



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

MITOCONDRIAS EN CÉLULAS TRONCALES

TESIS

P R E S E N T A

Amairany Rodríguez Navarrete

Que para obtener el título de:

CIRUJANO DENTISTA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Raúl Rosales Ibáñez.

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INDICE

GLOSARIO	2
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Capítulo I: MARCO TEORICO	8
INGENIERÍA TISULAR.....	8
Triada de la Ingeniería Tisular.....	9
Células troncales, Células madre o “Stem Cells”	10
Criterios de la Sociedad de Terapia Celular para la identificación de células troncales. ..	12
"Stemness"	13
Clasificación de las células troncales	13
Células troncales mesenquimales	16
Células troncales mesenquimales apartir de tejidos dentales.....	17
Mitocondrias en células troncales	21
Capítulo II:JUSTIFICACIÓN	30
Capítulo III: PREGUNTA DE IVESTIGACIÓN.....	31
Capítulo IV: HIPÓTESIS.....	32
Capítulo V: OBJETIVOS.....	32
Capítulo VI: MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Criterios de selección	35
Descripción de los procedimientos	37
Capítulo VII: RESULTADOS.....	53
Capítulo VIII: DISCUSIONES.....	61
Capítulo IX: CONCLUSIONES.....	67
PERSPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	68



GLOSARIO

- ATP** Del inglés Adenosine Triphosphat. (Adenosin Trifosfato).
- BMMSCs** Del inglés, Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (Células Troncales de Medula Ósea).
- CENATRA** Centro Nacional de Trasplantes.de México
- D-PLSCs** Del inglés, Deciduos Periodontal Ligament Stem Cells. (Células Troncales de Ligamento Periodontal de Dientes Deciduos).
- DPSCs** Del inglés, Dental Pulp Stem Cells (Células Troncales de Pulpa Dental).
- ESC** Del inglés, Embryonic Stem Cells. (Células Troncales Embrionarias).
- GMSCs** Del inglés, Gingival-Derived Mesenchymal Stem Cells. (Células Troncales de Mucosa).
- hDPSCs** Del inglés, Human Dental Pulp Stem Cells (Células Troncales de Pulpa Dental Humano).
- hESC** Del inglés, Human Embrionic Stem Cells, (Células embrionarias Humanas
- HLA** Del inglés, Human Leukocyte Antigen, (Antígeno Leucocitario Humano)
- iPSCs** Del inglés, Induced Pluripotent Stem Cells. (Células Troncales Pluripotentes Inducidas).
- IT** Ingeniería Tisular.
- Kb.** Kilobyte, equivale a 10^3 (mil) bytes
- Ki-67** Kit de proliferación
- L&D** Del inglés, Live and Dead (Vida y Muerte), ensayo de viabilidad celular.



MACS	Del inglés, Magnetic-Activated Cell Sorting. (Clasificación de Células Activadas Magnéticamente).
Min.	Minuto.
MSC	Del inglés, Mesenchymal Stem Cells (Células Troncales Mesénquimales).
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
nmoles.	Nanomol equivale a 10^{-9} moles.
PDLSCs	Del inglés, Periodontal Ligament Stem Cells. (Células Troncales de Ligamento Periodontal).
PFPCs	Del inglés, Dental Follicle Stem Cells (Células Troncales de Folículo Dental).
pmoles.	Picomol equivale a 10^{-12} moles.
Rizólisis	Proceso fisiológico de destrucción o reabsorción de las raíces de los dientes temporales, durante la erupción de los dientes definitivos .
Rpm.	Revoluciones por minuto.
SCAPs	Del inglés, Stem Cells of the Apical Papilla (Células Troncales de Papila Apical).
SHEDs	Del inglés, Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teet. (Células Troncales de Dientes Deciduos Exfoliados).
SSEA-3	Del inglés, Stage- Specific Embryonic Antigen -3 (Antígeno Embrionario Específico de la Etapa 3).
SSEA-4	Del inglés, Stage- Specific Embryonic Antigen -4 (Antígeno Embrionario Específico de la Etapa 4).
Stem Cells	Células madre, células troncale. células mesenquimales.
Stemness	Característica esencial de una célula troncal que lo distingue de las células especializadas.
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión.



UFC

Unidad Formadora de Colonias.



Resumen

En actualidad existen varias técnicas para evaluar el estado de "stemness" de las células troncales, incluida la expresión de marcadores de superficie celular y la actividad de la telomerasa, por otro lado, la distribución y las funciones de las mitocondrias en las células troncales no se han examinado en su totalidad, los informes indican que un papel clave de las mitocondrias en las células troncales embrionarias, es su desplazamiento en el ovocito durante la fertilización para agruparse alrededor de los pronúcleos y permaneciendo en un patrón perinuclear durante el desarrollo del embrión. Se ha informado que el agrupamiento perinuclear mitocondrial persiste a través del desarrollo embrionario en las células troncales embrionarias, y dicha localización es indicativa de pluripotencialidad y/o stemnes en las células troncales. Se ha mencionado que los cambios morfológicos, metabólicos y de ubicación, podrían usarse como indicadores de "stemness". En esta tesis se planteó como objetivo general identificar y teñir las mitocondrias en células troncales de pulpa dental de terceros molares y de dientes deciduos exfoliados con MitoTracker Dee Red Fm para su posible uso en la Ingeniería Tisular.

Palabras clave: *Mitocondrias, Células troncales, DPSCs, SHEDs, Ingeniería Tisular.*



INTRODUCCIÓN

Cada año, millones de personas sufren la pérdida de tejidos u órganos por diversas causas, externas o internas (accidentes, lesiones patológicas propias de enfermedades congénitas, enfermedades autoinmunes, cáncer, fallo de órganos en fase terminal etc.). Los tratamientos actuales se basan en el uso de prótesis, trasplante de órganos y la aplicación de injertos. Aunque estas terapias han salvado y mejorado innumerables vidas, siguen siendo soluciones insatisfactorias. El trasplante está severamente limitado por una escasez crítica de donantes, esto empeora cada año mientras que la lista de espera de un órgano va en aumento, la reconstrucción quirúrgica puede dar lugar a problemas a largo plazo; los dispositivos mecánicos no pueden realizar todas las funciones de un solo órgano y, por lo tanto, no se puede evitar el deterioro progresivo del paciente. La Ingeniería tisular (IT) nace como respuesta a los problemas que presentan las terapias de reparación y la regeneración de tejidos que se utilizan actualmente. La IT es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ciencia y de la ingeniería para el desarrollo de sustitutos biológicos con el objetivo de restaurar, mantener o mejorar la función del tejido u órgano en combinación con la triada de la ingeniería tisular, la cual involucra andamios (*scaffolds*), factores de crecimiento, y células y/o células troncales. Las células troncales, células madre o *stem cells*, son un grupo de células únicas, no especializadas, con capacidad de proliferación y con el potencial para numerosas aplicaciones biomédicas. Los investigadores deben cerciorarse que la expresión de los marcadores de troncalidad en las *stem cells* sea estable durante períodos prolongados en el cultivo celular, con el fin de verificar



que el estado de troncalidad (stemness) no se ha perdido. En la actualidad se han propuesto diversos biomarcadores como el consumo de ATP, producción de lactato entre otros para determinar el estado de stemness de las células troncales incluyendo a las mitocondrias y su posible localización perinuclear.



Capítulo I

MARCO TEÓRICO

INGENIERÍA TISULAR

Antecedentes históricos

La regeneración artificial de tejidos, órganos o incluso organismos vivos más complejos fue a lo largo de la historia de la humanidad.

La ingeniería tisular y la medicina regenerativa, son términos para el campo de la biomedicina que tienen que ver con la transformación de estas ideas en los enfoques clínicos, para crear organismos más complejos a partir de piezas más simples.

Cada año, millones de personas sufren pérdida de tejidos u órganos por diversas causas externas o internas (accidentes, lesiones patológicas propias de enfermedades congénitas, enfermedades autoinmunes, cáncer, fallo de órganos en fase terminal etc.).

Los tratamientos vigentes se basan en el uso de prótesis, trasplante de órganos, aplicación de injertos, reconstrucción tisular con dispositivos mecánicos o por vía quirúrgica, con grandes ventajas y desventajas, por ejemplo; la reconstrucción quirúrgica puede dar lugar a problemas a largo plazo, los dispositivos mecánicos no pueden realizar todas las funciones de un solo órgano y por lo tanto no se puede evitar el deterioro progresivo del paciente.

Aunque estas terapias han salvado y mejorado innumerables vidas, siguen siendo soluciones insatisfactorias, el trasplante está severamente limitado por una escasez de donantes críticos, empeorando cada año. La lista de espera de un órgano va en aumento de acuerdo a los datos publicados por CENATRA [Tabla 1].



No. Personas en espera AÑO 2017	No. Personas en espera AÑO 2018	Órgano
13,928	15,350	Trasplante de Riñón
7,332	6,817	Trasplante de Córnea
369	392	Trasplante de Hígado
45	49	Trasplante de Corazón
12	15	Trasplante de Páncreas
1	2	Trasplante de Pulmón
9	8	Otros
21,695	22,633	Total

Tabla 1: Estadística de personas en espera de trasplante de órganos. CENATRA. (Centro Nacional de Trasplantes) 2019.

Triada de la Ingeniería Tisular

La IT nace como respuesta a los problemas que presentan las terapias de reparación y regeneración de tejidos u órganos utilizadas actualmente (S. Levenberg, R y Langer 2004).

La IT es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ciencia y de la ingeniería, para el desarrollo de sustitutos biológicos con el objetivo de restaurar, mantener o mejorar la función del tejido, en combinación con la triada de la ingeniería tisular (Bonassar, L. J., y Vacanti, C. 1998). La cual involucra una matriz tridimensional (andamios o *scaffolds*), factores o señales de crecimiento y células diferenciadas y/o troncales/madre [Fig. 1], estando en un ambiente físico-químico apropiado que permita el crecimiento y la regeneración del tejido u órgano.

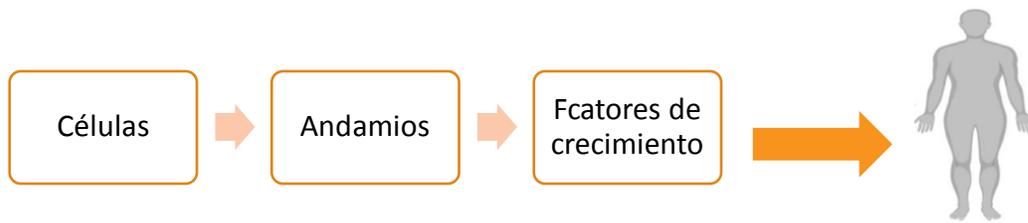


Figura 1: Triada de la ingeniería tisular (Bonassar, L. J., y Vacanti, C., 1998).

La ingeniería tisular requiere de una fuente de células capaces de diferenciarse en el tejido necesario a regenerar. Por lo tanto, las células troncales con su capacidad de auto-renovación, proliferación y diferenciación a múltiples linajes, crea una fuente de célula ideal para este tipo de reparación y/o sustitución de tejidos (B. Barrilleaux, et al. 2006).

Células troncales, Células madre o “Stem Cells”

En 1878 Friedenstein y su equipo de trabajo, fueron los primeros en aislar con éxito las células troncales mesenquimales de medula ósea (*BMMSCs, Bone Marrow Mesenchymal, Stem Cells*) y fueron descritas como células fibroblásticas, formadoras de colonias.

Según Ramalho M. y Willenbring H, el término “*stem cell*” fue introducido en la literatura científica por el Biólogo alemán Ernst Haeckel en 1868, quien empleó el término “*Stammzellen*” (*células troncales*), para describir a un organismo unicelular, del cual se originaban todos los organismos multicelulares, e igualmente para definir el huevo fertilizado que da origen a todas las células del organismo. Lo representó por medio de un árbol filogenético que simboliza la evolución que tienen los organismos por ser descendientes de ancestros comunes, nombrándolo “*Stammbäume*” (Higuera G. 2016).



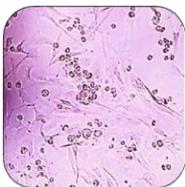
El término “*Stem Cells*” fue utilizado en 1892 por Theodor Boveri, para denominar un estadio intermedio entre el huevo fertilizado y las células germinales y por Valentín Häecker para definir una gran célula precursora que por división asimétrica originaba células mesodérmicas y células germinales. En 1990, Potten y Loeffler les dieron un nuevo concepto a las células troncales como: “Células indiferenciadas capaces de proliferar, con autosuficiencia, y con capacidad de producción de un gran número de progenies indiferenciadas y funcionales”. Posteriormente, en el año 1909 el concepto de las células troncales, se introdujo como una fuente de células de otros tipos celulares.

La denominación más popular es: “CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES”, (MSCs ,por sus siglas en inglés, *Mesenchymal Stem Cells*), es un término acuñado por Caplan en 1991.

En el siglo XX se iniciaron los primeros avances en el campo de las células troncales con la fecundación in vitro. Edwards en 1969 postuló su posible aplicación clínica y científica (M H Johnson, 2011).

DEFINICIÓN

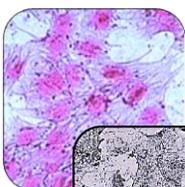
Las células troncales se definen como un grupo de células únicas, no especializadas con capacidad de proliferación y con potencial de diferenciación en uno o más tipos celulares (Bianco P. 2014).



CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN

Se especifica como la facultad que tiene una célula para dividirse y así dar lugar a células idénticas, manteniendo sus mismas características fenotípicas y así conservar una población de células troncales.

James Edgar Till y Ernest McCulloch, doctores canadienses, fueron los primeros en describir la existencia de células auto-renovables en médula ósea de ratón en 1963



CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN

Es la capacidad que tiene una célula para especializarse en otro(s) tipo(s) celular(es).





Criterios de la Sociedad de Terapia Celular para la identificación de células troncales.

De acuerdo a la Sociedad Internacional de la Terapia Celular en el 2006, Dominicci, estableció tres criterios mínimos para identificar a las células troncales. [Tabla 2]

1. Adhesión al plástico. (Las MSCs deben de ser adherentes al plástico en condiciones de cultivo estándar).
2. Expresión específica del antígeno de superficie (Ag). El 95% de la población de las MSCs debe expresar los siguientes marcadores de superficie: CD105, CD73 y CD90. Además, estas células deben carecer de expresión de CD45, CD34, CD14, CD79a o ser positivo del 2-5% de la población.
3. Potencial de diferenciación multipotente, (condrogénico, adipogénico, ontogénico), bajo condiciones estándar de diferenciación *in vitro*.

1) Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar		
2) Fenotipo	Positivo (> 95% +)	Negativo <2% +)
	CD105	CD34
	CD73	CD45
	CD90	CD14 ó CD11b
		CD79α o CD19
		HLA-DR
3) Diferenciación in vitro: Osteoblastos, adipocitos, condroblastos.		

Tabla 2: Resumen de criterios para identificar las MSCs.
 Fuente: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Dominicci M.et al., 2006.



"Stemness"

Todos los tejidos y órganos del cuerpo se organizan en torno a sus funciones celulares y microambientes donde las células troncales tienen un papel clave para la homeostasis tisular, a través de la división celular, proporcionando el mantenimiento de las funciones orgánicas y la sustitución de células muertas, al mismo tiempo las células troncales son capaces de auto-renovación con el fin de regular su número, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, con un grado de potencial para diferenciarse en múltiples tipos de progenie especializada. Tales capacidades comprenden el término "stemness" o troncalidad.

