



### Dr. Miguel Ángel Iglesia Puig

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

## CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN EN APLICACIONES EXTRAORALES PARA MEDICINA REGENERATIVA (1ª PARTE)

### 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 las confiere un gran potencial en medicina regenerativa. En esta primera parte se revisan las investigaciones con DPSC para regeneración neuronal y neural, regeneración cardíaca, diabetes y regeneración de glándulas salivares.

**Palabras clave:** Célula madre de pulpa dental, aplicaciones terapéuticas extraorales, medicina regenerativa, regeneración neuronal, regeneración cardíaca, diabetes, regeneración de glándulas salivares.

### INTRODUCCIÓN

Las células madre son células con capacidad de diferenciación a otras estirpes celulares y con capacidad de auto-renovación, pudiéndose dividir y multiplicar conservando su estado de indiferenciación. En el año 2000 (1) se identificó en la pulpa dental de los dientes temporales y de los definitivos la presencia de células madre, profundizando desde ese momento en el estudio de las propiedades y posibilidades de estas células.

Las células madre de pulpa dental (DPSC) son células madre mesenquimales adultas y tienen una gran capacidad de diferenciación, habiéndose aislado en la pulpa dental células multipotentes (2) capaces de diferenciarse a estirpes celulares de su misma capa embrionaria y células pluripoten-

tes (3) capaces de diferenciarse a estirpes celulares de las tres capas embrionarias. Asimismo, son células que se pueden expandir, consiguiendo hacerlas proliferar en número de forma exponencial, sin perder su estado de indiferenciación y su condición de célula madre (4). Este crecimiento se puede conseguir en poco tiempo. De hecho las DPSC proliferan más rápido que las células madre de médula ósea (5). Estas dos propiedades, diferenciación y proliferación, les confieren un gran potencial en medicina regenerativa.

Al ser células madre adultas no presentan problemas éticos en su utilización, ni requieren de procedimientos invasivos para su obtención, pudiendo además obtenerse varias muestras y en varias ocasiones. Son células que soportan los procesos de criopreservación y descongelación, manteniendo tras estos procesos unas altas tasas de supervivencia y conservando sus propiedades (6-8).

El objetivo del presente artículo es revisar el estado actual de la investigación en aplicaciones extraorales de las DPSC para posibles aplicaciones en medicina regenerativa. Dado la extensión de la revisión, ésta se divide en dos partes, que serán publicadas en ediciones consecutivas de GACETA DENTAL.

### REGENERACIÓN NEURONAL Y NEURAL

Las DPSC tienen un origen embriológico común con las del sistema nervioso en la cresta neural, por lo que algunos autores las califican como las candidatas ideales para la regeneración neuronal (9), constituyendo mejor opción que otros tipos de células madre para este tipo de aplicaciones.

En estas patologías hacen falta grandes cantidades de

células madre para su tratamiento, y las DPSC poseen altas tasas de proliferación conservando su estado indiferenciado, mayores que las de las células madre de médula ósea, pudiéndose expandir *in vitro* en pocas semanas. Otra ventaja añadida frente a las de médula ósea es que las DPSC se pueden obtener de forma mucho más traumática y sencilla, hecho importante en pacientes con problemas neurológicos y/o de salud graves. Al ser para uso autólogo (empleando las células del propio paciente) no existe rechazo inmune, factor añadido a la buena regulación inmunitaria de las DPSC en este ámbito, comparable o incluso mejor que las de médula ósea (10). Según Karao y cols. (11), las DPSC humanas poseen mejores propiedades como células madre para regeneración neuronal que las de médula ósea.

Las DPSC tienen una fuerte expresión de marcadores de células neuronales y gliales (9), incluso en condiciones basales, a la vez que una morfología similar a una neurona, con axones y procesos citoplasmáticos muy largos. Asimismo muestran actividad eléctrica neuronal (12), por lo que estimuladas adecuadamente podrían constituir una fuente excelente de obtención de células neuronales. En experimentación animal se ha observado que se integran y sobreviven en el tejido neural del huésped, adoptando un fenotipo neural y promoviendo neurogénesis *de novo* (13).

Sus posibles aplicaciones terapéuticas en este ámbito estarían en patologías tales como el accidente cerebrovascular isquémico, el traumatismo y sección de médula espinal y las enfermedades neurodegenerativas (9).

