

Obtención y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Adultas de la Pulpa Dental Humana

Obtaining and Characterizing Adult Mesenchymal Stem Cells from Human Dental Pulp

Recibido: 02/07/2020

Aceptado: 15/10/2020

Gotta S¹, Carpignano R², Ugartemendia L²,
Asta D¹, Blasco F¹

¹ **Universidad de Buenos Aires**
Facultad de Odontología
Cátedra de Cirugía III
Buenos Aires, Argentina

² **Plasmacell S.R.L.**
Laboratorio de Biología Celular y Molecular
Investigador de Terapias Celulares
y Medicina Regenerativa

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal el aislar, expandir y caracterizar inmunofenotípicamente células madre mesenquimales de la pulpa dental humana, según los criterios mínimos propuestos por The International Society for Cellular Therapy (ISCT), como así también establecer la puesta a punto de las técnicas y protocolos de procedimientos para tal fin. Los cultivos fueron permanentemente monitoreados mediante microscopio invertido con contraste de fase y la inmunotipificación fue realizada por citometría de flujo.

Palabras clave: células madre, tejidos dentales, medicina regenerativa, cultivo celular, ingeniería celular.

ABSTRACT

The main objective of the present study is to isolate, expand and immunophenotypically characterize mesenchymal stem cells from human dental pulp, according to the minimum criteria proposed by The International Society for Cellular Therapy (ISCT), as well as to establish the fine-tuning of the techniques and procedural protocols for this purpose. The cultures were permanently monitored by inverted microscope with phase contrast and immunotyping was performed by flow cytometry.

Keywords: stem cell, dental tissue, regenerative medicine, cell culture, tissue engineering

INTRODUCCIÓN

Una peculiaridad que caracteriza a la medicina de nuestro tiempo es la utilización de los genes, las células, los tejidos y la combinación de estos como nuevos recursos terapéuticos. Esto es posible gracias a los avances alcanzados en el campo de la ingeniería genética, celular y tisular en el siglo XXI, con un potencial inmensurable por delante, que posiblemente

logrará mejoras significativas en el tratamiento de numerosas enfermedades.

El desarrollo de estas terapias constituye uno de los más importantes desafíos de la medicina actual en sus diferentes áreas. Estas terapias incluyen células vivas y moléculas biológicas con potencial proliferativo y de diferenciación que, a diferencia de un fármaco tradicional, continúan su acción metabólica y terapéutica dentro del organismo receptor (Zapata Linares y García Quiroz, 2011).

Estas terapias regenerativas innovadoras combinan aspectos de la medicina, la biología celular, las ciencias básicas y la ingeniería (ciencia multidisciplinar), con el objetivo de regenerar, reparar o reemplazar tejidos o células dañadas, según la International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (Areman, 1997).

La ingeniería tisular y la medicina regenerativa son términos utilizados en el área de la salud para referirse a la rama de la medicina que se ocupa de la transformación de estas ideas en hechos prácticos (NIH, 2020). La generación de tejidos y órganos a partir de pequeñas muestras o biopsias de un ser vivo, están científicamente avanzadas (Pellegrini et al., 2017; Detela y Lodge, 2019), y seguramente tendrán un gran impacto en la medicina clínica de los próximos años. Surge entonces el concepto de "Odontología Regenerativa", incluyendo endodoncia, periodoncia y cirugía bucomaxilofacial, entre otros, con la finalidad de reconstruir y regenerar el daño o pérdida de los tejidos orales, como periodonto, complejo pulpa-dentina, hueso, mucosa y tejidos orofaciales en general (Honda et al., 2010).