"Stemness, combina la capacidad que tiene una célula para conservar su condición de troncalidad, permitiendo su diferenciación a otros tipos celulares, manteniendo un equilibrio entre la quiescencia, la proliferación y la regeneración." (Aponte PM y Caicedo A, 2017.)

Clasificación de las células troncales

Durante el desarrollo humano, desde la embriogénesis hasta el estado adulto, se originan células troncales, que por convención se ubican en diferentes categorías [Fig. 2].

I) De acuerdo al estado de desarrollo del tejido del cual se originan. (Embrionarias o adultas).

II) De acuerdo a su potencialidad: Es la capacidad que tienen para diferenciarse en otros tipos celulares. (Totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes).

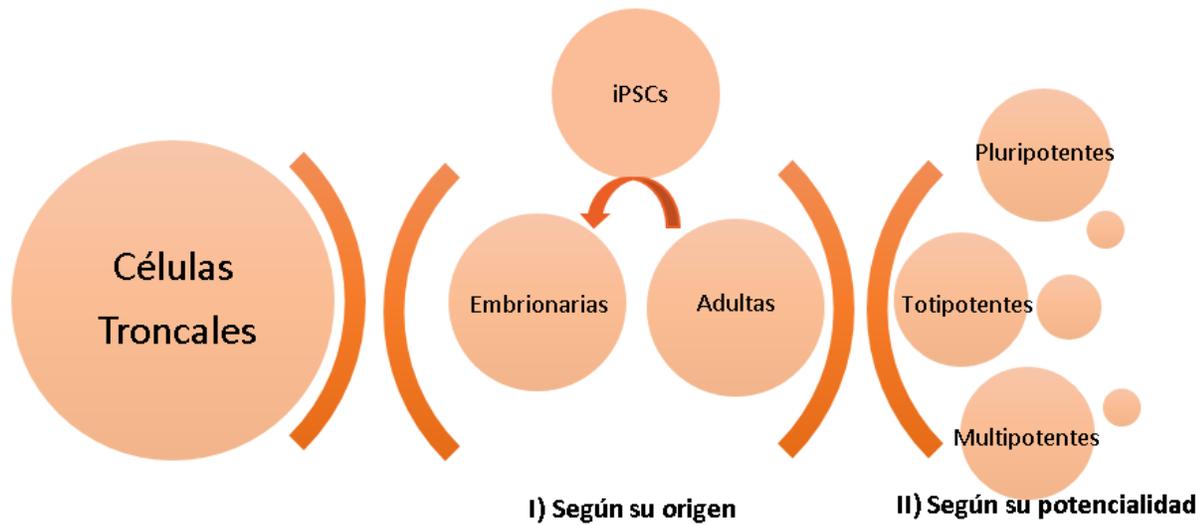


Figura 2: Clasificación de células troncales, según su origen y según su capacidad de potencialidad

Clasificación de las células troncales según su origen

Según su origen las células troncales pueden ser, células embrionarias o adultas.

- **Células Troncales embrionarias**

Las células embrionarias (Embryonic Stem Cell, ES)

La fuente de obtención por excelencia es el cigoto, producido por la fecundación del óvulo por un espermatozoide, dichas células dan origen a los tres líneas celulares del cuerpo: endodermo, mesodermo y ectodermo (Kobling M y Estrov Z., 2003), involucrando tejidos extraembrionarios, como cordón umbilical y placenta¹. Los marcadores específicos de las células troncales embrionarias son: ssea-3, ssea-4, oct-4 y nanog, se les denomina marcadores de pluripotencia.

¹ James Thomson, fué el primero en obtener células madre embrionarias humanas en el año 2006.



- **Células troncales adultas**

Son células indiferenciadas, que pueden renovarse constantemente y dar origen a células especializadas, dichas células residen en casi todos los tejidos del cuerpo humano. El tejido considerado como la mayor fuente de células troncales adultas es la medula Ósea.

- **iPSC**

Son células troncales pluripotentes inducidas por el hombre (*iPSCs por sus siglas en inglés induced pluripotent stem cells*), representan una plataforma *in vitro*, ideal para el estudio *in vitro* e *in vivo*, dejando a un lado las dificultades éticas o inmunológicas, que proveen las células embrionarias por naturaleza.

Las iPSCs se generan a través de la reprogramación genética de células somáticas adultas a embrionarias, presentando propiedades morfológicas a las ESC, con capacidad de proliferación y diferenciación a todos los tipos celulares. El método de inducción de estas células fue descrito por primera vez por In-Hyun-Park et al., en el 2008.

Clasificación según su potencialidad

- **Células Troncales Totipotentes** (*Toti*, del latín *totus* "totalmente")

Son aquellas células que tienen el potencial genético para formar un ser completo, incluyendo los tejidos extra-embrionarios (placenta y/o cordón umbilical), con la capacidad de especializarse en cualquiera de las tres capas embrionarias. Diversos autores consideran que la única célula totipotente es el cigoto (Sell S, 2004).

- **Células Pluripotentes** (del latín *plurimus*, "muchos")

Tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula de las tres capas embrionarias, sin formar un organismo completo (Mitalipov S y Wolf D, 2009).



- **Células troncales Multipotentes**

Son aquellas células que sólo pueden generar células de su propia capa embrionaria de origen. Estas células tienen el potencial de dar lugar a múltiples linajes celulares, que constituyen la línea germinal de la cual derivan.

En este grupo de células, se incluyen células progenitoras, tales como: células troncales hematopoyéticas (*hematopoietic stem cells*, HSCs) y mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells, MSCs), derivadas del mesodermo y son responsables de dar origen a los distintos tipos de células como miocitos, adipocitos u osteocitos.

Células troncales mesenquimales

Las MSCs son células multipotentes capaces de dar origen a células derivadas del mesodermo. Caplan AI y Pittenger MF en 1991 y 1999, demostraron que las MSCs tienen propiedades osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas.

En la actualidad se sabe que el mayor reservorio de células troncales mesénquimales se encuentra en el estroma de médula ósea (Friedenstein AJ et al. 1978), también se han obtenido de periostio, músculo, pulpa dental (Gronthos S et al. 2000), ligamento periodontal, (Seo BM y Miura M. 2004) membrana sinovial (De Bari C et al. 2001), dermis (Young HE y Steele TA, 2001), grasa (Zuk PA et al. 2002), dientes deciduos (Miura M et al. 2003), hueso trabecular (Tuli R et al. 2003), folículo dental (Morszeck C et al. 2005), papila apical (Sonoyama W. et al. 2008), etc.

Los marcadores de superficie más comunes para las MSCs son: CD105, CD73, CD 29, CD 90, SH3, SH4, CD44 y Stro-1 (Gronthos S et al. 1995); aunque ninguno de estos marcadores es específico de células troncales mesénquimales (Shanti RM y et al. 2007).



MSCs a partir de tejidos dentales

Los dientes son órganos ectomesenquimales, que continúan desarrollándose después del nacimiento y se clasifican en dos tipos de denticiones: la primera dentición y la segunda dentición.

- **Dentición primaria:** Inicia a los 6 meses de edad con la erupción de los incisivos inferiores y culmina a los 12 años de edad con la exfoliación de los caninos superiores.

Esta dentición corresponde a los dientes temporales, dichos dientes solo están por un tiempo determinado en la vida del ser humano. Comúnmente a este tipo de dientes se les conoce como “dientes de leche”, por el color más blanco que tienen las coronas de los dientes y por la base de la alimentación de los bebés, que es la leche.

La dentición la conforma 20 dientes (8 incisivos, 4 caninos y 8 molares). A partir de los 6 años de edad, dichos dientes comienzan a exfoliar para dar lugar a los dientes permanentes. [Fig.3]

- **Segunda dentición:** Dientes permanentes, es la dentición definitiva está constituida de 32 órganos dentales, 8 son incisivos, 4 caninos, 8 premolares y 12 molares, dentro del grupo de los molares se encuentran las “muelas del juicio” (terceros molares). En muchos casos dichas muelas no llegan a erupcionar, estos dientes regularmente son extraídos en clínicas dentales con fines ortodónticos. [Fig. 3]

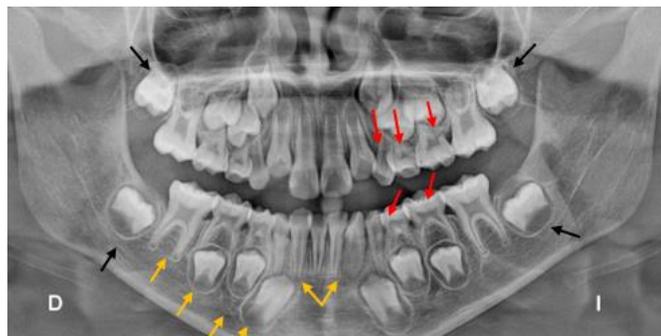


Figura 3: Radiografía de dentición mixta: dientes temporales (flechas rojas) y dientes permanentes (flechas amarillas), terceros molares (flechas negras).



Actualmente las hDPSCs (Células troncales de pulpa dental) se obtienen principalmente de los terceros molares. Estudios previos demuestran que los tejidos que son más jóvenes y están en una etapa más temprana de desarrollo son considerados como un recurso ideal de células troncales para la IT. (Mohammad A et al et al. 2014; Seo MB y Miura M., 2004, y Horwits EM, et al. 2001).



Figura 4: A) **Diente temporal** (Canino superior derecho), B) **Diente exfoliado** (Incisivo central superior derecho), C) **Diente permanente** (Tercer molar inferior izquierdo).

Los tejidos dentales proporcionan una fuente alternativa de células troncales, en comparación con la médula ósea considerada como el “gold estándar” de las MSCs.

Una de las ventajas que tienen las MSCs de origen dental es, su fácil obtención a través de la extracción dental con un anestésico local o cuando un diente temporal es exfoliado (diente de leche). Las células troncales orales de acuerdo a su origen ectomesenquimal pueden mostrar características del mesodermo y ectodermo (Huang G.T.-J et al. 2009).



Hay reportes de seis tipos de células troncales aisladas a partir de la cavidad oral, que han sido arduamente descritos en la literatura, y dos más, poco investigadas y publicadas, (ligamento periodontal de dientes temporales y pulpa dental de dientes temporales).

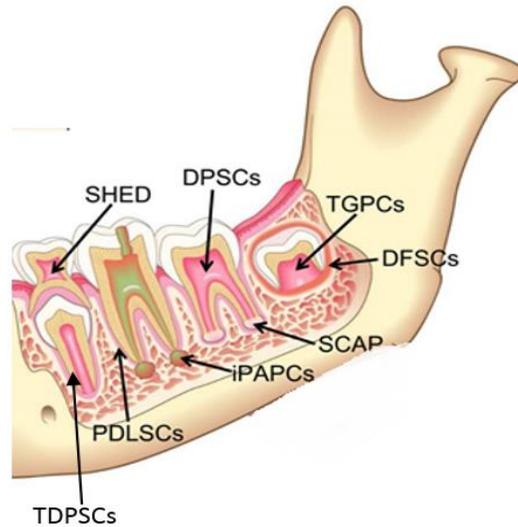


Figura 5: Representación de las diversas fuentes de células troncales de tejidos orales.

Fuente: Treatment options: Biological basis of regenerative endodontic procedures.
Kennet M. Hargreaves. 2013.

1. **Células troncales de pulpa dental (Gronthos et al. 2000)**
(DPSCs, Dental Pulp Stem Cells.)
2. **Células troncales de dientes deciduos exfoliados (Miura M et al. 2003)**
(SHEDs, Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth.)
3. **Células troncales de ligamento periodontal (Seo BM y Miura M, 2004)**
(PDLSCs, Periodontal Ligament Stem Cells.)
4. **Células troncales de folículo dental (Morsczeck et al. 2005)**
(DFSCs, Dental Follicle Stem Cells)
5. **Células troncales de papila apical (Sonoyama W et, al, 2006)**
(SCAPs, Stem Cells of the Apical Papilla)
6. **Células troncales de mucosa retromolar. (Zhang Q. 2009)**
(GMSCs, Gingival-Derived Mesenchymal Stem Cells.)
7. **Células troncales de ligamento periodontal de dientes deciduos (Fukushima H y Kawanabe N. 2012)**
(D-PDL, Deciduos Periodontal Ligamen Stem Cells.)



Células troncales de pulpa dental

Dental Pulp Stem Cells (DPSCs)

La pulpa dental es un tejido blando de origen ectomesenquimal, que se desarrolla a partir de la papila dental, su función principal es dar nutrición al diente.

Fueron las primeras células troncales dentales en ser aisladas, a partir de la pulpa de terceros molares humanos por Gronthos en el 2000.

Se describen con capacidad clonogénica, diferenciándose *in vitro* en osteoblastos, miocitos, adipocitos, condrocitos y odontoblastos (Zhang W et al. 2006), con el potencial de formar el complejo dentino-pulpar *in vivo* en ratas inmunocomprometidas (Gronthos S et al. 2000).

Células troncales de dientes deciduos exfoliados

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs)

Las SHEDs se encuentran en el tejido pulpar de los dientes deciduos exfoliados. Las primeras células aisladas fueron por Miura en el 2003 (Miura M et al. 2003) a partir de la pulpa remanente de la corona dental de incisivos de niños de 7-8 años de edad.

Al igual que en hDPSCs, las SHEDs cumplen con los criterios que definen a una población de células, como MSCs. Son altamente proliferativas, con capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células *in vitro*, expresando marcadores pluripotenciales como: Oct-4, Nanog.

Las SHEDs se han caracterizado mediante FACS con marcadores de superficie celular, siendo positivos para CD13, CD29, CD31, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, y STRO-1 y negativos para CD14, CD34 o CD45 (Wang J. et al, 2010; Shi S, et al, 2005).



MITOCONDRIAS EN CÉLULAS TRONCALES

Antecedentes de las mitocondrias

El primero en describir las mitocondrias fue R. Atman en 1884; las identificó como estructuras intracelulares a las que llamo mioblastos. Años después, Carl Benda denominó a esas estructuras "mitocondrias", del griego, "mitos" que significa *hilo* y "chondros" *granulo*, en 1898.

Las mitocondrias son orgánulos de origen bacteriano endosimbiótico presentes en todas las células eucariotas. Juegan un papel importante en muchas de las funciones celulares, incluyendo la biosíntesis de pirimidina, la homeostasis de iones, oxidación de ácidos grasos, apoptosis y la señalización celular (Kasturi Mitra et al. 2011). Una de las funciones clave de las mitocondrias es la generación de adenosin trifosfato (ATP) en el punto final de la fosforilación oxidativa (Andrew B.J. 2012), principal fuente de energía de la célula.

Las mitocondrias son también las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son subproductos de la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, el número de mitocondrias varía de acuerdo a las necesidades de la célula.

Las propiedades mitocondriales en las células troncales no han sido del todo descritas, informes indican que tienen un papel clave que un se desconoce durante la fertilización al agruparse alrededor de los núcleo. Este agrupamiento es esencial para el desarrollo embrionario. Las células troncales embrionarias se derivan de los ovocitos fertilizados y eventualmente pueden diferenciarse en células troncales 'adultas'. Planeándose como hipótesis en estudios anteriores que el agrupamiento perinuclear mitocondrial persiste en el estado de stemnes de las células troncales embrionarias y adultas. (Bavister BD et.al., 2006, Bavister BD et al.,2005)



Estudios recientes han demostrado que la dinámica y la morfología mitocondrial son cruciales para el mantenimiento de la homeostasis tisular, regulando el estado de *stemness*, la proliferación y la diferenciación, en las células troncales, presentando variaciones en abundancia, morfología y fisiología celular (Forni FM et al. 2016; Collu-Marchese et al. 2015; Zhang et al. 2013).