Las primeras publicaciones empleando DPSC en regeneración neural son para tratamiento de secciones de nervio facial en ratas. Sasaki y cols. (14) investigan en 19 animales la regeneración de una sección de 7 mm. de longitud de este nervio, empleando un tubo de silicona que contenía un gel de colágeno impregnado con DPSC. A los 12 días, las ratas tratadas de esta manera habían regenerado los 7 mm. de su nervio facial seccionado y conectado ambos extremos seccionados, frente a los controles, en los que se les colocó únicamente el gel de colágeno dentro del tubo y únicamente se obtuvo un crecimiento parcial de tejido sin llegar a conectar ambos extremos seccionados. Mediante pruebas de fluorescencia, inmunofluorescencia y tinciones con diferentes marcadores, los autores observaron que estos nervios regenerados con DPSC contenían axones, vasos sanguíneos, células similares a células de Schwann, fibras mielinizadas y neuronas motoras. Los resultados sugieren que estas DPSC trasplantadas formaron vasos sanguíneos y tejido mielinizado, y que contribuyeron a promover la regeneración nerviosa, por lo que según estos autores las DPSC son una fuente celular apropiada para la regeneración de nervios periféricos.

En estudios recientes (15) se ha publicado la capacidad de las DPSC de estimular la recuperación locomotora tras una sección completa de la médula espinal en modelo animal. El equipo de investigación de la Universidad de Nagoya (Japón), encabezado por el Dr Sakai, inyectaba en ratas con

la médula espinal completamente seccionada, 2.500.000 de DPSC en 2 localizaciones a 2 mm. de la lesión, así como 100.000 DPSC en una matriz de fibrina rellenando la zona de la sección. A las cinco semanas observaron que las ratas que recibieron DPSC eran capaces de moverse y andar.

---

«DESDE SU IDENTIFICACIÓN EN EL AÑO 2000, LAS **CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL** (DPSC) –CÉLULAS MESENQUIMALES ADULTAS– HAN DESTACADO POR SUS INTERESANTES PROPIEDADES, COMO SON LA **CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN Y DE PROLIFERACIÓN**, LO QUE LAS CONFIERE UN GRAN POTENCIAL EN MEDICINA REGENERATIVA»

---

Los autores afirman que esto es debido a múltiples mecanismos neuro-regenerativos atribuibles a las DPSC, inhibiendo la apoptosis celular, preservando los filamentos neuronales y las vainas de mielina, promoviendo la regeneración de los axones seccionados, reemplazando las células perdidas y diferenciándose a oligodendrocitos en estas condiciones tan adversas. Los resultados obtenidos indican que las DPSC pueden proporcionar beneficios terapéuticos en el tratamiento de la sección de médula espinal.

También se han estudiado las DPSC en el tratamiento de infartos cerebrales en modelo animal (16), demostrando que ayudan de forma significativa a la mejoría funcional en estas patologías. El estudio se realizó en roedores a los que se les efectuaba un trasplante intracerebral de DPSC humanas a las 24 horas de haber sufrido isquemia cerebral focal. A las cuatro semanas, los animales tratados con DPSC mostraron una mejora significativa neuroconductual global, así como una mayor recuperación sensorial y motora de la pata delantera afectada por el infarto cerebral, en comparación con los controles. También a las 4 semanas se observó que las DPSC trasplantadas habían migrado hacia la zona infartada, colaborando así con esta mejoría. Este estudio proporciona una evidencia pre-clínica de la eficacia terapéutica de las DPSC para mejorar la recuperación de las deficiencias sensoriales y motoras post-infarto cerebral.

Otro estudio de reciente publicación (17) evaluó el efecto de la inyección intraventricular de DPSC humanas en ratas con encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) neonatal. Investigaron en una muestra de 36 ratas, a las que se les indujo una EHI a los 7 días de vida ligándoles la arteria carótida izquierda. A los tres días se inyectaron DPSC directamente en el ventrículo lateral izquierdo de los animales del grupo de estudio. Evaluaron todos los animales a los 45 días de vida, encontrando mejorías significativas en todas las pruebas de comportamiento de las ratas tratadas con DPSC fren-

te a las no tratadas. Además, las DPSC eran visibles en la zona que se habían inyectado y en el córtex izquierdo, a la vez que mostraban inmunotinción positiva para marcadores neuronales y gliales. Estas tinciones se vieron claramente disminuidas en el grupo de control en comparación al grupo tratado con DPSC. Los autores concluyen que la inyección intraventricular de DPSC humanas mejora la encefalopatía hipóxico-isquémica en ratas neonatales, por lo que se abre una vía de investigación de futuras aplicaciones terapéuticas de las DPSC en el ámbito de la regeneración neuronal y de infartos y daños cerebrales.