Las células madre mesenquimales (CMM) adultas, las cuales no han alcanzado el estadio de diferenciación terminal (Potdar y Deshpande, 2013), fueron inicialmente descritas por Friedenstein et al., (1987) como células fibroblásticas, formadoras de colonias no hematopoyéticas y, por lo tanto, capaces de dar lugar a varios linajes celulares como condroblastos, osteoblastos, adipoblastos (Pittenger et al., 1999), cardiomiocitos y otros muchos tipos celulares (Chen et al., 2012; Chamberlain et al., 2007; Minguell et al., 2001). Las CMM son de origen mesodérmico (Caplan, 1991) y pueden diferenciarse a todos los tipos celulares que provienen de esta misma capa embrionaria y otras, dada su plasticidad (Jiang, 2002; Lakshminpathy y Verfaillie, 2005). Se caracterizan por ser células indiferenciadas (no especializadas), por su capacidad de autorenovación (autoclonogenicidad), y finalmente por poder diferenciarse tanto a células de origen mesenquimal como no mesenquimal, gracias a su plasticidad celular (potencial transgermal) (Yen y Yelick, 2011).

Las CMM derivadas de tejidos adultos, no generan preocupación ética ni moral para su uso en terapias humanas. Estas células, originalmente obtenidas de la médula ósea, han sido consideradas por mucho tiem-

po como la principal y casi única fuente de CMM. Pero habiendo sido obtenidas y caracterizadas por los investigadores en varios nichos, y dado que su recolección de la médula ósea es un procedimiento doloroso e invasivo, actualmente se utilizan células madre que pueden ser aisladas de diferentes fuentes, tales como tejido adiposo (Zuk et al., 2002; Shi y Gronthos, 2003), cordón umbilical, pulpa dental y ligamento periodontal (Gronthos et al., 2000; Estrela et al., 2011) entre otros (Friedlander et al., 2009; Yen y Yelick, 2011, Thomson y Kahler, 2010). Ya se ha establecido que estas poblaciones celulares obtenidas de estos nichos, tienen las mismas propiedades de indiferenciación, renovación y diferenciación que las CMM de médula ósea y, por lo tanto, pueden utilizarse para futuras terapias regenerativas en diversas enfermedades. Es por eso que actualmente se opta por utilizar estas fuentes menos invasivas y menos dolorosas para su obtención (Zuk et al., 2002).

The International Society for Cellular Therapy (Domini et al., 2006) propuso 4 criterios mínimos para poder caracterizar a una célula como CMM, y estos son:

1. adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo;
2. la morfología celular debe ser fibroblastoide, fusiforme;
3. expresión de antígenos de superficie específicos (marcadores celulares). Estos deben ser positivos para los fenotipos CD73, CD90 y CD105 y menos del 2% (fenotipo negativo) para CD34 (células endoteliales), CD 45 (células leucocitarias) CD14 y CD11 (marcadores de macrófagos y monocitos) CD79 y CD19 (marcador de linfocito B) y HLA-DR (Clase II);
4. capacidad de diferenciación a osteoblasto, condroblasto y adipoblasto bajo condiciones de cultivo estándar in vitro, y ser demostrado por la tinción correspondiente.

La pulpa dental humana es un gran reservorio de CMM indiferenciadas (Gronthos et al., 2000; Murray et al., 2007). Estas células madre derivan del ectodermo de la cresta neural y tienen gran potencial de proliferación y de diferenciación según el micro ambiente y los estímulos a los que se las somete. Las células madre derivadas de la pulpa dental o, en inglés, Dental Pulp Stem Cell (DPSC) tienen un fenotipo de CMM y éstas se pueden diferenciar en neuronas, cardiomiocitos, condrocitos, osteoblastos, células hepáticas y células β del islote del páncreas. Las DPSC han demostrado un gran potencial para su uso en medicina regenerativa.