Las mitocondrias en las células troncales han sido descritas con una estructura inmadura de forma esférica y con crestas poco desarrolladas, localizadas predominantemente en la región perinuclear, con un número bajo de copias de ADN mitocondrial, (Forni MF et al. 2016, Lambertini et al. 2015; Quinn KP et al. 2013; Hofmann AD et al. 2012; Prigioni A et al. 2010; Lonergan T et al. 2006).

Se han descrito las mitocondrias en células troncales de:

- Medula ósea de mono (A. Ozen, et al. 2003).
- Células troncales embrionarias humana (Andrew B. J. et al.,2012, Piccoli C, et al. 2010 y St. John et al. 2005)
- Medula ósea de caballo (Piccoli C et al. 2005).
- Tejido adiposo de mono (Lonergan T, et al.2006) (Lonergan T et al. 2007)
- hESCs y iPSCs (Prigione A 2010)
- Tejido adiposo humano (Buravkov SV et al. 2013)
- Placenta humana (Solís MA et al. 2016)



Mitocondrias en hESCs (St. John et al. 2005)

El estudio de St, John en el 2005 se basó en el análisis de mitocondrias en células embrionarias humanas a través de TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión), en los pases celulares 50-60 encontró una diferenciación espontánea a cardiomiocitos. Identificando pocas mitocondrias en células indiferenciadas y localizándose en pequeños grupos perinucleares, [Fig. 6].

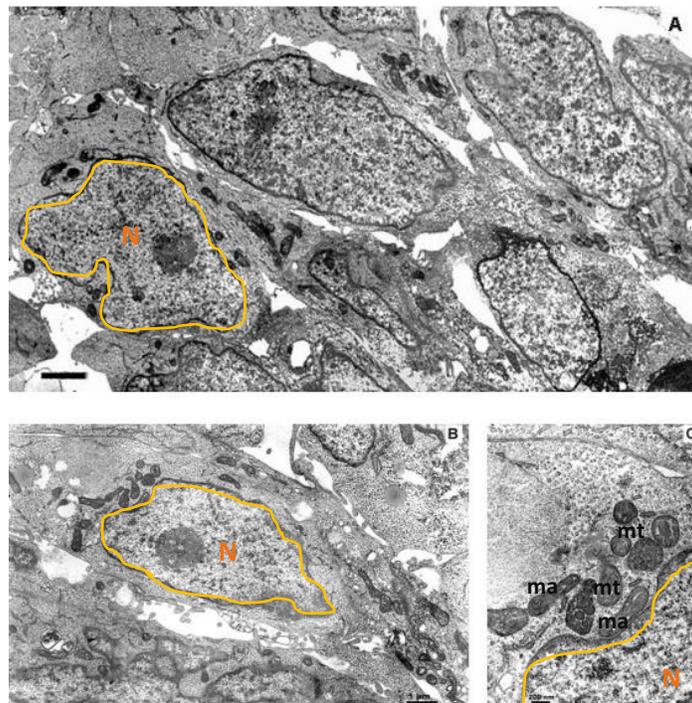


Figura 6: Microscopía electrónica de trasmisión (TEM). A) Colonia celular de hESCs con núcleo prominente (2 μm). B) Células individuales con núcleos grandes, nucleolos reticulados y cúmulos de mitocondrias (1 μm). C) Mitocondrias en las hESC que muestra un grupo perinuclear que contiene tanto mitocondrias alargadas (ma) como tubulares (mt), (200nm).
Fuente: "The Expression of Mitochondrial DNA Transcription Factors during Early Cardiomyocyte In Vitro Differentiation from Human Embryonic Stem Cells" St. Jhon et, al., 2005.



Mitocondrias en ESCs de ratón

Andrew B. J. y su equipo en el 2012 analizaron la localización de las mitocondrias durante la diferenciación a linaje neural y linaje cardiaco de las ESCs de ratón en el pase número 7.

Sus resultados son los siguientes: Las ESC expresaron Oct-4 (un marcador de pluripotencia). Las mitocondrias antes de la diferenciación estaban estrechamente localizadas en la periferia del núcleo en racimos densos. [Fig.7].

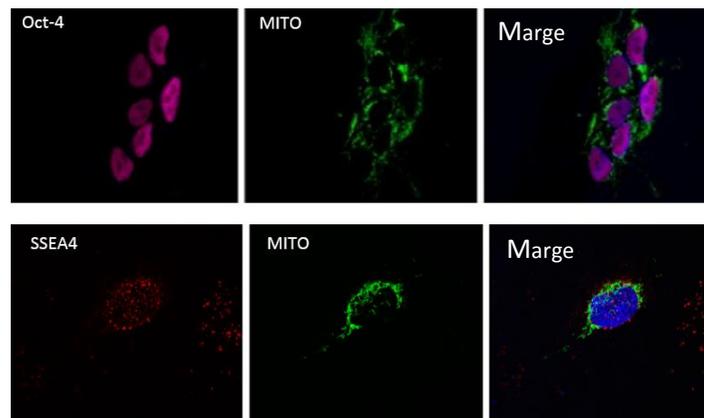


Figura 7: ESC antes de la diferenciación, expresaron marcadores de plupotencia (Oct-4 y SSEA4). Las mitocondrias fueron teñidas por mitotracker Green e identificadas alrededor del núcleo, teñido por DAPI.

Imagen modificada y tomada de: "Analysis of Mitochondrial Function and Localisation during Human Embryonic Stem Cell Differentiation In Vitro", Andrew B. J. et.al., 2012.



En la diferenciación neural, las mitocondrias en las células positivas para nestina se distribuían por toda la célula, en patrones granulares y parecidos a hilos [Fig.17]. Las células positivas para β -III-tubulina se identificaron cúmulo mitocondriales en las dendríticas [Fig.8].

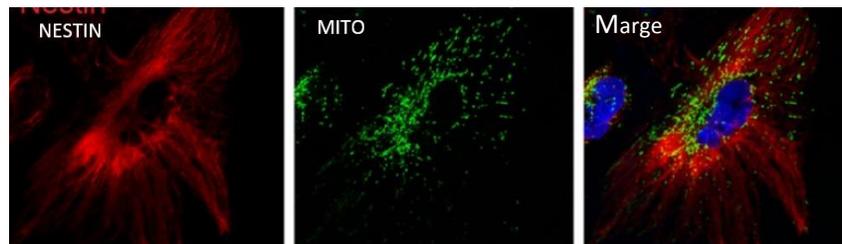


Figura 8: Células ESC diferenciadas a linaje neurogénico, teñidas con nestin, (marcador de células neurales). Las mitocondrias fueron teñidas con mitoTracker Green y el núcleo con DAPI.

Imagen modificada y tomada de: "Analysis of Mitochondrial Function and Localisation during Human Embryonic Stem Cell Differentiation In Vitro", Andrew B. J. et.al., 2012.

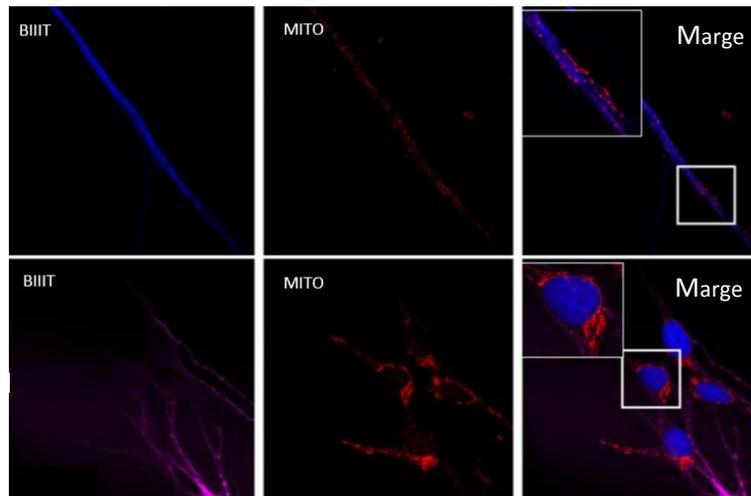


Figura 9: Las células ESC diferenciadas a linaje neurogénico, teñidas con β -III-tubulina (marcador de células neurales). Las mitocondrias fueron teñidas por mitotracker Deep Fm y contra-teñidas por DAPI.

Imagen modificada y tomada de: "Analysis of Mitochondrial Function and Localisation during Human Embryonic Stem Cell Differentiation In Vitro", Andrew B. J. et.al., 2012.



Por otro lado, las células positivas para MIXL (marcador de mesodermo cardiogénico), se tiñeron las mitocondrias con Mito-tracker Deep Red después de los 3 días de diferenciación [Fig. 10].



Figura 10: La localización mitocondrial en células MIXL1 positivas es similar a hESC indiferenciada con mitocondrias densamente localizadas en la periferia nuclear.

Imagen modificada y tomada de: "Analysis of Mitochondrial Function and Localisation during Human Embryonic Stem Cell Differentiation In Vitro", Andrew B. J. et.al., 2012.

Mitocondrias en células troncales de tejido adiposo de mono (Lonergan T, et al. 2007 y Lonergan T, et al. 2006)

El equipo de Lonergan fue el primero en proponer las características mitocondriales como una forma adicional y confiable de verificar la troncalidad de las células troncales.

En el 2006, el equipo de Lonergan aislaron MSCs de monos Rhesus, demostrando su multipotencialidad a adipocitos, condrocitos, y osteocitos. En el 2007 reportaron que varias propiedades mitocondriales cambian con el aumento en el número de pases celulares en cultivo (P11 y P17) con el fin de analizar la diferenciación espontánea y la ubicación de las mitocondrias. Sus resultados son los siguientes:

En el P11 las MSCs se caracterizaron por:

- Un porcentaje mucho más alto de células en el pase 17 (85% vs.18%) en comparación en el pase 11.
- Una disposición perinuclear de mitocondrias (57% vs. 1%), con un agregado mitocondrial, en la que las mitocondrias parecen fusionarse en grandes grupos.



- c. Un porcentaje mucho más bajo de células con gotas de lípidos (1% frente a 36%), lo que sugiere una menor diferenciación en adipocitos.
- d. Un contenido de ATP de 5-6 veces menor (0,45 vs.2.51 pmoles de ATP / célula).

La posición celular y la densidad de las mitocondrias fue medido por microscopía de fluorescencia usando Mitotracker Green FM [Fig. 11] en los pases 11,14 y 17.

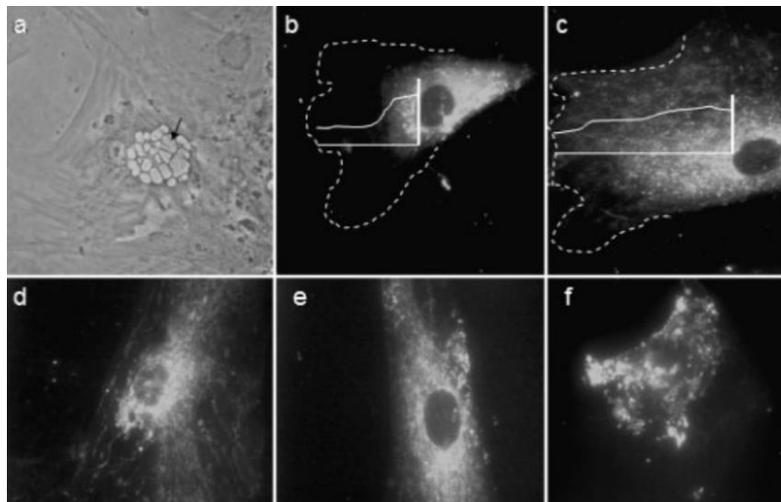


Figura 11: Mitocondrias en células mesenquimales de mono Rhesus de tejido adiposo. Confocal-mitotracker.

Fuente: "Mitochondria in stem cells", T, Lonergan et., al, 2006

1. Imágenes de células troncales adiposas de Rhesus adultas. A) Microscopio de contraste de fase imagen (400). Célula troncal en un P14 con presencia de numerosas gotas de lípidos (flecha), indicando una diferenciación espontánea. B) Medición de la intensidad de fluorescencia de Mitotracker en el P11. Célula con una disposición mitocondrial perinuclear (600). La célula está delineada por la periferia (línea punteada). Células con disposición perinuclear de las mitocondrias, tiene una alta intensidad de fluorescencia cerca del núcleo. C) Célula con una distribución homogénea de mitocondrias (P14), la intensidad de fluorescencia es relativamente a lo largo del citoplasma (gráfico insertado). D) Imagen en el P11 con disposición mitocondrial perinuclear (600). E) imagen en el P14 con disposición mitocondrial homogénea (600). F) imagen en el P17 con disposición mitocondrial agregada (600).



Estos resultados representan la primera caracterización de las propiedades mitocondriales reportadas, para una línea de células troncales de primates. Siendo así la disposición perinuclear de las mitocondrias en las células troncales puede ser un rasgo característico del estado de “stemness”.

Mitocondrias en hESCs y iPSCs Prigione A (2010).

Se ha publicado que las mitocondrias se agrupan principalmente alrededor del núcleo en las células indiferenciadas, mientras que se distribuyen de manera más uniforme por el citoplasma de las células diferenciadas o durante la diferenciación celular (Hofmann AD et al. 2012; Quinn KP et al. 2013,(Forni MF et al. 2016; Lambertini et al.2015). (Fig.12)

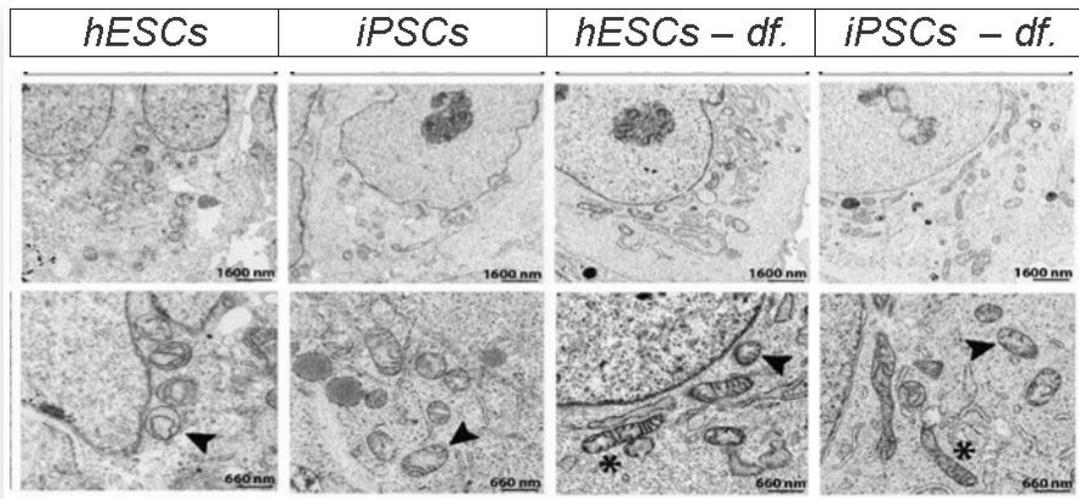


Figura 12: Morfología y distribución mitocondrial en células troncales embrionarias humanas y células troncales pluripotentes inducidas. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó para investigar las características en células diferenciadas y no diferenciadas. Los asteriscos muestran las mitocondrias con morfología tubular alargado; las flechas indican las mitocondrias de forma redonda con crestas poco desarrolladas. Cincuenta mitocondrias fueron contadas en las hESC y iPSCs no diferenciadas. Algunos orgánulos con forma redonda y con crestas inmaduras persistieron en tanto iPSCs y en las hESCs diferenciadas.