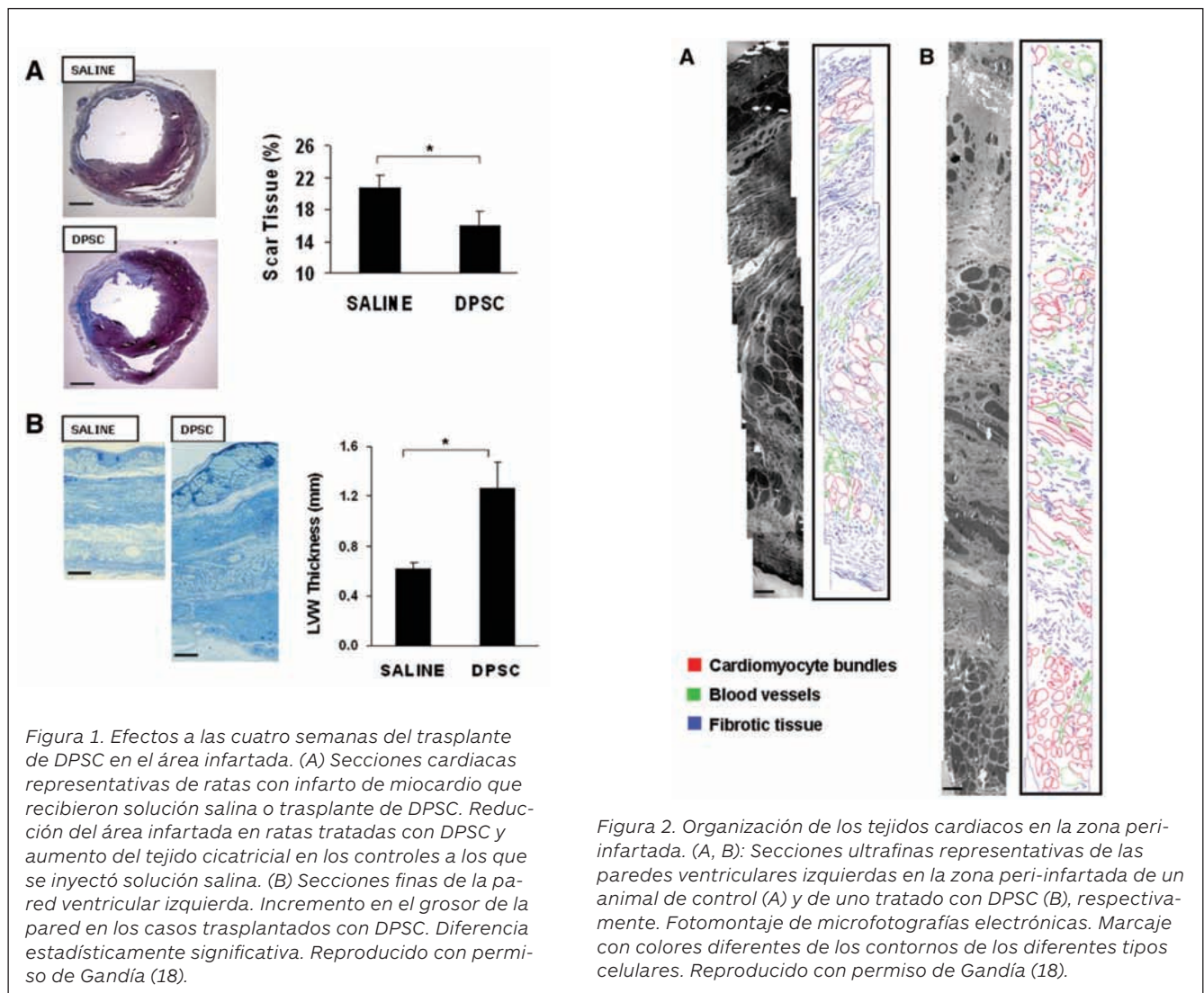
Es evidente que estas investigaciones mencionadas son los primeros estudios *in vivo* en modelo animal de aplicaciones de DPSC en regeneración neuronal y neural. Son trabajos con muestras limitadas y sería importante poder continuar profundizando en estas investigaciones para determinar las dosis de DPSC necesarias, los efectos de estas células sobre las diversas patologías, así como la duración a largo plazo de dichos beneficios clínicos. Todas las investigaciones revisadas

