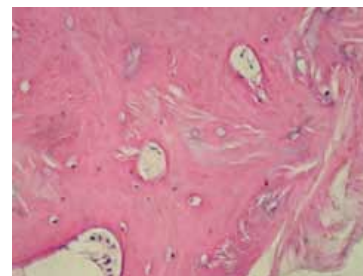


Figura 2. Resultados del trasplante *in vivo*. Muestra de hueso obtenida. Tinción con hematoxilina-eosina. Magnificación original x100. Reproducido con permiso de d'Aquino (6).

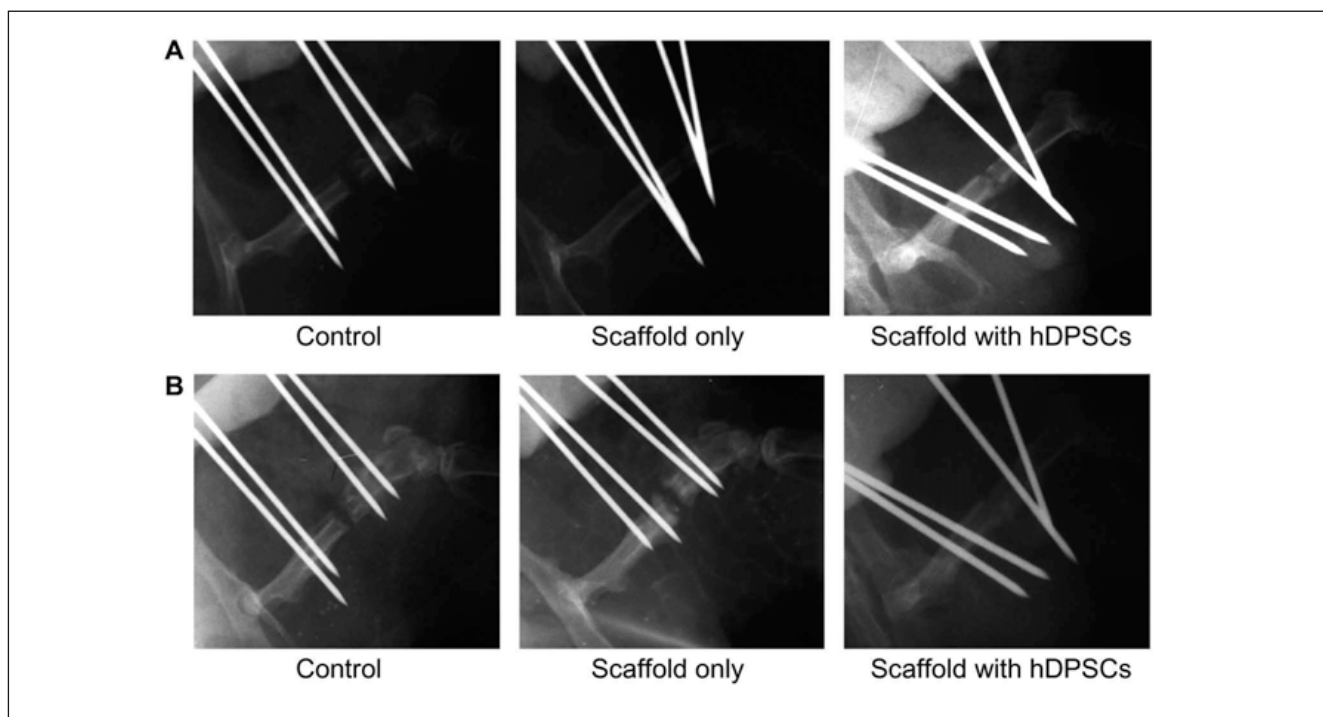


Figura 3. Radiografías representativas de fémur de rata a los 28 y 56 días tras la cirugía, comparando el grupo de control, el grupo tratado con matriz de colágeno, y el grupo tratado con matriz de colágeno+DPSC. (A) A los 28 días después de la cirugía, no había callos de unión en el primer y segundo grupo, mientras que el grupo tratado con DPSC mostraba una unión incompleta. (B) A los 56 días tras la cirugía, los dos primeros grupos no mostraban zonas de unión, y únicamente el grupo tratado con DPSC mostraba unión ósea de los fragmentos. Reproducido con permiso de Kawai (11).

deada de canales haversianos frente a un hueso inmaduro, incompleto y con evidencias de reabsorción ósea en el lado de control. Este estudio es el primero en mostrar la regeneración ósea completa en humanos de defectos mandibulares mediante un biocomplejo de DPSC y matriz de colágeno.