Fuente: The Senescence-Related Mitochondrial/Oxidative Stress Pathway is Repressed in Human Induced Pluripotent Stem Cells. Prigione A (2010).



La localización perinuclear de las mitocondrias no es exclusiva de las células troncales, también se ha informado que dicha disposición mitocondrial se encuentra en células diferenciadas incluyendo: fibroblastos [Fig.22], células acinares pancreáticas [Fig.13], astrocitos y neuronas (Yaffe MP et al. 1999). Las mitocondrias de las células diferenciadas son de forma alargada y con crestas desarrolladas. (Varum S, et al. 2011).

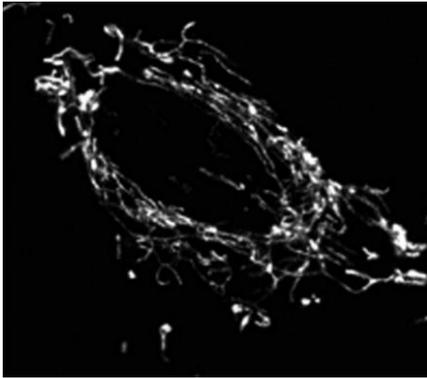


Figura 13: Mitocondria en fibroblastos.
Microscopía confocal

“Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches” Mitra k, et al.,2011.



Capítulo II

JUSTIFICACIÓN

Las células troncales tienen potencial para numerosas aplicaciones biomédicas, incluido el reemplazo terapéutico de células para la regeneración de órganos dañados, a partir de biomateriales en combinación con factores de crecimiento.

Los científicos necesitan tener un conocimiento preciso de las propiedades básicas de las células troncales como su viabilidad, proliferación y la capacidad de diferenciarse, evitando perder su progenie durante el cultivo celular.

Actualmente se discute el estado actual de las propiedades de las mitocondrias en las células troncales de tejidos dentales, los temas incluyen patrones de localización mitocondrial, consumo de oxígeno y contenido de ATP, relacionado con el mantenimiento de "stemness" y la posterior diferenciación de las células troncales en células especializadas.

También se cuestiona la importancia de la disposición perinuclear de las mitocondrias, como un posible indicador de troncalidad. Numerosos estudios *in vitro* han utilizado microscopía electrónica y fluorescente, demostrando que la ubicación alrededor del núcleo de las mitocondrias en las células troncales embrionarias y adultas de mono y humano, son una característica de una stem cell. (Lonergan T et al., 2007, Folmes et al, 2012, Rafalski, et al.,2012).

En el presente estudio se ha analizado la viabilidad, la actividad metabólica y el fenotipo de las SHEDs en comparación con las hDPSCs que han sido consideradas como el estándar de las células troncales orales en la ingeniería tisular y medicina traslacional; a través de la expresión de marcadores específicos para células troncales y la presencia de mitocondrias en las hDPSCs y SHEDS.



Capítulo III

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Diferentes investigaciones han reportado mitocondrias alrededor del núcleo en células troncales embrionarias, iPSCs y de tejido adiposo.

En ese sentido, **¿Será posible la estandarización de la técnica de tinción de las mitocondrias, en células troncales de pulpa dental humano, una alternativa en la evaluación de la troncalidad de las células de pulpa dental?**



Capítulo IV

HIPÓTESIS

Si se logra la tinción de las mitocondrias a través de Mitotracker Red Deep Fm en células troncales de pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales, entonces se podrá establecer la tinción de mitocondrias como una alternativa para la evaluación de la troncalidad.

Capítulo V

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la tinción y la detección de mitocondrias en células troncales de pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener tejidos pulpares de terceros molares y de dientes temporales.
- Cultivar células de pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales obtenidas mediante digestión enzimática.
- Purificación de células troncales de pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales mediante MACS.
- Caracterizar por medio de marcadores de superficie, el fenotipo de las células troncales de pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales, por microscopia de fluorescencia con anti-humano CD44 y anti-humano STRO-1.



- Teñir las mitocondrias en células troncales de pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales por medio del ensayo de Mitotracker Deep Red FM.
- Detectar las mitocondrias en células troncales de pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales a través de microscopía confocal.



Capítulo VI

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA

Los siguientes ensayos se realizaron en el Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional FESI -UNAM, Clínica Odontológica Cuauhtepc FESI-UNAM, UBIMED-FESI-UNAM, CINVESTAV, con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI-UNAM) con el número CE/FESI/042017/1163.

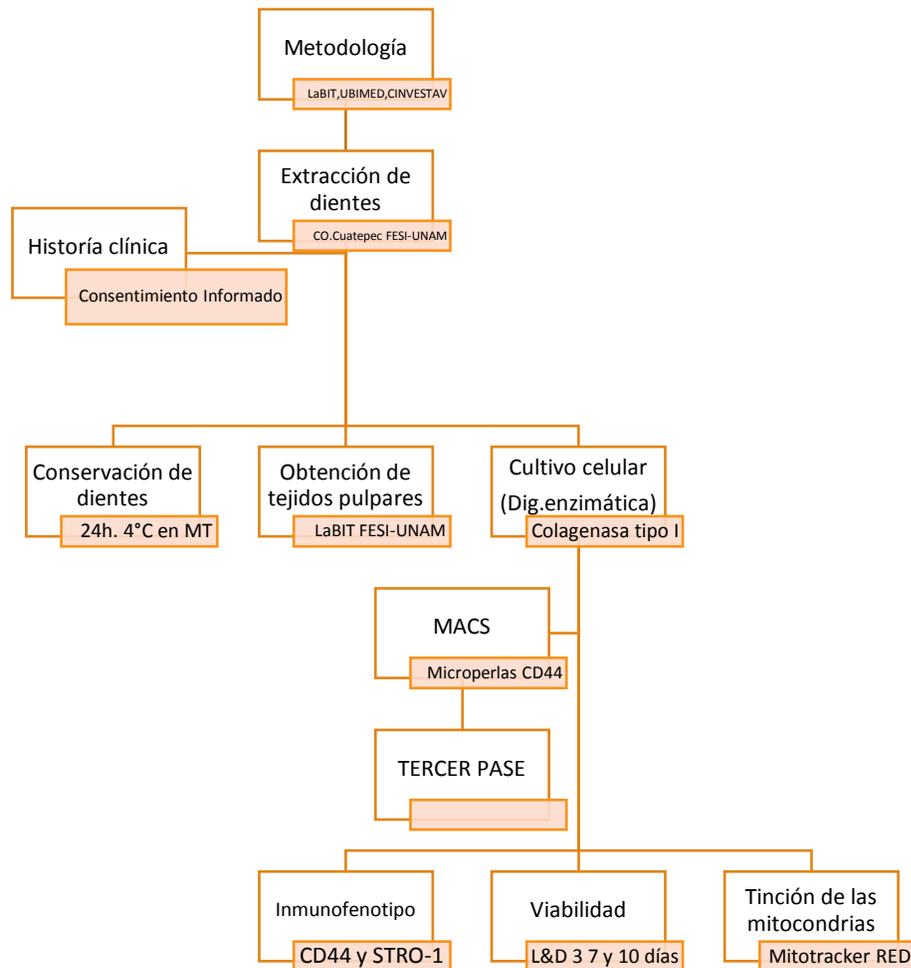


Figura 15: Resumen de la metodología



Universo de estudio.

El estudio se realizó en cultivos de células troncales de pulpa dental de terceros molares de sujetos entre 15-18 años de edad y pulpa dental de dientes temporales de sujetos entre 6-9 años de edad.

Criterios de selección

1) Criterios de inclusión

- Sujetos de 15 - 18 años de edad y 6 - 9 años de edad.
- Sujetos sanos sin historial de enfermedades crónicas, degenerativas o sistémicas (Información recabada en la historia clínica).
- Sujetos con buena salud bucal-dental (ausencia de neoplasias, gingivitis, enfermedad periodontal, caries, candida albicans etc.).
- Terceros molares (superiores, inferiores, izquierdos y/o derechos).
- Terceros molares incluidos.
- Dientes temporales persistentes.
- Dientes temporales con movilidad.
- Dientes temporales y/o terceros molares sin restauraciones.
- Dientes temporales y/o terceros molares sin tratamiento de conductos pulpares.
- Dientes temporales y/o terceros molares sin trauma.

2) Criterios de exclusión

- Sujetos menores de 15 años y mayores de 18 años de edad
- Sujetos menores de 6 años y mayores de 9 años de edad.
- Sujetos con enfermedades crónicas, degenerativas y/o sistémicas.
- Sujetos con mala salud buco-dental (neoplasias, gingivitis, enfermedad periodontal, caries, candida albicans etc.).
- Terceros molares impactados.
- Terceros molares erupcionados.
- Terceros molares con odontosección.



- Dientes temporales y/o terceros molares con restauraciones.
- Dientes temporales y/o terceros molares con tratamiento de conductos pulpares.
- Dientes temporales y/o terceros molares con trauma.

3) Criterios de eliminación

- Células en cultivo que presenten contaminación
- Células no troncales



DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

1) EXTRACCIÓN DE DENTAL

Cirugía dental

Las extracciones de los terceros molares y de los dientes temporales se llevaron a cabo en la Clínica Odontológica Cuauhtepac de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La extracción dental es un procedimiento que incorpora la aplicación correcta de principios quirúrgicos, físicos y mecánicos para lograr la remoción de un diente. Petterson L. 1988.

Cirugía de terceros molares

La exodoncia quirúrgica se basa en la preparación de un colgajo mucoperiostico que dé acceso al hueso alveolar con el fin de realizar una osteotomía del hueso cortical y así realizar la extracción dental terminando con la reposición de la mucosa y tejido gingival mediante sutura. Cosme Gay Escode, 2013.

Las extracciones de los terceros molares se realizó con el siguiente protocolo:

- I. Historia Clínica
- II. Consentimiento informado
- III. Anestesia. Lidocaína y epinefrina 1:12000U, son los anestésicos utilizados para bloquear el nervio alveolar o mandibular (dentario inferior) o nervio maxilar, según sea el caso.
- IV. Disección del colgajo: Con el periostótomo (Hu-Friedy) se levantó el colgajo mucoperiostico en toda su extensión del hueso, procurando no desgarrar ni traumatizar los tejidos blandos,
- V. Osteotomía: La realización de la osteotomía o eliminación de hueso alveolar se efectuó con fresas redondas de # 8 de carburo de tungsteno (SS WHITE) montadas en pieza de mano de baja velocidad (Midwest), bajo una irrigación



constante de suero fisiológico (PiSA) al fin de evitar el sobrecalentamiento dental.

- VI. Luxación: Es la pérdida de continuidad de la gonfosis rompiendo las fibras periodontales que componen al ligamento periodontal, esto se consiguió a través de elevadores cortos y rectos (Hu-Friedy) con movimiento suaves evitando fracturar el diente.
- VII. Extracción: El diente se desplazó por completo fuera de su alveolo con un fórceps dental recto (Hu-Friedy)



Figura 15: Cirugía de terceros molares en Clínica Odontológica Cuauhtepc FESI-UNAM.



Figura 16: La flecha, señala el tercer molar extraído.

- VIII. Tratamiento del área de la intervención quirúrgica. Se prosiguió con el control de la hemorragia, la resección de tejidos blandos traumatizado, la eliminación de los trozos de hueso fracturados, a través de irrigación con suero fisiológico (PiSA).
- IX. Sutura: La reposición de los tejidos blandos se llevó a cabo con puntos de sutura 000 (Vicryl). A la semana siguiente se retiraron los puntos.



2) Conservación de los dientes.

Los dientes se colocaron en un medio de transporte (MT) para su traslado al laboratorio ya que requieren de un medio húmedo con el fin de preservar las propiedades biológicas y evitar la contaminación, dicho medio de transporte debe de incluir suero fisiológico (PiSA) complementado con antibióticos al 1% (penicilina, anfotericina B, estreptomina). Los dientes se conservaron durante 24 horas a 4°C.²

- I) Los dientes se lavaron tres veces con medio de transporte con el fin de eliminar la mayor cantidad de sangre y otros desechos biológicos.

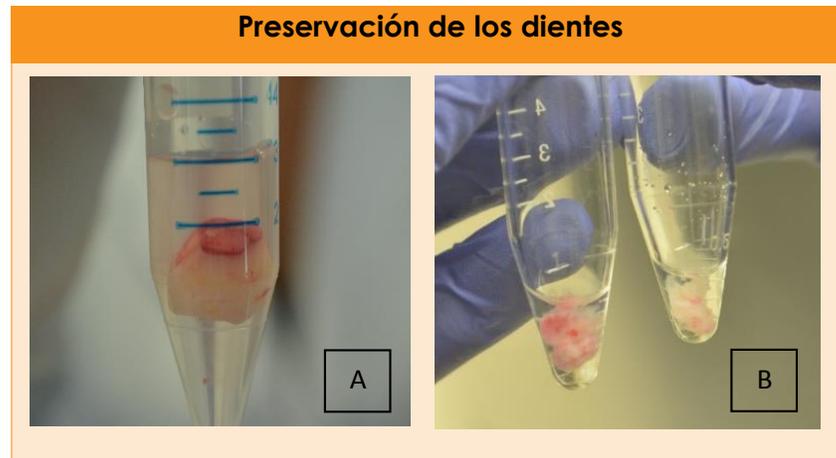


Figura 17: A) Tercer molar en medio de transporte a 4°C, B) pulpa dental en medio de transporte a 4°C.

3) Cultivo celular

Para determinar la existencia de células troncales en los tejidos pulpares de terceros molares y en dientes temporales, la selección de los dientes para su cultivo se hizo de acuerdo con los criterios establecidos por Hosseini en el 2010, señalando que el donante ideal, no debe referir consumo de alcohol, drogas y/o cigarrillo con lo que se asegura una mayor tasa de éxito al aislar hDPSCs, debido a que la

² En la literatura científica se ha reportado la existencia de células troncales en pulpa dental conservadas después de 120 horas de su extracción, por lo tanto el cultivo inmediato a la extracción del diente no es absolutamente necesario para tener éxito (Perry BC, et al. 2008, Huang A et al. 2009, Sato M et al. 2014)



citotoxicidad de la nicotina inhibe los procesos de mineralización de las células pulpares. El protocolo para el cultivo de células mesenquimales se basa en la capacidad que tienen las células troncales en adherirse al plástico y formar unidades formadoras de colonias. La pulpa dental se obtuvo a partir de 5 dientes temporales y 5 terceros molares.

Protocolo de cultivo celular

- I. **Obtención de la pulpa dental.** Para este estudio se realizó un surco transversalmente, en la zona amelo-cementaria de los dientes con un disco de carburo y un micromotor dental (MDC dental III) sin tocar la pulpa dental, irrigando simultáneamente con solución salina para evitar el sobre calentamiento [Fig. 17]; en el caso de terceros molares inmaduros la extracción de la pulpa dental fue a través del foramen apical, aislando: pulpa dental, papila apical y en algunos casos folículo dental (Suchanek J. et al.2009).