coinciden en el amplio potencial de las DPSC en regeneración neuronal y neural, y en los resultados positivos que se están obteniendo en animales en diferentes patologías neurales.

## REGENERACIÓN CARDIACA

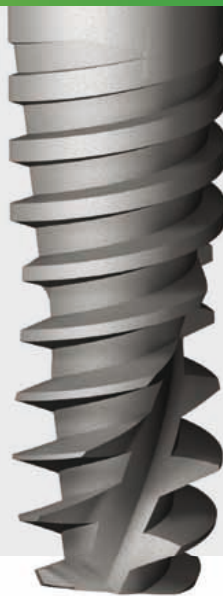
Las DPSC tienen su área de aplicación en regeneración cardíaca. El equipo de investigación de la Unidad de Cardio-regeneración del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia publicó un estudio (18) en el que evaluaban la eficacia de las DPSC en la terapia celular del infarto agudo de miocardio en modelo animal. Estos autores seleccionaron las DPSC frente a las células madre de médula ósea por su mayor capacidad de auto-renovación, de proliferación *in vitro*, así como por su capacidad inmunomoduladora. También es importante, según los autores, la capacidad de las DPSC de segregar factores de crecimiento (VEGF, IGF-1, IGF-2, SCF, GCSF) que realizan acciones proangiogénicas, antiapoptóticas y cardioprotectoras.

En el estudio realizaban una inyección intramiocárdica de





## Simplificamos la implantología



Por más de 25 años, profesionales implantólogos de todo el mundo han elegido cada día los innovadores productos de **Alpha-Bio Tec** en las áreas de implantes dentales, prótesis, instrumentos quirúrgicos y biomateriales. Visítenos en **EXPODENTAL** y descubra porque decimos que... **simplificamos la implantología.**

Visítenos en  
**EXPODENTAL**  
Pabellón 9, stand 9G03

Distribuidores autorizados

 **ALPHA Bio**  
TEC  
Simplantology

[www.alpha-bio.net](http://www.alpha-bio.net)

**MEDICAL 10**  
DENTAL PRODUCTS

+34-951-106-050  
info@medical10.net  
[www.medical10.net](http://www.medical10.net)

 **Sanhigia**  
TODOS EN LA MISMA DENTISTIA

+34-976-179-346  
jsenarsancho@sanhigia.com  
[www.sanhigia.com](http://www.sanhigia.com)