Recientemente se ha publicado la estabilidad y calidad a los tres años del hueso mandibular regenerado con DPSC y esponjas de colágeno en este mismo grupo de pacientes (10). Para ello los autores utilizan procedimientos de evaluación convencionales como el análisis histológico, así como técnicas diagnósticas como la holotomografía y la radiación sincrotrónica, que es más sensible con las estructuras de baja absorción de radiación. En la histología encuentran que a los tres años el hueso regenerado en pacientes tratados con DPSC está bien estructurado y bien vascularizado. En el diagnóstico por imagen, los autores encuentran que el hueso regenerado con DPSC estaba compuesto de hueso compacto con buena vascularización, con mayor densidad en su matriz que los casos de control, en los que en el mismo paciente encontraba hueso alveolar esponjoso. Por lo tanto, el hueso regenerado con DPSC que encuentran es muy compacto, y completamente diferente del hueso alveolar normal, ya que posee una gran estructura lamelar y ausencia de estructura medular. Según los autores, aunque este hueso regenerado no sea de la calidad habitual de la mandíbula, podría ser muy útil en algunas situaciones clínicas,

ya que al ser más compacto, podría incrementar la estabilidad de los implantes dentales, a la vez que mejorar la resistencia a agentes mecánicos, físicos, químicos y farmacológicos (como, por ejemplo, los bifosfonatos). Como ejemplo, en pacientes a avanzada edad, con mayor reabsorción ósea, la presencia de hueso compacto otorgaría más estabilidad en esas zonas y podría conseguir unas condiciones locales más favorables al tratamiento con implantes.

También Kawai y cols. (11) obtienen buenos resultados investigando la capacidad osteogénica de las DPSC. Implantan DPSC con una matriz de colágeno en fracturas de fémur de ratas, comparando los resultados con un grupo de control en el que colocaban sólo una esponja de colágeno y con otro grupo en el que dejaban cicatrizar la fractura por sí misma. En el análisis histológico encontraron en los casos tratados con DPSC y esponja de colágeno un incremento significativo en el número y tamaño de los osteoblastos, así como en las tasas de producción osteoide y de mineralización, mientras que la tasa de reabsorción ósea disminuyó. El trasplante de DPSC en estos animales consiguió promover la osteogénesis y la cicatrización de la fractura de forma significativa (**figura 3**). Los autores concluyen afirmando que el trasplante de DPSC es un procedimiento sencillo y seguro que puede ser beneficioso en terapias de regeneración ósea en la práctica clínica. Existen múltiples investigaciones que estudian la regeneración ósea conseguida con