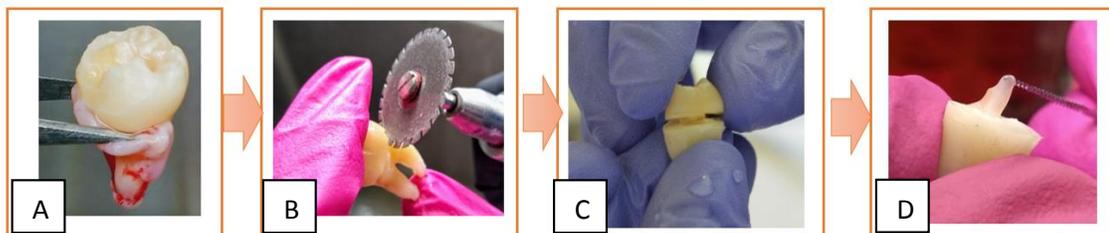


Figura 17: Resumen de metodología de obtención de pulpa dental

A) Tercer molar extraído; B y C)) Segmentación del órgano dental a nivel amelo-cementaria con un disco de carburo; D) exposición de la pulpa dental.



II. Cultivo celular

Los métodos de aislamiento de las hDPSCs y de las SHEDs son técnicas rápidas, sencillas y no invasivas.

Existen dos métodos básicos para cultivar hDPSCs y SHEDs del tejido pulpar: 1) Digestión enzimática del tejido y 2) Crecimiento de explante del tejido (Zhang X et al. 2017; Hilkens P et al., 2013; Bernardi L. et al., 2011). Aunque ambos métodos parecen dar lugar a células de pulpa con propiedades de células troncales (Gronthos et al. 2000), los resultados de ambos métodos de cultivo han sido cuestionados, Bakopoulou A et al. en el 2011, demostró que las células obtenidas enzimáticamente presentan una mayor producción de matriz mineralizada y una tasa de mineralización superior en comparación con las muestras obtenidas por el método de crecimiento por explante. Por el contrario, Spath et al. en el 2012 reveló que el potencial de diferenciación condrogénico y adipogénico por explante de pulpa dental fueron mejores que por digestión enzimática. Las diferencias para los métodos de digestión enzimática y de crecimiento por explante están en el número de células, su homogeneidad y el tiempo de obtención. Karamzadeh R et al. 2012 publica que las diferentes condiciones de cultivo de hDPSCs pueden alterar la capacidad de diferenciación, debido a la existencia de diferentes poblaciones celulares en el tejido de la pulpa. (Karamzadeh R., et al. 2012), Por lo tanto, la selección de los métodos de aislamiento podría ser útil para la reparación y la regeneración de tejidos específicos para futuros enfoques clínicos.

El cultivo por digestión enzimática, se considera el método más común para adquirir células troncales de pulpa dental (Nang Zhang et al. 2017, Bernardi L. et al. 2011; Arora V et al, 2009, Sun HH et al. 2014; Tran H.L et al. 2015; Gronthos et al. 2000)

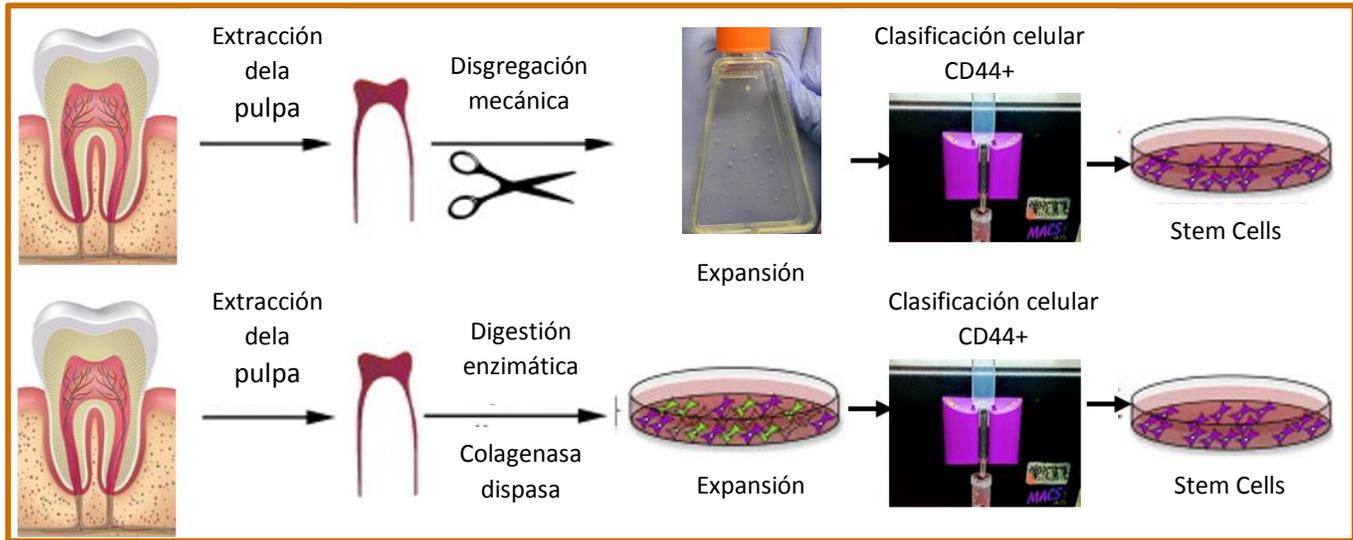


Figura 18: Técnicas de cultivo celular

A) Cultivo celular por explante, B) Cultivo celular por digestión enzimática.

Cultivo celular por digestión enzimática. Existen diferentes combinaciones enzimáticas con las que se ha logrado aislar DPSCs reportado en la literatura:

- 0,8 mg / ml de colagenasa tipo 1 en PBS, (Wahab R.M.A et al. 2017)
- 3 mg / ml de colagenasa tipo I y 4 mg / ml de dispasa en PBS durante una a dos horas a 37°C con 5% de CO₂ (Kylie M, et al., 2014)
- 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa durante 30 – 60 min a 37 °C (Liu H et al. 2006; Huang et al. 2009; Tirino V et al. 2012)
- 0,05% de tripsina-EDTA y 1,5 U / ml de colagenasa P en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 37 °C durante 30 min. (Balic A et al. 2010)



- 1 mg/ml de colagenasa tipo I y 2,4 mg/ml de dispasa (Lee et al. 2011)
- 2 mg/ml de colagenasa tipo I y dispasa durante 30 min a 37 ° C (Yildirim et al. 2012).
- 0.2 % tripsina por 5 min a 37 °C (Spath et al. 2010)
- 3 % de colagenasa tipo I por 1 h a 37 °C (Yan M et al. 2011)

El protocolo utilizado en este estudio se modificó a partir de Gronthos et al. 2000; Seo et al. 2004; Seo et al. 2005, Nakasima et al .2014. Los tejidos pulpaes se cortaron en trozos pequeños de 1mm³, colocándolos en 100µl de solución enzimática constituida por 4 mg/ml de colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) en una proporción 4:1 en PBS (Biowest); incubándolas durante 2 horas a 37°C, 5% de CO₂ y el 95% de humedad. La actividad enzimática se neutralizó añadiendo el doble de volumen de medio de cultivo celular.

- III. La suspensión obtenida se centrifugó a 1000rpm a 22°C, se retiró el sobrenadante re-suspendiendo el depósito celular en 50µl de medio de cultivo para células mesenquimales, compuesto por: DMEM con rojo fenol (Biowest), suplementado al 10 % de suero bovino fetal (FBS, Biowest) y 100U penicilina, 100 lg de estreptomicina, y 5 lg anfotericina B (Sigma-Aldrich). Las células se sembraron en cajas tipo "T" falcon de 25 cm² (Nunclon™ Denmark) con 3 ml de medio de cultivo, se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno en una cámara humidificada
- IV. Después de las 24 horas posteriores al cultivo celular, las células se lavaron con PBS 1X (Biowest) eliminando las células no adherentes y muertas, se hizo cambio de medio cada tres días hasta tener una confluencia del 80-90 %.

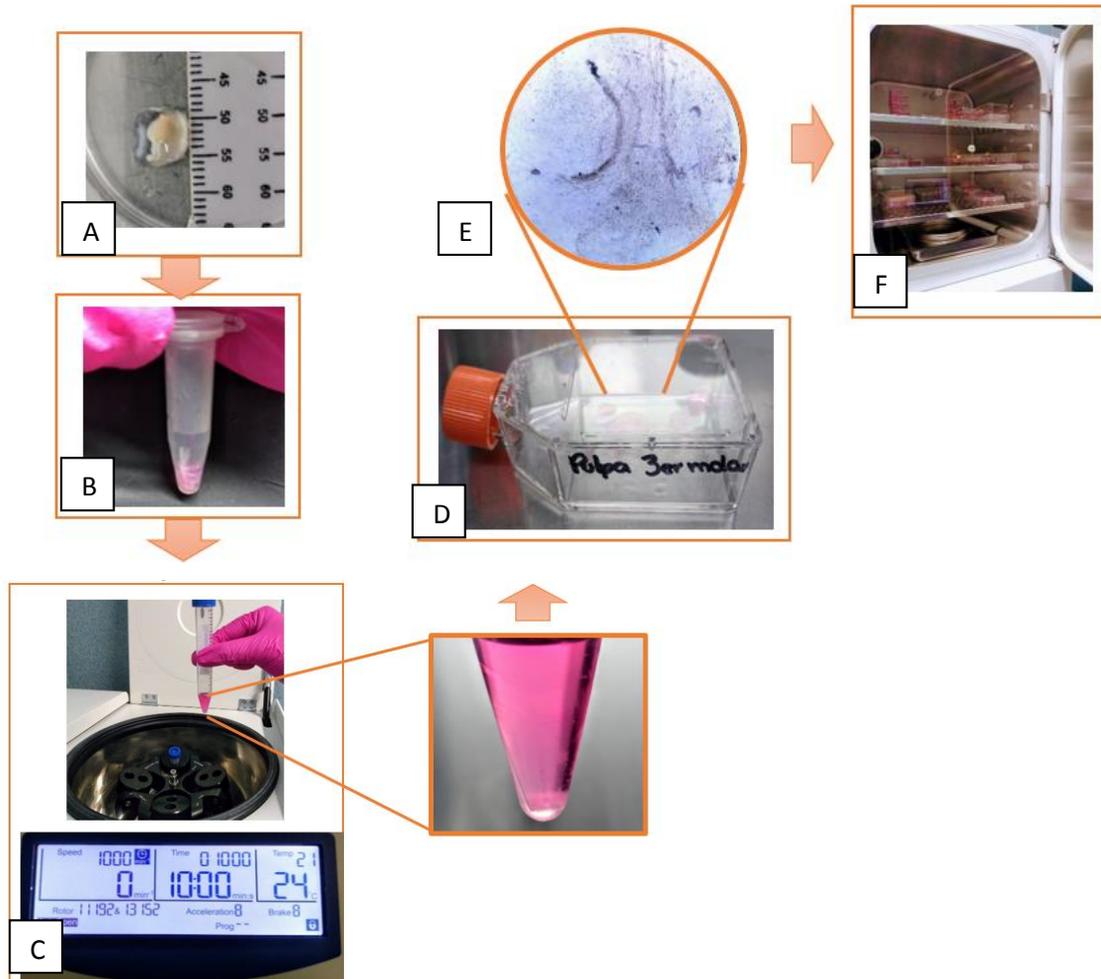


Figura 19: Resumen de metodología de cultivo celular

A) Segmentación del tejido pulpar; B) Pulpa dental en solución enzimática con colágenasa tipo I; C) Centrifugación 10 min. por 1000 rpm.; D) Sembrado celular en cajas tipo T; E) Microscopia de campo claro 10X de tejido pupar digerido en colágenasa tipo I; F) Incubación en una cámara humificada de las células a 37°C con el 5% de CO₂.

- V. **Pase celular.** Las células se despegaron de la superficie de la placa de cultivo con tryPLE Express™ (Gibco, Invitrogen) durante 3 minutos a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de oxígeno, el tryPLE express (Gibco, Invitrogen) se inactivó con 3 ml de medio de cultivo, centrifugando a 1000 rpm por 10 minutos.



- VI. **Conteo celular.** El conteo celular fue a través del hematocitómetro o cámara de Neubauer (Marienfeld Germany) y azul tripán para re-sembrar a una densidad de 5,000 células, que constituyo un nuevo pase celular.

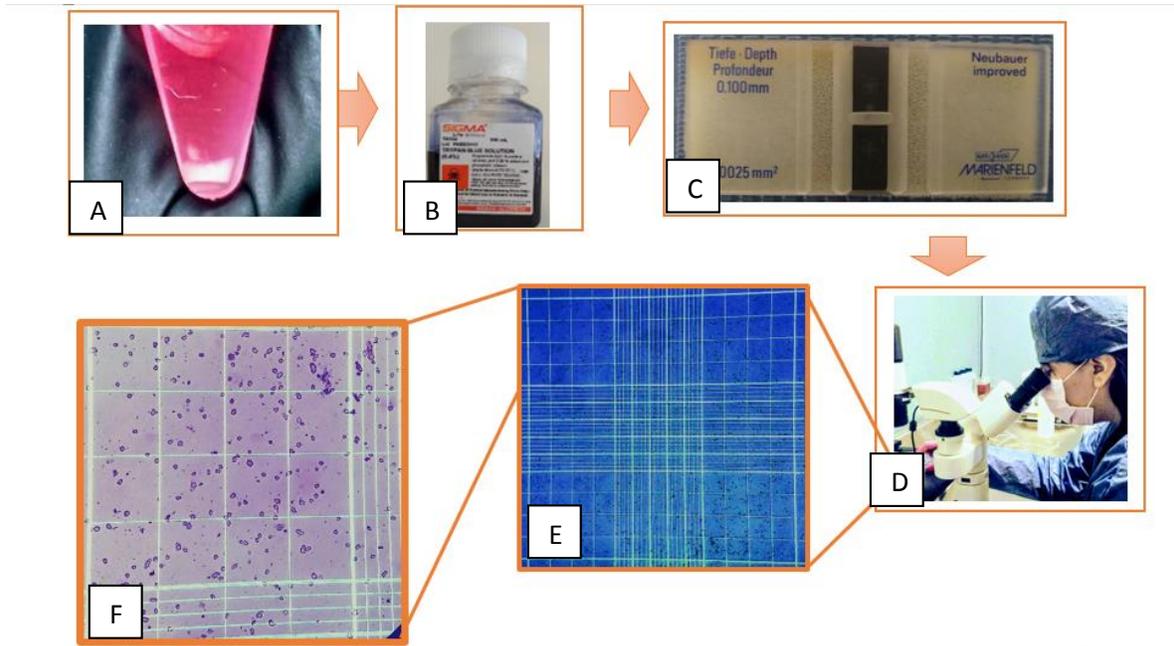


Figura 20: Resumen de metodología de conteo celular

A) Botón celular en 1ml. de medio de cultivo (solución celular); B) 10 μ L de Azul tripán; C) Cámara de Neubauer con 10 μ L de solución celular y 10 μ L de azul tripán; D Y E) Microscopio de campo claro 4X células con azul tripán, F) Microscopio campo claro 20X células con azul tripán

6.1 Protocolo de conteo celular con hematocitómetro

Para contar las células viables en una suspensión celular, se utilizó el método de exclusión del azul tripán, para ello, se mezclaron 10 μ l de la suspensión celular con 10 μ l del colorante azul tripán al 0.4% en PBS 1x (Biowest). Tras re suspenderlo se tomó 10 μ l de dicha dilución depositándola en cámara de Neubauer se procedió a contar las células en el microscopio de campo claro (Leyca MIL LED) [Fig.20]

Con base a la cantidad de células contadas y según el volumen de líquido que admite la cámara, se puede calcular la concentración de células por unidad de



volumen en la muestra inicial, la cual viene dada por la siguiente fórmula simplificada:

$$\text{Concentración (células/ml)} = M \times \text{dilución} \times 10000$$

Donde M es la media de las células contadas por cuadro grande (compuesto por 16 cuadrados más pequeños) de la cámara de recuento. La dilución se toma siempre como 2, ya que la relación en la mezcla entre suspensión celular y azul tripan es 1:1. Se consideraron células viables aquellas que presentasen un perímetro más o menos circular, con borde regular y sin tinción azul.