Los gérmenes de los terceros molares comienzan su desarrollo aproximadamente a los 6 años de edad. Este tejido embrionario de la lámina dentaria permanece inactivo e indiferenciado en los maxilares hasta aproximadamente los 18 años de edad. Una gran parte de esta población de células indiferenciadas resi-

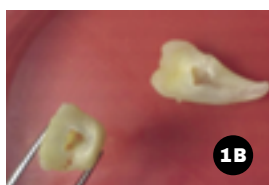
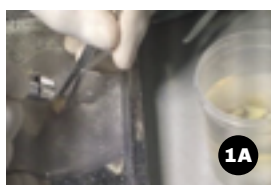


FIGURA 1AB. Obtención de la pulpa dental humana en esterilidad



FIGURA 2. Pulpa dental en caja de petri sin procesar en medio de cultivo

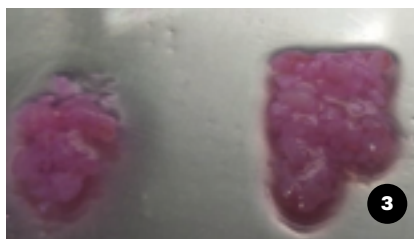


FIGURA 3. Pulpa dental procesada



FIGURA 4AB. Siembra de los explantes de un tamaño aproxima de 2 a 3 mm

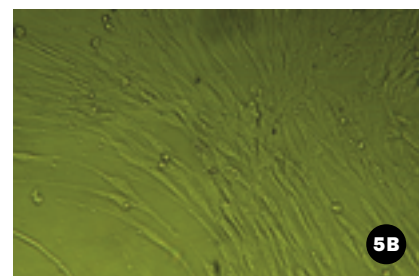


FIGURA 5A. Magnificación 10X, después de 5 días en cultivo, se observa como las células madre con su característica típica fusiforme han salido del explante y en forma de líneas ordenadas se han expandido por la superficie de la botella de cultivo **B.** Magnificación 40X, se observa una confluencia de las células en cultivo cercana al 70%, con una alta tasa de proliferación

de en la zona rica en células de la pulpa del germen dentario, necesarias para el desarrollo completo del diente (D'Aquino et al., 2009). Por esta razón los terceros molares representan una gran fuente de células madre de pulpa dental humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislación y cultivo de CMM adultas, en la Cátedra de Cirugía y Traumatología Bucomaxilofacial III, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires (FOUBA). Para tal fin se recolectaron gérmenes de terceros molares inferiores y superiores sanos de pacientes voluntarios jóvenes de ambos sexos.

Los molares extraídos fueron lavados con solución fisiológica para luego, de forma inmediata, hacer la extracción de la pulpa dental dividiendo longitudinalmente las piezas dentarias con instrumental rotatorio.

A continuación, se desprendió la pulpa de su cavidad utilizando curetas pequeñas (Figura 1). Una vez obtenida la pulpa en un ámbito aséptico, y manteniendo

la cadena de esterilidad, se colocó inmediatamente en tubo tipo falcón que contenía "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM) con suero fetal bovino, antibióticos, y se mantuvo en refrigeración controlada a 4° C (Figura 2).

Una vez en el laboratorio, el tejido pulpar se lavó de forma seriada con cinco soluciones de DMEM con antibióticos; se la reposó en una caja de petri de 100 mm de diámetro donde se procedió al corte con la ayuda de una hoja de bisturí Nro. 24 en pequeños fragmentos de entre 2 y 3 mm (Figura 3).

La técnica de cultivo elegida fue por explante. Los explantes fueron cultivados en DMEM con antibióticos y suero fetal bovino, en botella de cultivo que permitía el intercambio gaseoso con la atmósfera de la estufa (Figura 4).

Cada 48 hs se realizó el cambio del medio de cultivo. La estufa cuenta con una atmósfera controlada en humedad, gases y temperatura, todas ellas óptimas para el desarrollo del cultivo celular. Se logró la con-

fluencia del 80% a los 14 días, se procedió a la tripsinización del cultivo para producir el despegado de las células de la superficie del frasco de cultivo y se sembraron con una dilución de 1/10 en nuevas botellas de cultivos. Parte de estos cultivos fueron utilizados para hacer tinción de Hematoxilina-Eosina para la observación de las características morfológicas de las células, y otra parte para ensayos de inmunotipificación.