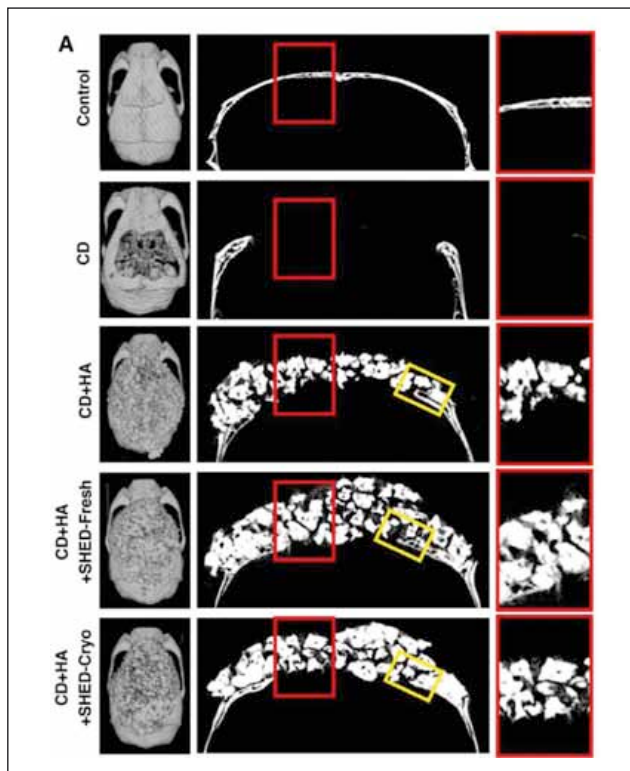


Figura 4. Las SHED frescas (SHED-Fresh) y criopreservadas (SHED-Cryo) son capaces de reparar defectos críticos de calota craneal en ratones inmunocomprometidos, con diferencias estadísticamente significativas frente a otros grupos. Imágenes de micro-CT de las calotas de los ratones. Imágenes craneales en la columna izquierda, sagitales en la columna del medio e imágenes de la zona recuadrada en rojo en la columna derecha. Control: grupo control (sin defecto). CD: grupo con defecto craneal. CD+HA: grupo implantado con HA/TCP. CD+HA+SHED-Fresh: grupo implantado con HA/TCP y SHED frescas. CD+HA+SHED-Cryo: grupo implantado con HA/TCP y SHED criopreservadas durante 2 años. Reproducido con permiso de Ma (12.).

DPSC en modelo animal, destacando entre ellas la de Ma y cols. (12) por estudiar esta capacidad con DPSC criopreservadas durante 2 años. Realizan el estudio con células madre de pulpa dental de dientes temporales (SHED), dividiendo las células obtenidas de cada diente en dos partes iguales, y procediendo a realizar las pruebas de regeneración ósea en calota craneal de ratones con SHED frescas y la misma prueba con SHED criopreservadas durante 2 años. Ambos grupos de SHED (tanto frescas como criopreservadas), mezcladas con hidroxiapatita, consiguieron regenerar los defectos craneales con resultados similares y claramente superiores a los controles o a los grupos en los que se empleó únicamente una matriz (figura 4).

ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es un proceso clave en ingeniería tisular, ya que para conseguir buenos resultados en este ámbito

hace falta aporte de oxígeno y de nutrientes a las células implantadas o trasplantadas. Si no existe una rápida formación vascular hacia el tejido trasplantado, éste se necrosará (13). Así pues, además de conocer acerca de su capacidad de diferenciación, auto-renovación y proliferación, es muy importante saber si las DPSC poseen la capacidad de inducir angiogénesis, para saber si son buenas candidatas para usarlas en ingeniería tisular.

Hasta ahora se conocía poco sobre la capacidad angiogénica de las DPSC, si bien estudios recientes evalúan este aspecto y los mecanismos por los que las DPSC son capaces de crear nuevos vasos sanguíneos. Entre ellos, destaca la investigación de Bronckaers y cols. (14) en la que se estudió esta capacidad angiogénica de las DPSC.

En sus resultados evidenciaron que las DPSC eran capaces de producir factores proangiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y la endostatina. Hallaron que las DPSC no tenían influencia en la proliferación de las células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1), pero eran capaces de inducir la migración *in vitro* de estas HMEC-1. Sin embargo, sí que eran capaces de estimular la migración celular *in vitro*, activando las vías PI3K/AKT y MEK/ERK de las células endoteliales.

Los autores también realizaron el ensayo en membranas corioalantoideas de pollo (CAM), en que se mostró *in vivo* que las DPSC son capaces de inducir la formación de vasos sanguíneos de modo significativo, siendo la secreción de las moléculas angiogénicas, anteriormente mencionadas, la responsable de esta inducción (figura 5). Aunque antes de cualquier posible aplicación terapéutica se deben realizar más investigaciones, los resultados de este estudio indican que estas células madre tienen un gran potencial clínico, no sólo para su uso en ingeniería tisular, sino también para el tratamiento de patologías relacionadas con una angiogénesis inadecuada, como las heridas crónicas, accidentes cerebrovasculares e infartos de miocardio (14).