4) Purificación celular por clasificación de células activadas magnéticamente (MACS, por sus siglas en inglés)

Una vez obtenido una confluencia del 90% de células, las muestras se cosecharon para la separación celular magnética (MACS, *Magnetic-activated cell sorting*) con microperlas magnéticas positivas a CD44 (marcador de células troncales).

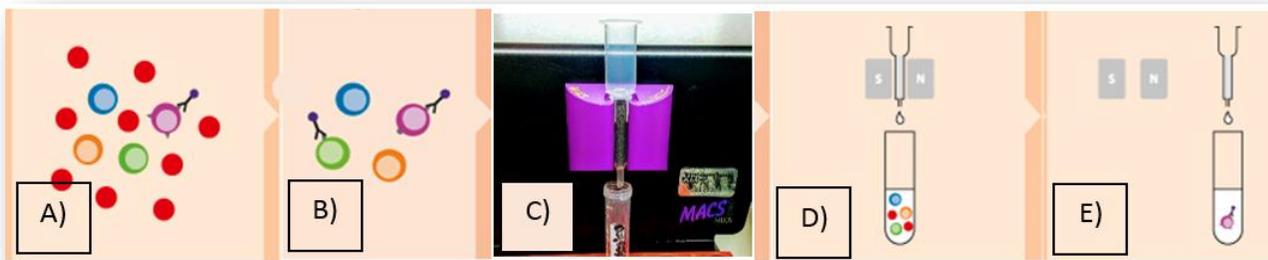


Figura 20: Desarrollo de MACS. A) Población celular heterogénea, B) Anticuerpos (CD44+) cargados con perlas magnéticas, C) Magnetos y columna para MACS, D) Células negativas a CD44+, E) Células positivas a CD44+ (población homogénea).



Protocolo para MACS

- I. Las células se lavaron dos veces con PBS 1x (Biowest) se despegaron con trypLE Express (Gibco, Invitrogen) de la caja de cultivo celular, se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos a 22°C, se retiró el sobrenadante.
- II. El conteo celular se llevó a cabo tiñendo a las células con azul tripán en la cámara de Neubauer, como se describió anteriormente.
- III. Las células se incubaron a 4°C con las microperlas CD44+ para humano (MACS® Miltenyi Biotec), durante 20 minutos, protegiéndolas de la luz.
- IV. Las células cargadas con las perlas magnética positivas a CD44, se lavaron 3 veces con PBS 1x (Biowest) se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos a 22°C.
- V. El pellet celular se re-suspendió en un 1ml de buffer para MACS, la solución con el buffer y las células se introdujo en las columnas de separación (MACS® Miltenyi Biotec).
- VI. Las células positivas a CD44 se recolectaron de las columnas, sembrándolas en cajas tipo "T" falcon de 75 cm² (Nunclon™ Denmark) se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno en una cámara humidificada con 10 ml de medio de cultivo.

Para la realización de los siguientes ensayos se utilizaron las células del tercer pase celular.



5) Ensayo de Inmunofenotipo

La presencia de los marcadores de superficie de MSCs se determinó con CD44 y STRO -1 usando el siguiente protocolo.

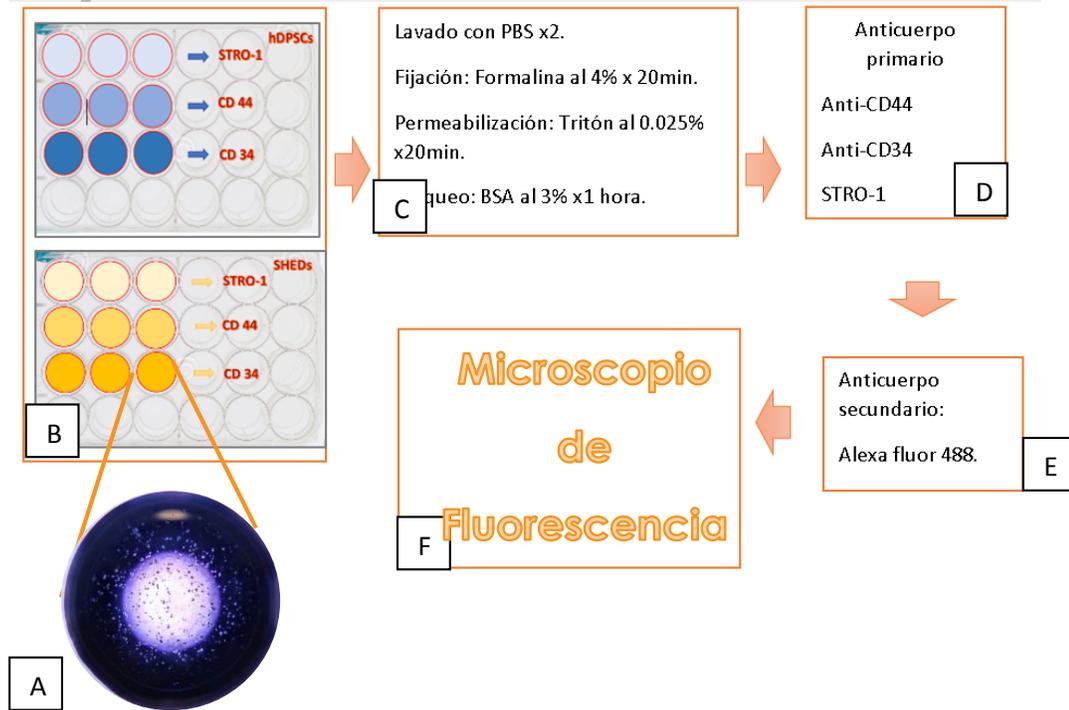


Figura 20: Resumen de metodología de inmunofenotipo

A) Microscopía de campo claro 4X, 5, 000 células, B) Placas de 24 pozos por triplicado para cada anticuerpo por cada línea celular; C) Preparación de muestras (Fijación, permeabilización y bloqueo); D) Anticuerpo primario; E) Anticuerpo secundario; F) Microscopio de fluorescencia.

PROTOCOLO

- I. Se realizaron 2 lavados de las células con PBS 1X (Biowest).
- II. Las células se fijaron con formalina neutra al 4% durante 30 min a temperatura ambiente.
- III. Se retiró el fijador y se lavaron las células 2 veces con PBS 1X (Biowest).



- IV. Se permeabilizó con Tritón al 0.025% (Sigma-Aldrich) en PBS 1X (Biowest) durante 20 min. a temperatura ambiente.
- V. Se lavaron 2 veces las células durante 5 min. con PBS 1X (Biowest).
- VI. Las células se bloquearon con BSA (Bovine Serum Albumin, Santa Cruz Biotechnologies) al 3 % en PBS 1x (Biowest) durante 1 hora, a temperatura ambiente.
- VII. Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X (Biowest).
- VIII. Se colocó el anticuerpo primario (anticuerpo anti-CD44, ABCAM) a una dilución 1:500 en BSA (Santa Cruz Biotechnologies) al 1%, se dejó incubando toda la noche a 4°C.
- IX. Se lavaron las células con PBS 1X (Biowest).
- X. El anticuerpo secundario Goat anti-rat IgG (Alexa fluor 488, Molecular probes) se colocó a una dilución 1:500 en BSA al 1%, (Santa Cruz, Biotechnologies) se dejó incubando por dos horas a 4°C, protegiéndolo de la luz.
- XI. Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia.

) Ensayo de viabilidad Live & Dead.

Para este estudio se usó Live & Dead (Invitrogen Molecular Probes) es un kit de viabilidad/citotoxicidad celular, utilizado como un método combinado para la evaluación de la integridad celular y la integridad de la membrana plasmática. Emitiendo fluorescencia de dos colores, el cual se basa en la determinación simultánea de células vivas y muertas.

Las células vivas se distinguen por la presencia de la actividad esterasa intracelular, determinado por la conversión enzimática de la calceína fluorescente AM, produciendo una fluorescencia verde en las células vivas (Ex / em ~ 495 nm / ~ 515 nm). El homodímero de etidio (EthD-1) entra en las células con membranas dañadas, uniéndose a los ácidos nucleicos, de esta manera produce una fluorescencia de color rojo brillante en las células muertas (Ex / em ~ 495 nm / ~ 635 nm). EthD-1 se excluye por la membrana plasmática intacta de las células vivas.

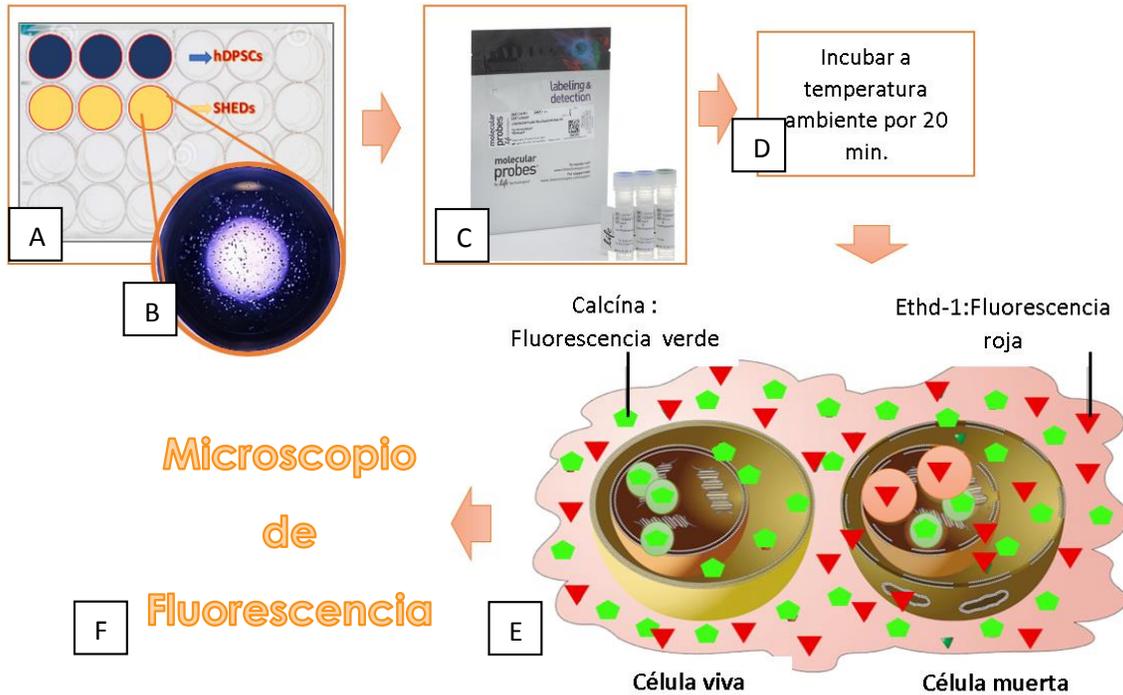


Figura 36: Resumen de la metodología de live and dead.

A) Placas de 24 pozos por triplicado para cada tiempo de análisis, por cada línea celular B) Microscopía de campo claro 4X, 5, 000 células; C) Solución de live & dead); D) Incubar a temperatura ambiente por 20 min.; F) Ver al microscopio de fluorescencia

Protocolo para Live & Dead

Material

- PBS 1X (Biowest)
- Micropipetas 1µl, 100µl y 1000 µl
- Calceína
- Homodímero de etidio
- Microscopio confocal

Para este ensayo se evaluaron 3 tiempos (1, 3 y 10 días) de ambas líneas celulares, hDPSCs y SHEDs, se sembraron 5000 células en cubreobjetos para cada tiempo.

- Las células se lavaron tres veces con PBS 1x (Biowest)
- La solución de trabajo se preparó con 997µl de PBS 1x (Biowest), 0.5µl de Calceína, 2µl de homodímero de etidio, protegiéndolo de la luz.



- III. Se colocaron 300µL de la dilución por pozo, incubando a temperatura ambiente durante 30 min.
- IV. Las células se lavaron dos veces con PBS 1x (Biowest). Se observó al microscopio de fluorescencia.
- V. La viabilidad celular y el número de células vivas en los días 3, 7 y 14 días se determinaron de la siguiente manera: (Xiao-Fei Wang 2016).

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{100\% * \text{células vivas}}{\text{Células vivas} + \text{células muertas}}$$

8) Ensayo de la localización de mitocondrias en las células troncales por Mitotracker Deep Red FM.

La localización mitocondrial se llevó a cabo con Mitotracker Deep Red FM (Invitrogen–Molecular Probes), es un colorante rojo fluorescente que tiñe las mitocondrias de las células vivas. La localización mitocondrial con Mitotracker Deep red FM se ha informado previamente en fibroblastos y monocitos de ratón (Adrew B.J. et al. 2012).



Figura 21: Resumen de la metodología de Mitotracker Deep Red FM.

- A) Placas de 24 pozos por triplicado para cada línea celular con 5 ml células por muestra. B) Mitotracker Deep Red FM, C) Incubar a temperatura ambiente por 20 min.; F) Ver al microscopio de fluorescencia.



Protocolo

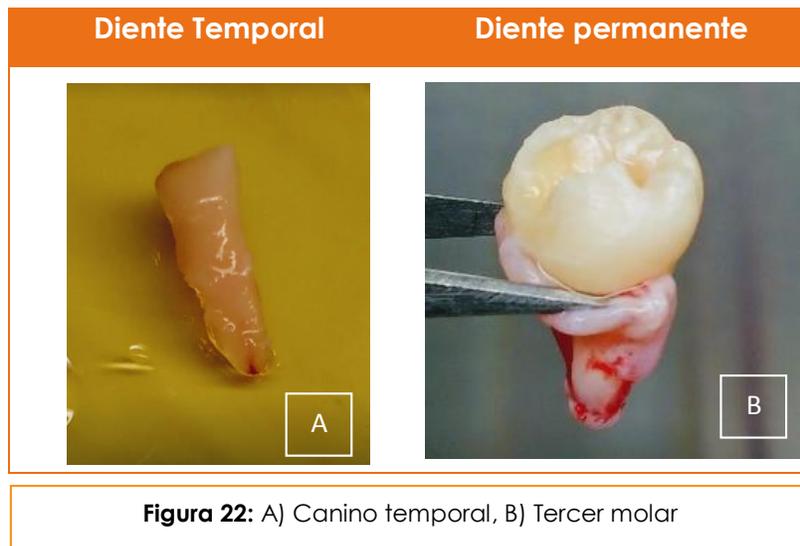
- I. Se sembraron células a una densidad de 1×10^3 en cubreobjetos.
- II. La fijación de las células se realizó con formaldehído al 4% a 37°C durante 15 min, posteriormente se permeabilizaron con Tritón 100x al 2% en PBS1X (Biowest), durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- III. Se lavaron con PBS 1X (Biowest) durante 5 minutos
- IV. Se agregó 10 μl de Mitotracker Deep Red FM, protegiéndolo de la luz se incubó durante 45 min a 37°C y se observó al microscopio de fluorescencia.