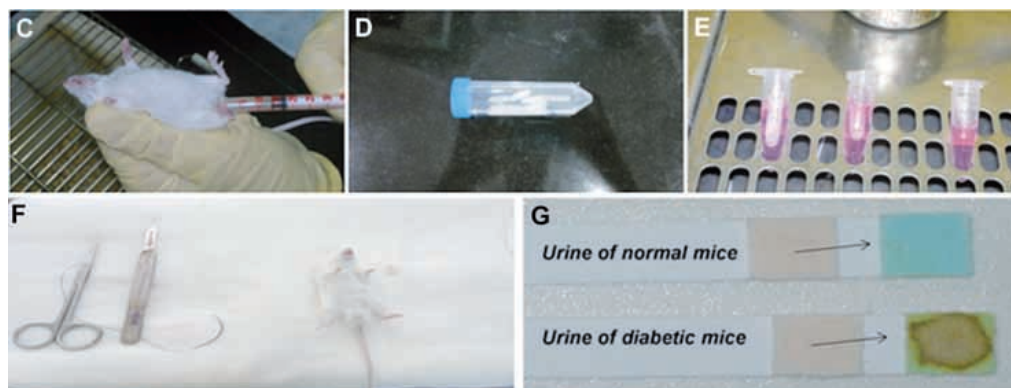


Figura 3. (C) Infiltración intraperitoneal de estreptomicina (STZ) en ratones sanos para convertirlos en ratones diabéticos. (D) Lavado de las cápsulas previo al trasplante. (E) Cápsulas con grupos de células similares a islotes de páncreas generadas a partir de células madre de pulpa dental, preparadas para el trasplante. (F) Ratón diabético anestesiado preparado para trasplante de las cápsulas. (G) Comparación de niveles de glucosa en orina de ratones normales y diabéticos. Diferencia de color en tiras de análisis de orina. Reproducido con permiso de Kanafi (22).

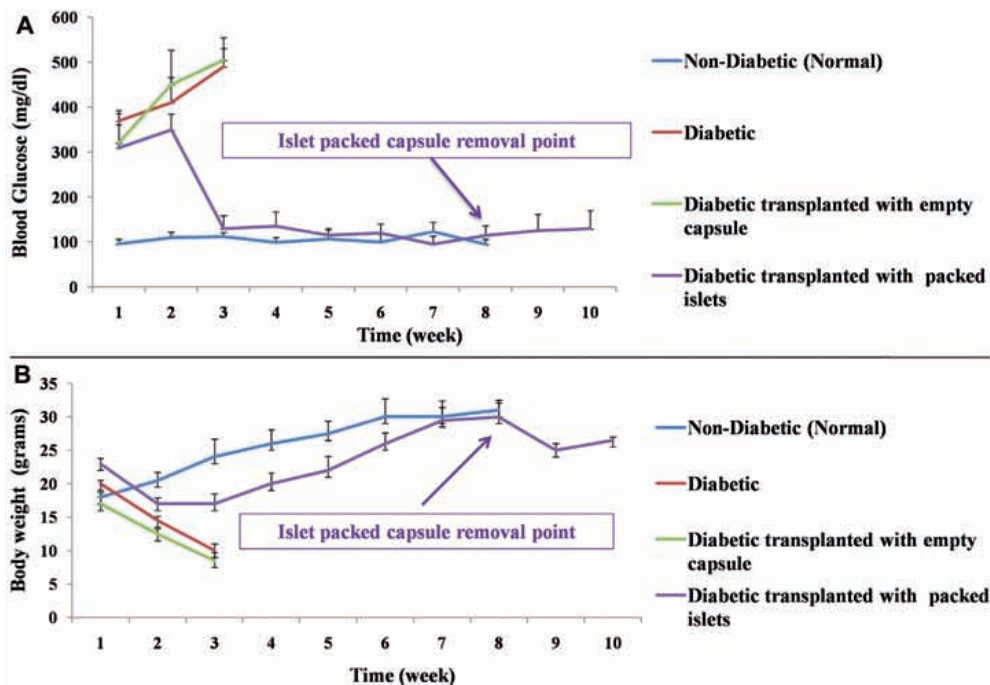


Figura 4. Comparación de niveles de glucosa en sangre (A) y de peso corporal (B) en ratones normales, diabéticos, diabéticos trasplantados con cápsulas vacías y diabéticos trasplantados con cápsulas con grupos de células diferenciadas de células madre de pulpa dental. Reproducido con permiso de Kanafi (22).

1.500.000 de DPSC en ratas a los 7 días de haberles inducido un infarto agudo de miocardio, frente a una inyección salina a los animales empleados como control. Tras cuatro semanas, en la evaluación encontraron una mejoría en la función cardíaca de los animales tratados con terapia celular con DPSC frente a los controles, con una reducción del tamaño del área infartada y un incremento en el grosor de la pared cardíaca (figura 1). Asimismo se evidenció un incremento del número de capilares, un aumento de paque-

tes de cardiomiocitos y una mayor proliferación de miofibroblastos (figura 2).

Todos estos hallazgos significaron una mejoría en la función del ventrículo izquierdo, por lo que los autores afirman que las DPSC podrían ser una nueva alternativa para la reparación cardíaca, al menos en casos de infarto agudo de miocardio.