También las células madre de pulpa dental de dientes de leche (SHED) pueden llegar a tener una aplicación en ayudar y potenciar la cicatrización de las heridas. Nishino y cols. (15) han demostrado que esta mejoría en la cicatrización de las heridas la consiguen promoviendo la re-epitelización y mejorando la relación con la matriz extracelular. Según los autores, los dientes de leche, considerados residuos quirúrgicos, podrían ser un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de heridas y una nueva fuente celular para cicatrización de heridas.

Otros autores evalúan el trasplante de DPSC en modelo animal, en ratones con isquemia de las extremidades posteriores, observando que en los casos tratados con DPSC encontraban un mayor flujo sanguíneo y una mayor densidad capilar comparadas con las de animales tratados con células madre de médula ósea y tejido adiposo (16).

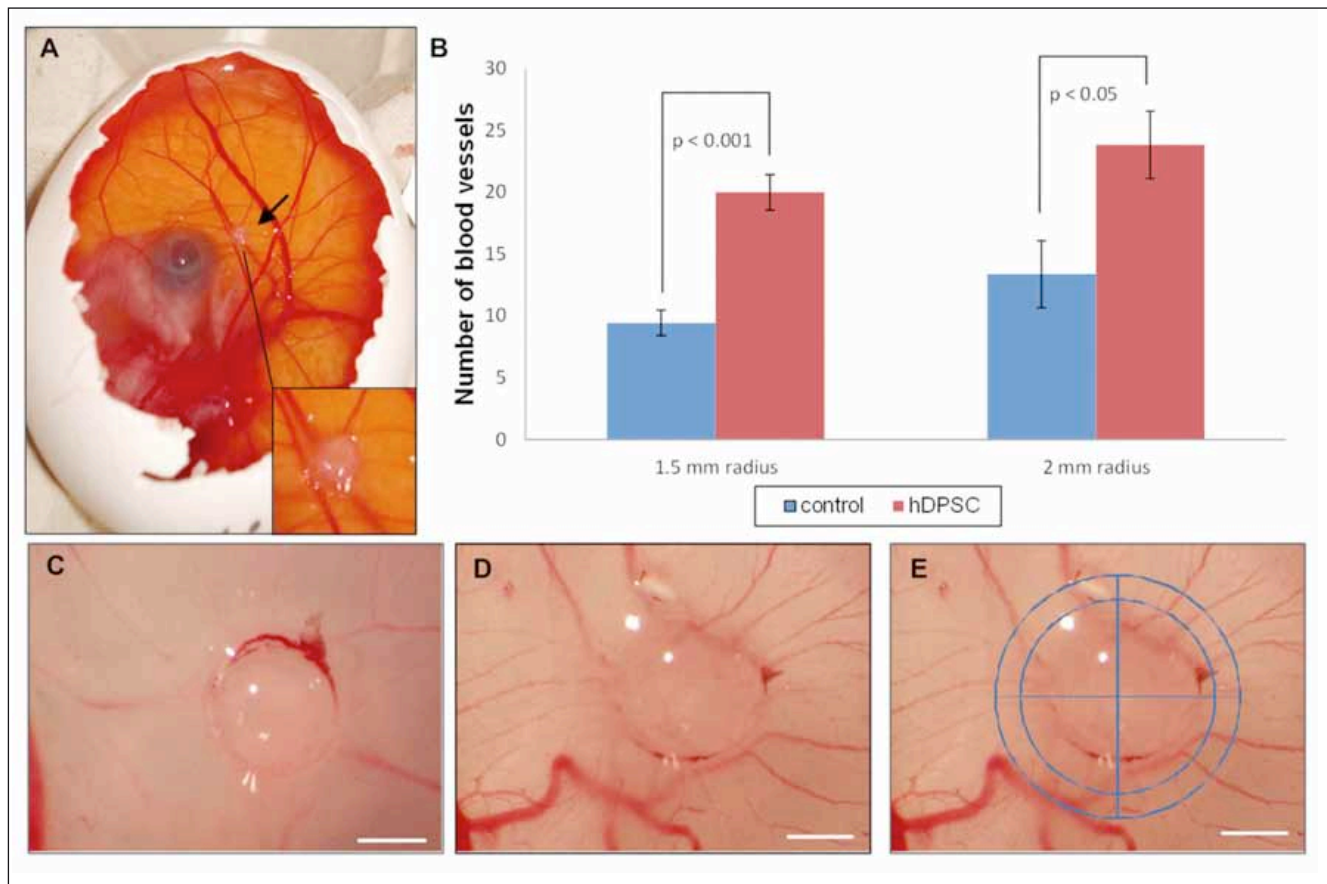


Figura 5. Ensayo en membranas corioalantoideas de pollo (CAM). (A) En el noveno día de desarrollo embrionario se colocaron gotitas de matrigel con o sin 50.000 DPSC en la CAM de un embrión de pollo (flecha negra). A las 72 horas se tomaron imágenes. (C) Gotita de matrigel empleada como control. (D) Gotita de matrigel con 50.000 DPSC. Las barras de escala blancas representan 1 mm. (E) Para evaluar la angiogénesis, se colocaron digitalmente alrededor de las gotas de matrigel dos círculos con un radio de 1,5 y 2 mm. Se contaron (doble ciego) los vasos sanguíneos que cruzaban estos círculos. (B) Las DPSC incrementaron significativamente el número de capilares que cruzaban los dos círculos. El ensayo se repitió 4 veces con DPSC de 4 donantes diferentes para obtener una base de datos de al menos 27 huevos individuales. Reproducido con permiso de Bronckaers (14).

ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Se han investigado las células madre de médula ósea para tratar enfermedades autoinmunes tales como la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) (17), para mejorar el síndrome de injerto tras trasplante de progenitores hematopoyéticos (18), y el lupus eritematoso sistémico (LES) (19). También más recientemente se ha encontrado que células madre mesenquimales derivadas de otros tejidos poseen funciones inmunomoduladoras (20, 21), lo que supone una oportunidad de encontrar una fuente de células madre más eficaz y viable para terapias celulares.