Capítulo VII

RESULTADOS

Extracción de dientes

Se obtuvieron cinco terceros molares de sujetos entre 15 y 18 años de edad y dientes temporales de sujetos de 6 y 9 años de edad en la Clínica Odontológica Cuauhtepac de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, bajo el consentimiento informado de los donantes y/o padre o tutor del menor, los dientes fueron trasladados al Laboratorio de Ingeniería Tisular de la FESI-UNAM, a 4°C en medio de transporte para su procesamiento.



Obtención de pulpa dental humano

Se logró obtener pulpa dental de los terceros molares haciendo un corte nivel amelo-cementaria y la pulpa dental de dientes temporales se obtuvo con una lima endodóntica.

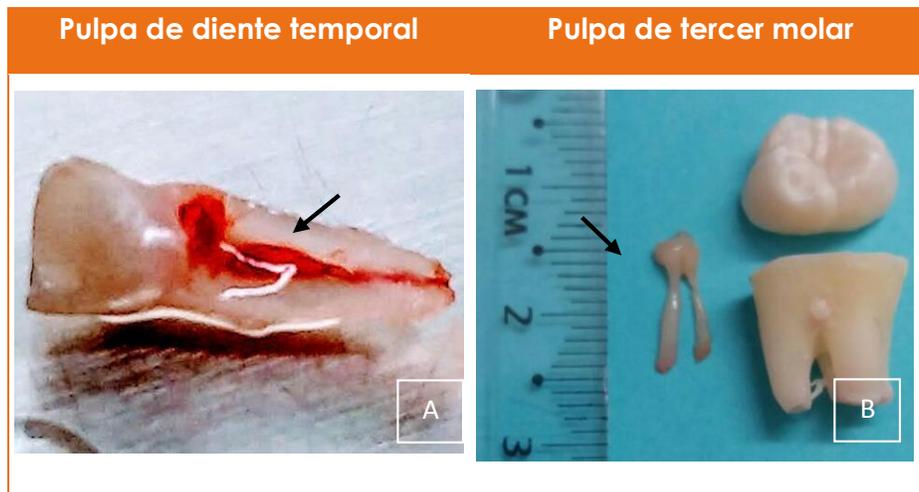


Figura 23: A) Tejido pulpar del canino temporal B) tejido pulpar del tercer molar. Las flechas señalan el tejido pulpar.



Cultivo celular

En este estudio se obtuvo una población heterogénea de pulpa dental de terceros molares (Atari M et al. 2012 Y Gronthos S et al. 2000) y de dientes temporales mostrando una típica morfología similar a fibroblastos [Fig. 24] (Homayounfar N, 2016; Huang et al. 2006; Gronthos S. et al. 2000), con adherencia al plástico después de las 24 horas del cultivo

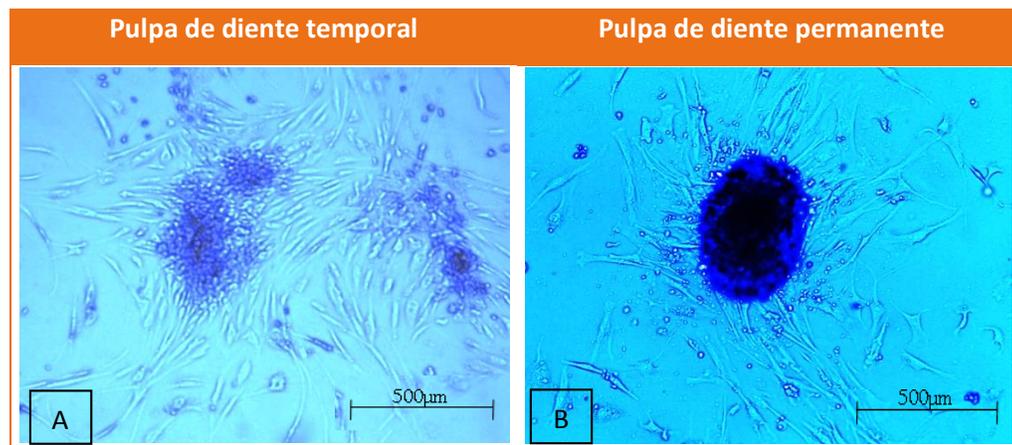
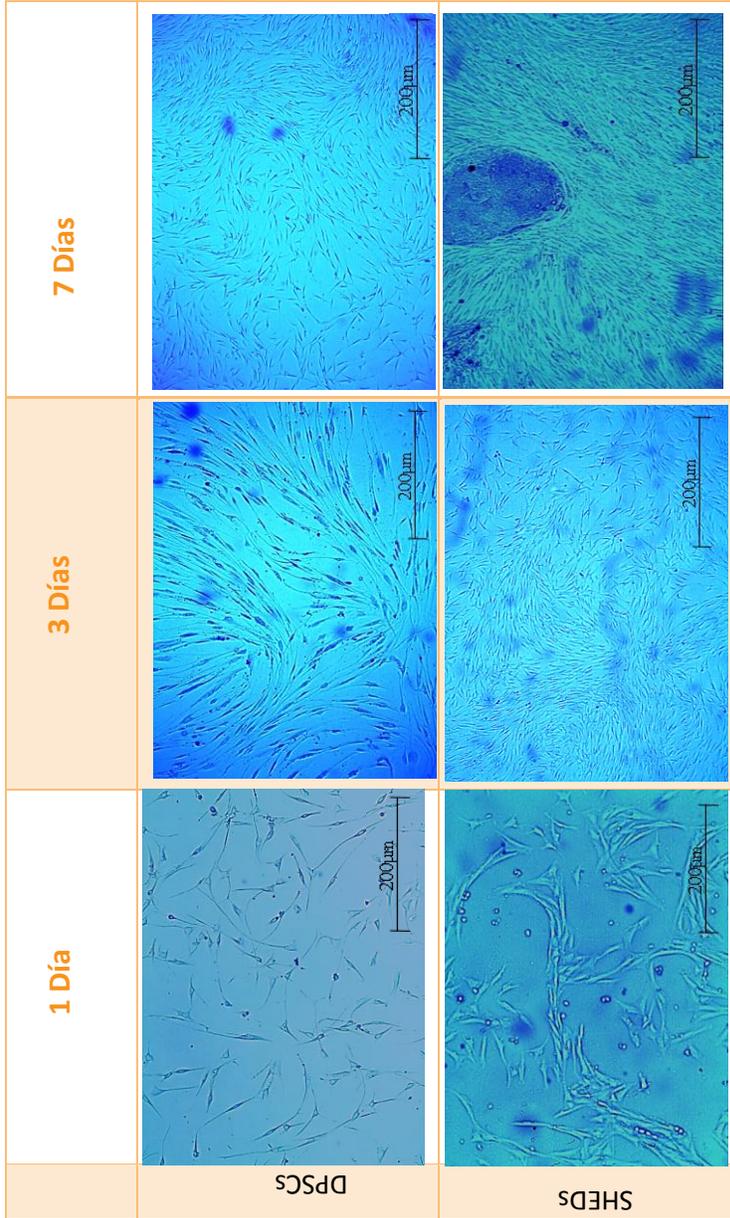


Figura 24: Microscopía de campo claro, A) cultivo primario de pulpa dental de dientes temporales (canino superior derecho) y B) pulpa dental de dientes permanentes (terceros molares) mediante digestión enzimática con 4mg/ml de colagenasa después de 24 horas en cultivo, magnificado a 20x. Las células migran de los fragmentos de los tejidos pulpares adhiriéndose a la placa de cultivo.



Purificación celular por MACS

Figura 25: A través de microscopía de campo claro 20x, se identificarán células con adherencia al plástico obtenidas de pulpa dental de terceros molares (hDPSCs) y pulpa dental de dientes temporales (SHEDs). El esquema presenta la confluencia celular *in vitro* en diversos días (1,3, y 10 días) en cultivo celular, ambas fuentes celulares se observó la típica morfología fibroblastoide durante los tiempos evaluados.



El cultivo celular heterogéneo obtenido de la pulpa dental de los terceros molares y de los dientes temporales se filtró a través de columnas para MACS cargadas con microperlas positivas para CD44, se sembraron en una caja de 75 tipo "T" falcon, las dos semanas alcanzaron una confluencia del 90%.

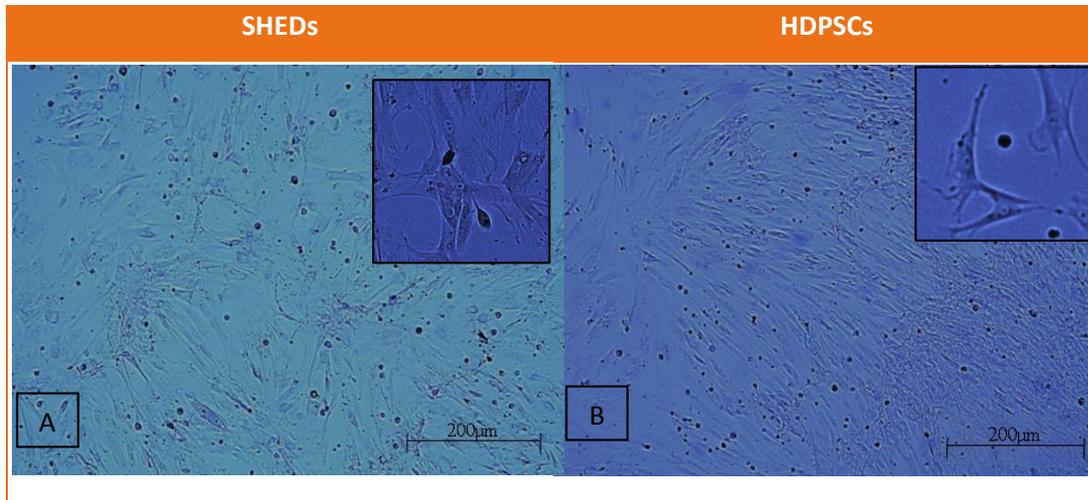


Figura 26: Microscopia de campo claro 10x. A) Células caracterizadas con CD44+ de pulpa dental de dientes temporales (SHEDs). B) Células caracterizadas con CD44+ pulpa dental de terceros molares (hDPSCs).



INMUNOFENOTIPO

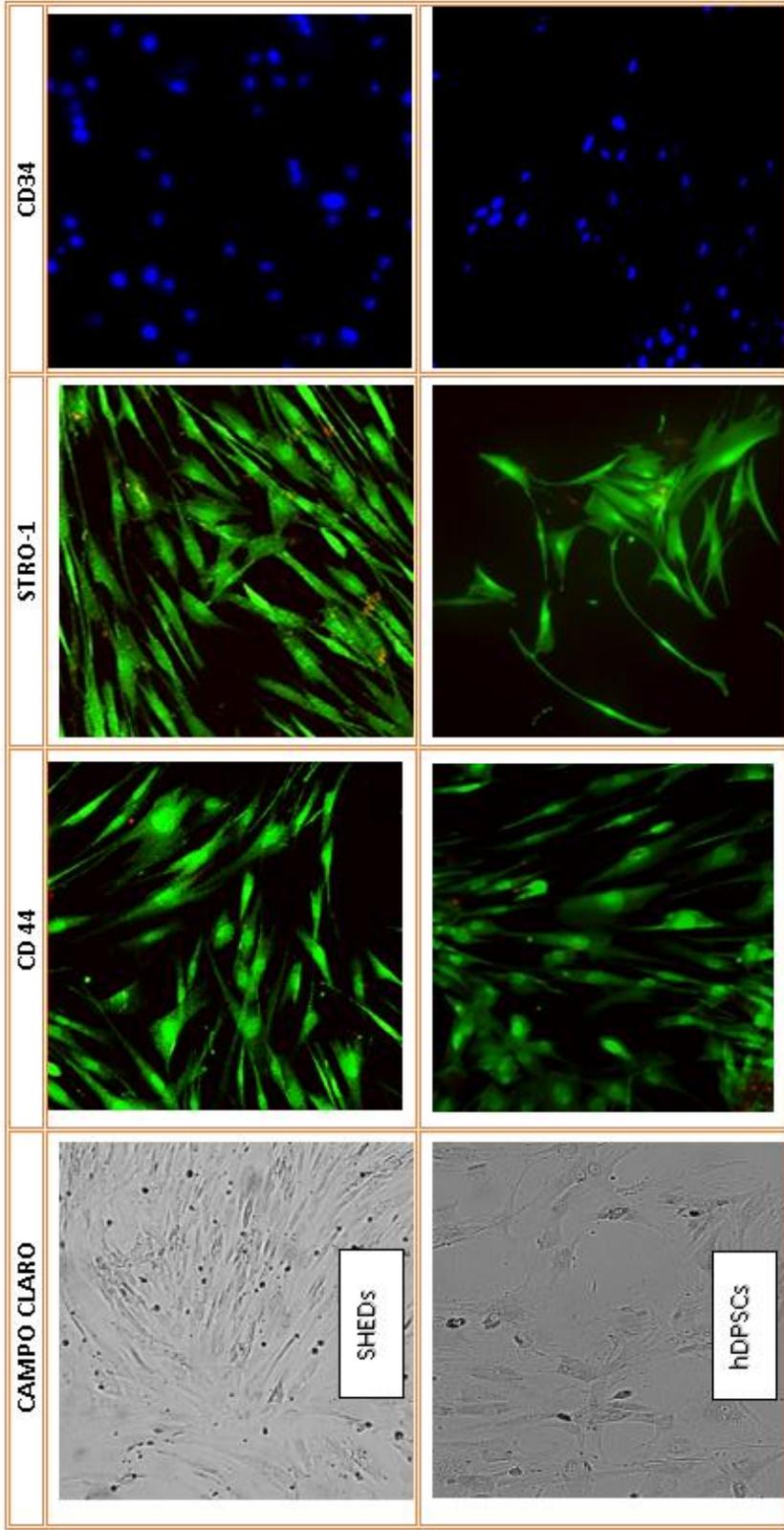


Figura 27: Marcaje de las SHEDs y DPSCs con anticuerpos dirigidos contra las proteínas CD44 ,STRO-1 y CD34.



Determinación de la viabilidad Celular

Con el fin de examinar la viabilidad celular *in vitro* de las hDPSCs y las SHEDs, las células fueron tratadas con el kit de Live & Dead, evaluando 3, 7 y 14 días en cultivo celular como se muestra en la [Figura 27]. Los resultados mostraron que la viabilidad celular de las hDPSCs es mayor en comparación con las SHEDs.