## DIABETES

La diabetes es una enfermedad compleja, con alta inci-

CURSO BIOMECÁNICA Y ESTÉTICA

# Dr. Ravindra Nanda

# Dr. Luis Carriere

HOTEL Eurostars Madrid Tower\*\*\*\*\* / **MADRID** /  
28 - 29 de Marzo 2014



Secretaría técnica

**Viajes Foster**

Tel.: 95 422 37 76

Fax: 95 422 35 30

info@viajesfoster.com

Plaza del Museo, 2

41001 Sevilla



# ORTOBAO

www.ortobao.com





dencia a nivel mundial, y con posibilidad de tratamientos avanzados, pero con pocas posibilidades de curación. Para cambiar esta realidad, desde hace años se está investigando el uso de células madre adultas como fuente potencial de células pancreáticas. Existen varios grupos de investigación (19, 20) que han conseguido la diferenciación de DPSC a células pancreáticas secretoras de insulina y recientemente están apareciendo publicaciones relacionadas con diabetes en las que se emplean DPSC, obteniendo resultados prometedores en ensayos *in vitro* e *in vivo* en modelo animal.

Carnevale y cols. (21) proponen y evalúan un sencillo protocolo de diferenciación de DPSC a células secretoras de insulina. Los autores observan, tras 21 días de cultivo de las DPSC, que éstas ya tienen estructuras similares a los islotes de páncreas. Además, mediante diferentes pruebas, muestran que las células diferenciadas a partir de células madre dentales son capaces de secretar insulina. Este estudio corrobora los resultados de publicaciones anteriores y muestra la capacidad de las DPSC de poder diferenciarse a células productoras de insulina, convirtiéndose en una buena fuente celular con potencial en el tratamiento de la diabetes.

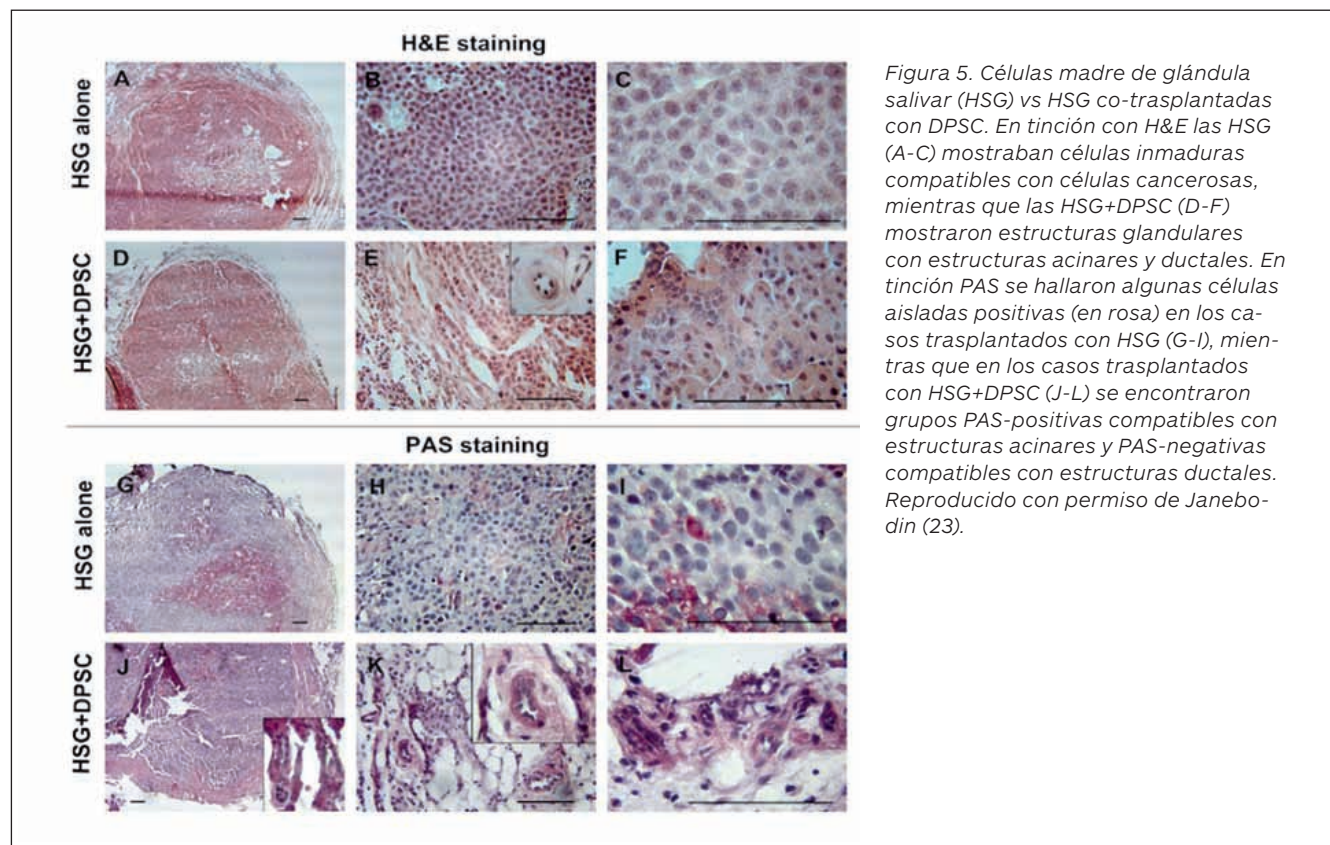
Como se ha mencionado, una de las líneas de investigación del tratamiento de la diabetes se basa en la utilización de células madre adultas, ya que para dicho tratamiento es necesario un número elevado de células capaces de generar de forma fisiológica células productoras de insulina. En este