Yamaza y cols. (22) estudian esta capacidad de regulación de la respuesta inmune de las células madre obtenidas de la pulpa dental de dientes de leche (SHED). Realizan pruebas *in vitro* de análisis de células madre, incluyendo citometría de flujo, diferenciación inductiva, actividad de la telomerasa, y análisis Western Blot para evaluar la diferenciación multipotente de estas SHED. Asimismo, comprueban *in vivo* en modelo animal la capacidad de regeneración tisular

de SHED implantadas y emplean el trasplante de estas células para tratar el lupus eritematoso sistémico (LES) inducido en ratones.

En sus resultados encuentran que las SHED poseen capacidad de diferenciación similar a otras células madre mesenquimales. En relación a sus propiedades inmunomoduladoras, en comparación con las de médula ósea, encontraron que las SHED mostraban *in vitro* efectos superiores sobre la inhibición de las células colaboradoras Th17, así como una mejor regulación en el ratio entre las células reguladoras Treg y las colaboradoras Th17. Este índice es importante ya que indica la función inmunomoduladora de las SHED, las células Treg previenen la autoinmunidad y las células Th17 promueven la autoinmunidad y la inflamación (23). En cuanto a la capacidad de regulación inmunitaria evidencian que las SHED son capaces de revertir de forma eficaz *in vivo* las alteraciones asociadas al LES en ratones.

Este estudio aporta las primeras evidencias de que las SHED poseen propiedades inmunitarias similares, o incluso

mejores, a las observadas en las células madre de médula ósea. Según estos autores, las SHED son una fuente tisular de células madre para una potencial aplicación clínica en el tratamiento de trastornos del sistema inmune, gracias a su alta tasa de proliferación y a sus buenas propiedades inmunomodulatorias.