RESULTADOS

La primera caracterización de las CMM adultas provenientes de la pulpa dental se realiza por observación in vitro, dada por la adherencia de las células a la superficie del plástico según la ISCT, y observación en microscopio invertido con contraste de fases. Se evaluó diariamente y observó su característica típica celular con morfología fibroblastoide. En la Figura 5A magnificación 10X, después de 5 días en cultivo, se observa como las células madre, con su característica típica fusiforme, han salido del explante y en forma de líneas ordenadas se han expandido por la superficie de la botella de cultivo. En la Figura 5B magnificación 40X, se observa una confluencia de las células en cultivo cercana al 70%, con una alta tasa de proliferación. En la Figura 6A, la observación a ojo desnudo de una tinción de Hematoxilina-Eosina de la formación de una colonia y en la Figura 6B, el cultivo en confluencia cercano al 80%.

En las tinciones con Hematoxilina-Eosina, se pueden observar al microscopio las células con sus núcleos céntricos en un patrón de crecimiento ordenado en líneas, con una confluencia mayor al 90% (Figura 7A y 7B).

En el microscopio invertido con contraste de fase con magnificación 1000X, se pueden observar en esta tinción los núcleos de las células en cultivo en color rosa y en su interior fuertes condensaciones, lo que es compatible con los Cuerpos de Cajal. Estos son suborgánulos esféricos que se encuentran en el núcleo celular (en la vecindad del nucléolo), en células cuya tasa de proliferación y actividad metabólica es muy alta, como en el caso de las neuronas o células en cultivos entre otras. Su tamaño puede ir de 0.1 a 2.0 micrómetros y su número de uno a cinco por cada núcleo, variando a lo largo del ciclo celular y entre los diferentes tipos celulares (Figura 8).

El núcleo es un orgánulo dinámico, particularmente durante la mitosis. En estas microfotografías (Figura 9 A, B y C) pueden apreciarse las diferentes etapas de la división celular como pueden ser la metafase (Figura 9A, izquierda abajo), los cromosomas totalmente condensados situados en el centro de la célula, formando la placa ecuatorial. Anafase en la Figura 9A derecha arriba y Figura 9B, se observan las cromátidas de los cromosomas dirigiéndose hacia cada uno de los centriolos, situado uno en cada polo de la célula. Citocinesis, en la Figura 9C se ve el paso final del largo proceso de la división celular indicado con una flecha (microscopio invertido con contraste de fase con magnificación 1000X).

En todos los casos se puede observar claramente cómo la célula se ha despegado parcialmente de la superficie del plástico, lo que da la birrefringencia, cambiando su forma fusiforme característica, por una más redondeada.

Ensayos de diferenciación: capacidad multipotencial

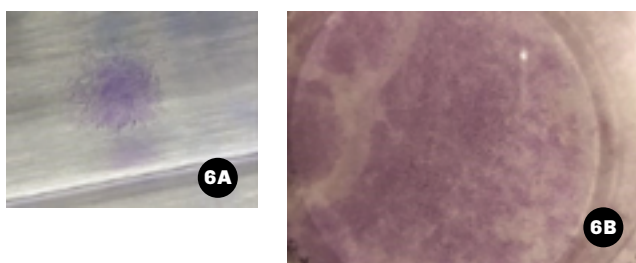
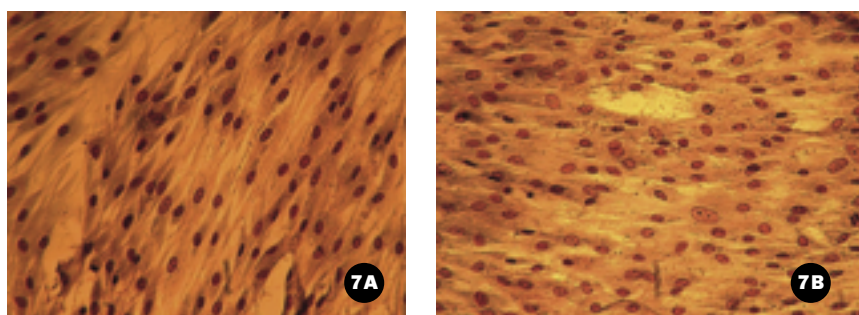