sentido avanzan las investigaciones en modelo animal de Kanafi y cols. (22), en el que comparan el rendimiento de grupos de células similares a islotes de páncreas generadas a partir de células madre de pulpa dental de dientes de leche (SHED) y de dientes adultos (DPSC). Estas agrupaciones celulares se colocaron en macro-cápsulas biocompatibles y se trasplantaron en ratones con diabetes (**figura 3**). Entre los hallazgos de este estudio cabe destacar que los ratones trasplantados con células madre dentales recuperaron su nivel normal de glucosa en 3-4 días, siendo ésta conservada durante más de 60 días (**figura 4**). Obtuvieron mejores resultados con células de dientes de leche que con las de dientes adultos.

Estos resultados son prometedores y demuestran, por vez primera, que las células madre de pulpa dental de dientes de leche son capaces de revertir la diabetes *in vivo* en ratones. Los autores concluyen que las células madre de pulpa dental son una fuente celular autóloga accesible, libre de debates éticos, no invasiva y sencilla de obtener, para poderlas utilizar en terapia celular en el tratamiento de diabetes.

## REGENERACIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES

El tratamiento de la patología hipofuncional de las glándulas salivales es otro de los campos donde las DPSC están siendo investigadas con buenos resultados, considerándose una buena alternativa terapéutica. La xerostomía o boca seca es debida a una reducción funcional de las glándu-



*Figura 5. Células madre de glándula salivar (HSG) vs HSG co-trasplantadas con DPSC. En tinción con H&E las HSG (A-C) mostraban células inmaduras compatibles con células cancerosas, mientras que las HSG+DPSC (D-F) mostraron estructuras glandulares con estructuras acinares y ductales. En tinción PAS se hallaron algunas células aisladas positivas (en rosa) en los casos trasplantados con HSG (G-I), mientras que en los casos trasplantados con HSG+DPSC (J-L) se encontraron grupos PAS-positivos compatibles con estructuras acinares y PAS-negativas compatibles con estructuras ductales. Reproducido con permiso de Janebo-din (23).*



new

Opalescence®

● ● ● go

**Blanqueamiento ambulatorio  
& RÁPIDO  
SÚPER CONFORTABLE**

**Opalescence GO** es el tratamiento ambulatorio Opalescence más rápido (sólo 60-90 minutos para cada aplicación individual), está listo para su uso y no necesita tomas de impresión o modelos.

Además, Opalescence Go tiene la nueva y exclusiva férula precargada, **UltraFit**, extremadamente confortable y que se adapta a todas las arcadas.





las salivales, bien por Síndrome de Sjögren, por radioterapia para tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, por fármacos o por la edad, haciendo que los pacientes tengan dificultades al tragar y hablar, a la vez que pueden causar en-

«EN ESTA PRIMERA PARTE SE HAN REVISADO LAS PROPIEDADES DE LAS DPSC, QUE LAS CONVIERTEN EN UNA INTERESANTE FUENTE DE CÉLULAS MADRE ADULTAS PARA TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA»

fermedades dentales como la caries. En la Universidad de Washington se han investigado en ratas los efectos de añadir o no DPSC a células madre de glándulas salivales (HSG) en un hidrogel de ácido hialurónico (23).