CONCLUSIONES

En esta segunda parte se han revisado los resultados de las investigaciones *in vivo* en modelo animal con DPSC en diferentes aplicaciones extraorales, en los que es constante la obtención de buenos resultados en los casos trasplantados con DPSC frente a los controles. Es evidente que son necesarios estudios con mayor número de muestras, investigando en profundidad los mecanismos de actuación, las dosis terapéuticas, las matrices para vehiculizar estas células y todas las variables que puedan influir en los resul-

tados. Si estos estudios en animales siguieran obteniendo estos resultados favorables, el siguiente paso sería la investigación en humanos para verificar si los resultados obtenidos en modelo animal son reproducibles y seguros

en las personas. Para poder llegar a la aplicación de DPSC en terapias celulares personalizadas aún queda por profundizar sobre aspectos tales como cuál es el medio de cultivo adecuado o ideal, las propiedades teratogénicas de las células madre, la dosis celular adecuada para trasplantar y hasta qué límite se pueden llevar los procesos de proliferación sin caer en la

senescencia celular, entre otros aspectos (24). Es cierto que los resultados preliminares en modelo animal son prometedores con estas células madre mesenquimales adultas, pero el futuro dirá si estos resultados son trasladables y reproducibles en seres humanos o no. ●

«PARA PODER LLEGAR A LA APLICACIÓN DE LAS DPSC EN TERAPIAS CELULARES PERSONALIZADAS AÚN QUEDA POR PROFUNDIZAR SOBRE ASPECTOS COMO EL MEDIO DE CULTIVO ADECUADO O IDEAL O LAS PROPIEDADES TERATOGÉNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE, ENTRE OTROS»

BIBLIOGRAFÍA

1. Monteiro BG, et al. Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. *Cell Prolif* 2009; 42: 587-594.
2. Pereira Gomes JA, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51: 1408-1414.
3. Kerkis I, et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic? *J Translational Med* 2008; 6: 35 doi:10.1186/1479-5876-6-35.
4. Laino G, et al. Dental pulp stem cells can be detected in aged humans: an useful source for living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1394-1402.
5. Laino G, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006; 206: 693-701.
6. D'Aquino R, et al. Human dental pulp stem cells: From biology to clinical applications. *J Experimental Zool (Mol Dev Evol)* 2008; 310B.
7. Trubiani O, et al. Human dental pulp vasculogenesis evaluated by CD34 antigen expression and morphological arrangement. *J Dent Res* 2003; 82: 742-747.
8. Papaccio G, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* 2006; 208: 319-325.
9. d'Aquino R, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cells Mater* 2009; 18:75-83.
10. Giuliani A, et al. Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: Biological and clinical implications. *Stem Cells Translat Med* 2013; 2: 316-324.
11. Kawai G, et al. Human DPSC facilitates bone regeneration in a rat bone defect model. *Bone Tissue Regener Insights* 2013; 4: 1-10.
12. Ma L, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth Is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS ONE* 2012; 7(12): e51777.
13. Laschke MW, et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 2006; 12: 2093-2104.
14. Bronckaers A, et al. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLoS ONE* 2013; 8 (8): e71104.
15. Nishino Y, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy. *Cytotherapy* 2011; 13: 598-605.
16. Ishizaka R, et al. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials* 2013; 34: 1888-1897.
17. Le Blanc K, et al. Developmental Committee of the European group for blood and marrow transplantation: Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004, 363: 1439-1441.
18. Koç ON, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000, 18: 307-316.
19. Sun L, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multi-organ dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 2009, 27: 1421-1432.
- 20.- Banas A, et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 2008, 26: 2705-2712.
21. Wada N, et al. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol* 2009, 219: 667-676.
22. Yamaza T, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Research & Therapy* 2010; 1: 5.
23. Mucida D, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007, 317: 256-260.
24. De Sá Silva F, et al. Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012; Article ID 758102, 12 pages - doi:10.1155/2012/758102.