FIGURA 6A. Observación a ojo desnudo de una tinción de Hematoxilina-Eosina de la formación de una colonia. **B.** Cultivo en confluencia cercano al 80%



FIGURAS 7A Y 7B. Se pueden observar en las células con sus núcleos céntricos en un patrón de crecimiento ordenado en líneas, con una confluencia mayor al 90 %. Tinción hematoxilina – eosina

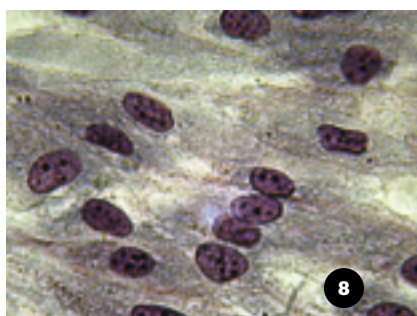
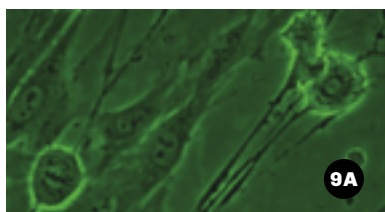


FIGURA 8. Microscopio invertido con contraste de fase con magnificación 1000X. En esta tinción se pueden observar los núcleos de las células en cultivo en color rosa, y en su interior, fuertes condensaciones, compatibles con los Cuerpos de Cajal



Microscopio invertido con contraste de fase con magnificación 1000X, de la actividad y división celular, donde pueden observarse diferentes etapas de la división celular

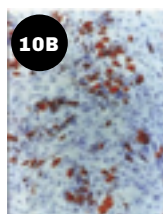
FIGURA 9A. Izquierda abajo, Metafase, los cromosomas totalmente condensados situados en el centro de la célula, formando la placa ecuatorial. **B.** Se observan las cromátidas de los cromosomas dirigiéndose hacia cada uno de los centriolos, situado uno en cada polo de la célula. Anafase. **C.** Se observa el paso final del largo proceso de la división celular indicado con una flecha. Citocinesis.

Diferenciación osteogénica



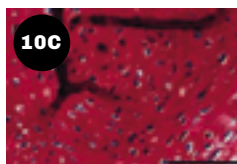
El color proviene de una tinción que marca las células óseas (tinción de von Kossa).

Diferenciación Adipogénica



El color proviene de una tinción llamada Rojo Nilo que tiñe las células grasas de rojo

Diferenciación Condrogénica



Las células cartilaginosas aparecen teñidas de rojo debido al colorante safranina O

FIGURA 10. Capacidad multipotencial de diferenciación hacia linaje Osteogénico, Adipogénico y Condrogénico. Fuente: <https://www.eurostemcell.org/es/celulas-madre-mesenquimales-las-otras-celulas-madre-de-la-medula-osea>

de diferenciación hacia linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico, bajo condiciones in vitro estándar de cultivo y demostrada con tinción específica (Figura 10) (EuroStemCell, 2016).

Caracterización inmunofenotípica: Se prepararon dos pools de DPSC, cada uno con cuatro suspensiones de diferentes cultivos de células madre de pulpa dental, todos ellos en igualdad de condiciones de crecimiento. Una vez alcanzada una confluencia del 80% del tercer pasaje, se tomó una alícuota de igual volumen y densidad celular de cada una de ellas para conformar el pool. Se analizaron mediante citometría de flujo, con la cual se pudo demostrar que más del 96% de las células tenían expresión positiva para los marcadores CD73, CD90 y CD105 y expresión negativa para los marcadores CD34, CD45 y HLA-DR clase II (Figuras 11 y 12).