En el grupo tratado con DPSC + HSG (1 millón de células madre de cada tipo) hallaron una mayor expresión de marcadores mesenquimales, endoteliales, neuronales, angiogénicos y de diferenciación a glándula salival madura. Asimismo encontraron estructuras hacinadas y ductales con abundante vascularización y más maduras (**figura 5**). Todos estos resultados indican que las DPSC apoyan y refuerzan la diferenciación de las HSG a tejido de glándula salivar funcional.

Los autores concluyen que las DPSC tienen potencial en terapia celular como inductoras mesenquimales en regeneración, reparación e ingeniería tisular glandular.

## CONCLUSIONES

En esta primera parte se han revisado las propiedades de las DPSC, que las convierten en una interesante fuente de células madre adultas para terapia celular y medicina regenerativa. También se ha profundizado en lo que se está estudiando en líneas de investigación para diferentes aplicaciones terapéuticas *in vivo*, en modelo animal, 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 resultados. 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.

En la segunda parte de este artículo se revisarán las investigaciones con DPSC para aplicaciones extraorales tales como la regeneración de córnea, distrofias musculares, regeneración ósea y angiogénesis, entre otras. ●

## BIBLIOGRAFÍA

- 1. Gronthos S, et al.** Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS* 2000; 97: 13625-30.
- 2. Miura M, et al.** SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 2003; 100: 5807-12.
- 3. Atari M, et al.** Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histol Histopathol* 2011; 26: 1057-70.
- 4. Martín-Piedra MA, et al.** Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy* 2013; 15: 507-18.
- 5. Huang GT, et al.** Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88: 792-806.
- 6. Papaccio GP, et al.** Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: A cell source for tissue repair. *J Cell Physiology* 2006; 208: 319-325.
- 7. Zhang W, et al.** Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Engineer* 2006; 12: 2813-23.
- 8. Woods EJ, et al.** Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* 2009; 59: 150-7.
- 9. Ibarretxe G, et al.** Neural crest stem cells from dental tissues: A new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 103503. doi: 10.1155/2012/103503. Epub 2012 Oct 4.
- 10. Ben-Ami E, et al.** Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2011; 10: 410-5.
- 11. Karaoz E, et al.** Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol* 2011; 136: 455-73.
- 12. Arthur A, et al.** Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 2008; 26: 1787-95.
- 13. Kiraly M, et al.** Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochemistry Int* 2011; 59: 371-81.
- 14. Sasaki R, et al.** Tubulation with dental pulp cells promotes facial nerve regeneration in rats. *Tissue Engineer - Part A* 2008; 14: 1141-7.
- 15. Sakai K, et al.** Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest* 2012; 122: 80-90.
- 16. Leong WK, et al.** Human adult dental pulp stem cells enhance post-stroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms. *Stem Cells Trans Med* 2012; 1: 177-187.
- 17. Fang C, et al.** Intraventricular injection of human dental pulp stem cells improves hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *PLoS ONE* 2013 Jun 14;8(6):e66748. doi: 10.1371/journal.pone.0066748. Print 2013.
- 18. Gandía C, et al.** Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells Int* 2008; 26: 638-45.
- 19. Govindasamy V, et al.** Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *J Dent Res* 2011; 90: 646-52.
- 20. Guimaraes ET, et al.** Transplantation of stem cells obtained from murine dental pulp improves pancreatic damage, renal function, and painful diabetic neuropathy in diabetic type 1 mouse model. *Cell Transplant* 2013; 22: 2345-54.
- 21. Carnevale G, et al.** In vitro differentiation into insulin-producing beta-cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Digestive Liver Dis* 2013; 45: 669-76.
- 22. Kanafi MM, et al.** Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy* 2013; 15: 1228-36.
- 23. Janebodin K, et al.** Neural crest-derived dental pulp stem cells function as ectomesenchyme to support salivary gland tissue formation. *Dentistry* 2012; S13:001. Doi: 10.4162/2161-1122 S13-001.