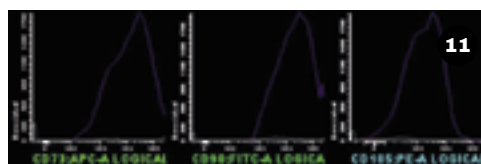


FIGURA 11. Pool Nro. 1. Conformado por cuatro cultivos diferentes de DPSC en igualdad de condiciones



Población	% Visibilidad
Otros Eventos	3,65
Eosinófilos	NA
Neutrófilos	NA
Monocitos	NA
Basófilos	NA
Linfocitos	NA
Células Dendríticas	NA
Mastocitos	NA
Serie eritroide	NA
Precursores CD 34+	NA
Población patológica	NA
Células Mesenquimales	96,35

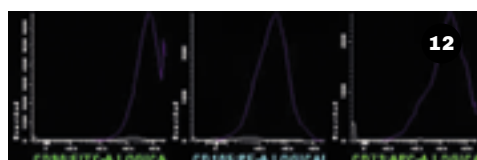
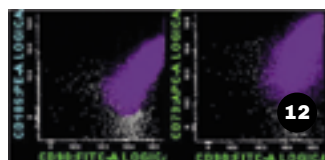


FIGURA 12. Pool Nro. 2 Conformado por cuatro cultivos diferentes de DPSC en igualdad de condiciones



Población	% Visibilidad
Otros Eventos	2,96
Eosinófilos	NA
Neutrófilos	NA
Monocitos	NA
Basófilos	NA
Linfocitos	NA
Células Dendríticas	NA
Mastocitos	NA
Serie eritroide	NA
Precursores CD 34+	NA
Población patológica	NA
Células Mesenquimales	97,04

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación, se llevó a cabo la puesta a punto de las técnicas y protocolos para la obtención y caracterización de células madre mesenquimales de pulpa dental humana. Se optó por el cultivo de explante, ya que las células se liberan con relativa rapidez y no sufren daño por acción de las enzimas digestivas (Huang et al., 2006). Los tiempos para alcanzar la confluencia celular estuvieron dentro de los reportados por la literatura científica. Se superaron con éxito las diferentes etapas para llegar a la obtención de DPSC, desde su comienzo con la desinfección de las piezas dentarias para prevenir la contaminación, lavados seriados, disgregación mecánica de la pulpa y cada uno de los pasajes, como así también la inmunotipificación y tinciones correspondientes. Las poblaciones de células mesenquimales de la pulpa dental humana aisladas mostraron capacidad de adherirse a la superficie de las botellas de cultivo, morfológica típica de fibroblastos (fusiforme) y finas extensiones citoplasmáticas, generación de colonias celulares altamente proliferativas, expresión de marcadores de superficie que caracteriza a las células madre mesenquimales adultas de pulpa dental humana. Las colonias se generaron en las adyacencias de los explantes en forma centrífuga. En los pasajes celulares se utilizó una dilución celular 1/10.

Vale destacar que hay una estrecha relación entre el número de células sembradas, densidad celular inicial y el desarrollo de éstas.

Las células madre de la pulpa dental (DPSC) surgen como una herramienta promisorio para su aplicación en la Odontología Regenerativa, por su gran potencial para ser utilizadas en la ingeniería de tejidos. Este estudio abre un camino hacia la investigación en la bioingeniería de materiales y tejidos con DPSC que podrían ayudar a los pacientes a alcanzar una mejora en su calidad de vida aplicando la medicina de precisión.

Perspectivas: Nos impulsa la pasión por la innovación, el esfuerzo y el compromiso para contribuir con la constante evolución de la ciencia y la tecnología en los diferentes ámbitos, permitiéndonos así estar a la vanguardia de los nuevos desarrollos científicos. Ser generadores, desde la FOUBA, de conocimientos, productos y servicios biotecnológicos de alta calidad y aceptación, así como también fomentar y fortalecer la interacción con equipos de trabajo de diferentes áreas de otros centros similares, que nos permitirá construir nuevos lazos y a la vez descubrir otras posibilidades de desarrollo profesional.

CONCLUSIONES

La pulpa dental humana constituye un reservorio de

células madre mesenquimáticas indiferenciadas. Los terceros molares retenidos, que usualmente es necesario extraer, constituyen una fuente apta para la obtención y cultivo de dichas células a partir de su pulpa dental, mostrando un gran potencial de proliferación. Las células madres mesenquimáticas indiferenciadas podrían jugar un papel clave en el avance en las terapias regenerativas tisulares.

REFERENCIAS

- Areman E. (1997). ISHAGE: the next step. International Society for Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother*, 6(5), 437–438. <https://doi.org/10.1089/scd.1.1997.6.437>
- Caplan AI. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B y Middleton J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739–2749. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>
- Chen FM, Sun HH, Lu H y Yu Q. (2012). Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*, 33(27), 6320–6344. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.048>
- D'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V y Papaccio G. (2009). Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 312B(5), 408–415. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21263>
- Detela G y Lodge A. (2019). EU regulatory pathways for ATMPs: standard, accelerated and adaptive pathways to marketing authorisation. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 13, 205–232. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.01.010>
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj y Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF y Gava E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*, 22(2), 91–98. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402011000200001>
- EuroStemCell. (2016). Células madre mesenquimales: las “otras” células madre de la médula ósea. <https://www.eurostemcell.org/es/celulas-madre-mesenquimales-las-otras-celulas-madre-de-la-medula-osea>
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK y Gerasimov UV. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, 20(3), 263–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x>
- Friedlander LT, Cullinan MP y Love RM. (2009). Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J*, 42(11), 955–962. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2009.01622.x>
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG y Shi S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S y Moroszeck C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci*, 52(4), 541–552. <https://doi.org/10.2334/josnurd.52.541>
- Huang GT, Sonoyama W, Chen J y Park SH. (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*, 324(2), 225–236. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0117-9>
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), 41–49. <https://doi.org/10.1038/nature00870>
- Lakshmipathy U y Verfaillie C. (2005). Stem cell plasticity. *Blood Rev*, 19(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.03.001>
- Minguell JJ, Erices A y Conget P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226(6), 507–520. <https://doi.org/10.1177/153537020122600603>
- Murray PE, Garcia-Godoy F y Hargreaves KM. (2007). Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*, 33(4), 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.09.013>
- NIH. National Institutes of Health. (2020). Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. <https://www.nibib.nih.gov/>

Pellegrini G, Ardigò D, Milazzo G, Iotti G, Guatelli P, Pelosi D y De Luca M. (2017). Navigating market authorization: the path Holoclar took to become the first stem cell product approved in the European Union. *Stem Cells Transl Med*, 7(1), 146–154. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0003>

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S y Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>

Potdar PD y Deshpande SS. (2013). Mesenchymal stem cell transplantation: new, avenues for stem cell therapies. *J Transplant Technol Res*, 3(2), 1–16. <https://doi.org/10.4172/2161-0991.1000122>

Shi S y Gronthos S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 18(4), 696–704. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.696>

Thomson A y Kahler B. (2010). Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J*, 55(4), 446–452. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01268.x>

Yen AH y Yelick PC. (2011). Dental tissue regeneration - a mini-review. *Gerontology*, 57(1), 85–94. <https://doi.org/10.1159/000314530>

Zapata Linares NM y García Quiroz F. (2011). Preguntas y respuestas sobre medicina regenerativa. *Rev Ing Biomed*, 5(10), 23–30. <http://www.scielo.org.co/pdf/rinbi/v5n10/v5n10a04.pdf>

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P y Hedrick MH. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Dirección para correspondencia

Cátedra de Cirugía III
Facultad de Odontología
Universidad de Buenos Aires
M. T. de Alvear 2142
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1122AAH
sergio.gotta@odontologia.uba.ar