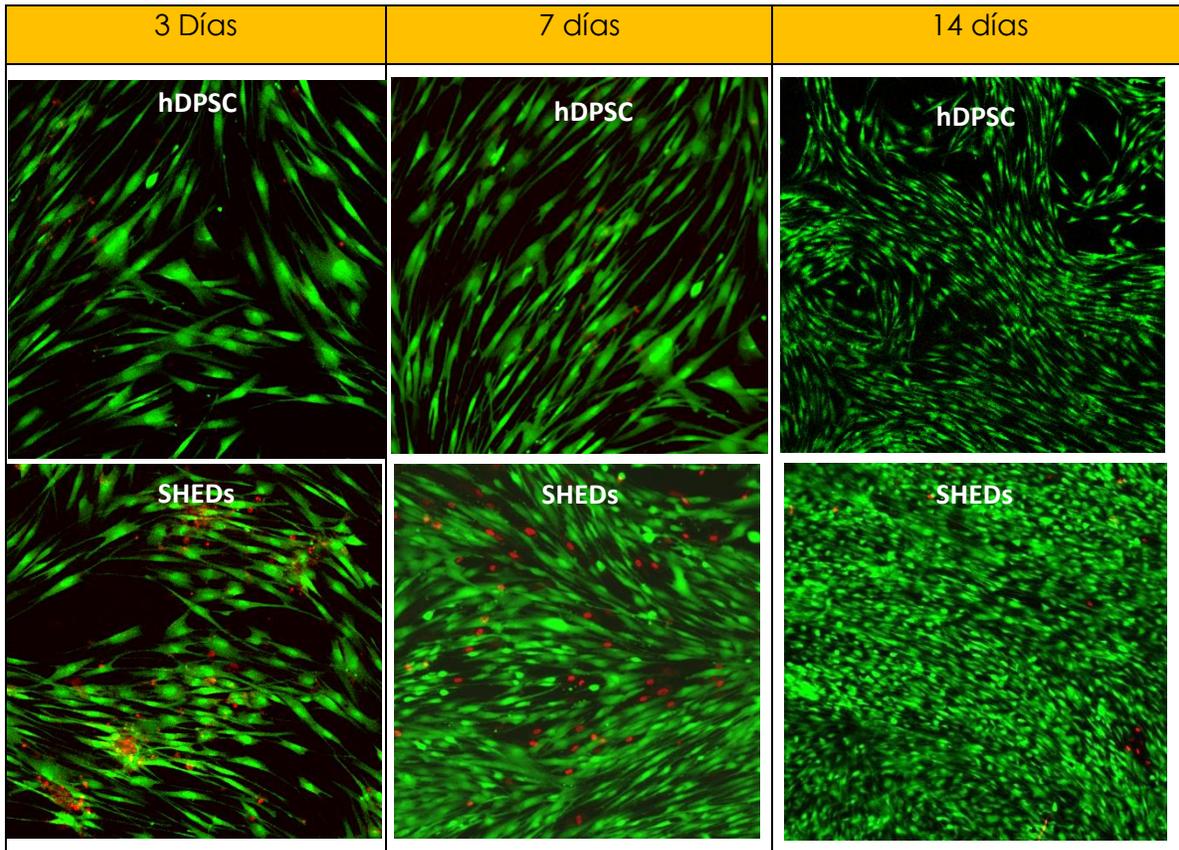


Figura 28: Microscopia confocal con magnificación 10x y 40x. Células vivas teñidas de color verde, células muertas etiquetadas de color rojo.

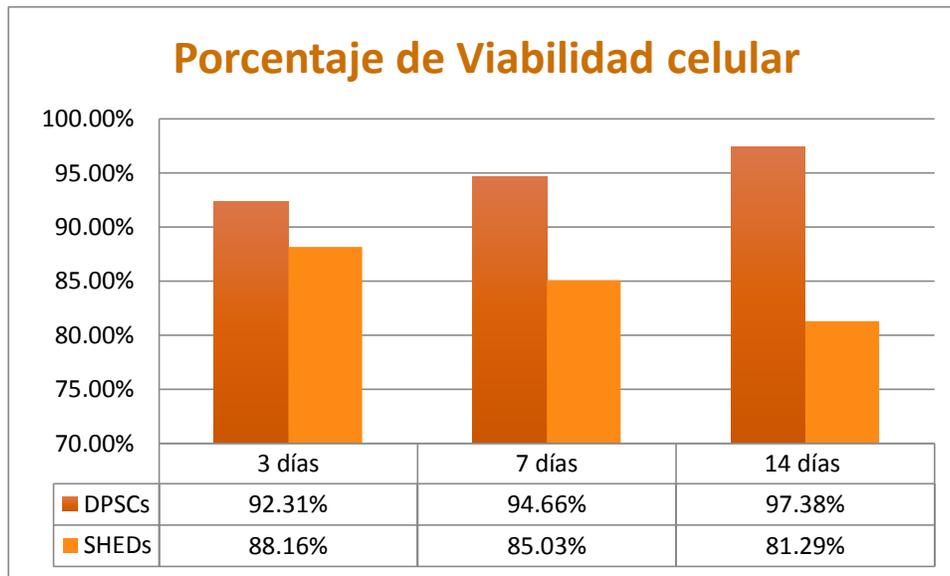


Figura 46: Gráfica con los porcentajes de viabilidad celular de las SHEDs y hDPSCs en los distintos tiempos de evaluación, mostrando un mayor porcentaje de células vivas de hDPSCs.

Tinción y detección de las mitocondrias.

Las mitocondrias se visualizaron en DPSCs y SHEDs mediante un colorante específico mitocondrial, Mitotracker Deep Red FM. En pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales se detectaron las mitocondrias en grupos al rededor del núcleo y disminuyendo a lo largo del citoplasma.



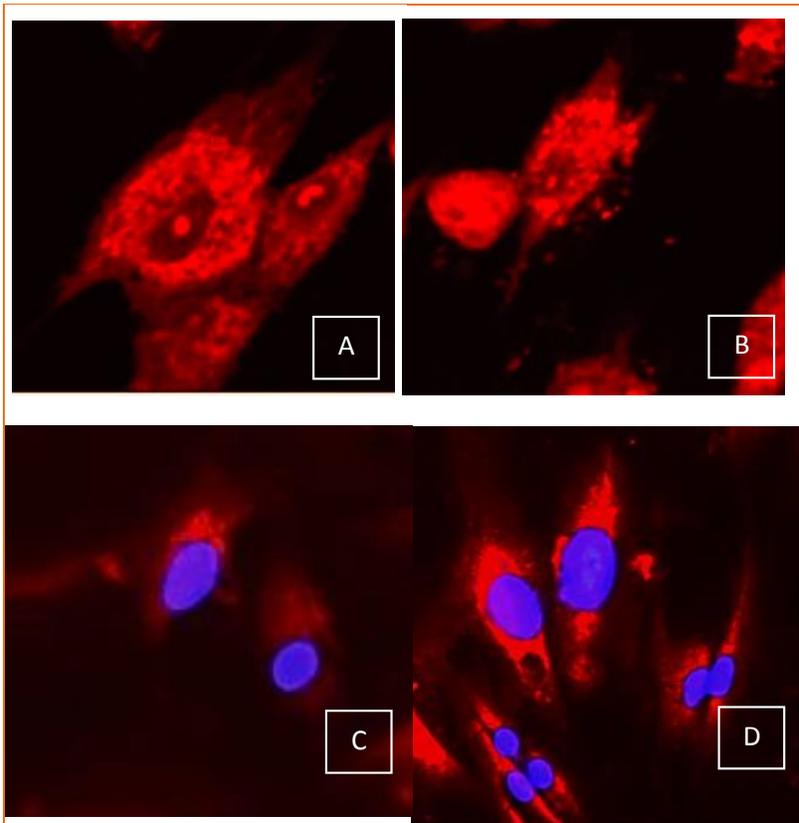


Figura 29:

A) y B) Microscopia confocal 40x .Tinción de mitocondrias en DPSCs y en SHEDs con MitoTracker Deep Red FM.

C) y D) Microscopia confocal 40x. Mitocondrias en DPSCs y en SHEDs con MitoTracker Deep Red FM, tinción del núcleo con DAPI.

Capítulo VIII

DISCUSIÓN



La Ingeniería tisular es una nueva ciencia (Longer R. y Vacanti JP. 1993), basada en tres componentes, células, biomateriales y factores de crecimiento (Vacanti JP. 1998). La función principal de la IT es la de construir sustitutos biológicos para después ser colocados o implantados en animales o en los humanos para sustituir tejidos u órganos que han sido dañados por algunas causas como: enfermedades, accidentes, traumatismos o síndromes; esta terapia es definida como medicina regenerativa o medicina traslacional. Antes de llevarse a la aplicación clínica, las células deben cumplir ciertos requisitos, con base a su eficacia, viabilidad, garantizando su progenie en cada de uno de los pases celulares (Martín-Piedra et al. 2013; Alaminos M A et al. 2011).

Las células troncales de pulpa dental humana, representan un interés muy atractivo como fuente de MSCs por su fácil acceso y mínima invasión, sobre todo por su alta capacidad metabólica en comparación con las células de medula ósea (Alge DL et al. 2010).

Las hDPSCs se obtienen, regularmente de terceros molares o muelas del juicio que a menudo son desechados o son indicados para extracción por razones de tratamientos en ortodoncia, (Kaneko T et al. 2018, Gronthos et al. 2000).

Desde el descubrimiento de las hDPSCs de terceros molares por Gronthos en el 2000 y de dientes deciduos exfoliados (SHEDs) por Miura en el 2003, se ha analizado su potencial de auto-renovación además de su capacidad de multidiferenciación a osteoblastos, hepatocitos, adipocitos, células neuronales, condrocitos, miocitos y odontoblastos. (Nan Zhan et al. en el 2016; Ferro et al. en el 2012; Bernardi L en el 2011 et al; Eslaminejad MB et al. en el 2010; Govindasamy V en el 2010 y Zhang W et al. 2006).

Las células de pulpa dental se pueden cultivar por técnica por explante o por la técnica de digestión enzimática (Chen KL et al. 2016, Yildirim et al. 2013; Huang JT. et al. 2006). Bakopoulou y Ferrua mencionan que está ultima, es el método de elección en más del 54% de los estudios para el cultivo de hDPSCs y SHEDs, utilizando una combinación de colagenasa tipo I y dispasa, y el 17% de los



investigadores prefirieron utilizar colagenasa tipo I, como único agente enzimático (Ebrahimi D M et al. 2018).

Para esta tesis se empleó la metodología de Villa J et al. 2016 con modificación, la cual consistió en dejar el tejido en colagenasa por 20 minutos. En ese sentido, nuestros resultados concuerdan con Villa J et al. 2016 al obtener células a las 24 horas posterior al cultivo celular de la pulpa dental de los terceros molares y de dientes deciduos.

Por otro lado, otros autores han conseguido células posteriores a las 24 horas de cultivo por ejemplo, Gronthos en el 2000 reporta que obtuvo células al quinto día; Karamzadeh R en el 2011 a los 10 días, y Nang Zhang en el 2016 de 2 a 3 semanas.

Las células obtenidas en este estudio presentaron una morfología fibroblastoide con adherencia al plástico (Ebrahimi D M, 2018; Dominicci, et al.1991; Friendentein 1876).

Respecto a la confluencia celular de las hDPSCs de terceros molares Wang J en el 2010 la logró en el quinto día, Villa J. en el 2016 la obtuvo entre los días quinto y séptimo (Villa J et al. 2016), mientras que en este trabajo se obtuvo en el séptimo día. Hasta el día de hoy no existe reporte de la confluencia celular de las SHEDs. Un hallazgo en la presente investigación y, en nuestros resultados es, que logramos obtener una confluencia celular del 90% en el tercer día de las SHEDs.

Se ha informado que los marcadores de superficie celular STRO-1, CD73, CD44, CD90, CD105, CD146 y Oct4 son idóneos para identificar a MSCs. (Ji-Hyun Jang et.al.,2016. CD44 y STRO-1 expresado en hDPSCs y en SHEDs por Yasu T en el 2017, Ruth Alvarez en el 2015, Hadaegh en el 2014, Kawashima en el 2012, Sytrus T en el 2011, Lisiane Bernardi en el 2011, Miura en el 2003, y Gronthos en el 2000. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los resultados publicados con dichos autores, tanto hDPSCs como SHEDs, expresaron CD44 y STRO-1.



En el área de la ingeniería tisular, la evaluación de la viabilidad de las células en los constructos tisulares, constituye uno de los principales objetivos de los protocolos de control de calidad. Por lado, uno de los límites o desventajas del uso del mitotracker es que es un ensayo que se realiza específicamente en células vivas, discriminando a las células muertas. La importancia de evaluar los diferentes tiempos de cultivo *in vitro* de las células troncales es obtener una mayor información para futuros estudios con mitotracker.

La determinación de la viabilidad celular es un ensayo predictivo para un buen funcionamiento de los futuros tejidos que se elaboren a partir de la IT con células y/o células troncales. Es necesario garantizar la calidad y el potencial regenerativo de las células utilizadas en los protocolos de IT (cultivo, aislamiento expansión etc.) (Montalvo 2008). Por lado, uno de los límites o desventajas del uso del mitotracker es que es un ensayo que se realiza específicamente en células vivas, discriminando a las células muertas. La importancia de evaluar los diferentes tiempos de cultivo *in vitro* de las células troncales es obtener una mayor información para futuros estudios con mitotracker.

Al comparar los resultados del porcentaje de viabilidad obtenidos en esta tesis entre las hDPSCs y las SHEDs, se demostró que el porcentaje de células vivas en las hDPSCs fue en aumento, durante el transcurso de los días (día 1, 7, 14), coincidiendo con lo reportado por González A. en el 2016, por su parte Mohamed DA (Mohamed DA.et.al.,2017) evaluó la viabilidad en el P1, a los días: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 14, mostrando una mayor viabilidad en el día 9; discutiendo sus resultados con los de esta tesis, Mohamed et.,al. en el día 11 tuvieron una disminución de viabilidad, mientras que en esta investigación se incrementó.

Posiblemente esto se deba al número de células que Mohamed DA sembró inicialmente (15 mil células), mientras que nosotros sembramos 5 mil células por pozo, la pérdida de la viabilidad celular en el día 11 pueda deberse a un exceso en el número de células sobre la superficie del pozo.



Por otro lado, el porcentaje de viabilidad de las SHEDs con las hDPSCs fue disminuyendo con el paso de los días: Día 1 (86.66%), día 7 (85.03), día 14 (81.29%). Probablemente estos resultados se deban al proceso de rizólisis en el que se encuentran los dientes temporales (Bernardi L. et, al.,2016).

En la actualidad se tiene pocos reportes sobre las propiedades mitocondriales en células troncales mesenquimales. Tales como patrones de localización mitocondrial, consumo de oxígeno y contenido de ATP; Folmes et al.2011; ; Prigione et al. 2010 y Kondoh et al. 2007.

Si bien las mitocondrias en las células diferenciadas poseen una morfología compleja con crestas bien desarrolladas, matriz más densa y apariencia alargada, las iPSCs, ESCs, MSCs, contienen mitocondrias funcionalmente inmaduras con forma globular, crestas poco desarrolladas y localización perinuclear (Chung et al. 2010; Prigione et al. 2010; Facucho-Oliveira y St John, 2009). Lonergan y Bavister discuten la importancia de la disposición perinuclear de las mitocondrias, como un rasgo característico de *stemness* en células troncales. Se ha sugerido que la morfología, la localización, la cantidad y la función de las mitocondrias podrían usarse como marcadores de MSCs. La tinción mitocondrial por MitoTracker Green, MitoTracker Red CMXRos, han sido usados para la localización de mitocondrias en células diferenciadas y células troncales (Buravkov SV et al. 2014)

Con base a publicaciones anteriores , se planteó como hipótesis para esta tesis lograr la tinción de las mitocondrias a través de Mitotracker Red Deep Fm en células troncales de pulpa dental de terceros molares y de dientes temporales, para establecer la tinción de mitocondrias como una alternativa en la evaluación de la troncalidad.

En la actualidad no existen reportes de las mitocondrias en células troncales de origen dental, sin embargo se ha demostrado mitocondrias en ESCs humano, BMMSCs en mono/caballo, iPSCs, células troncales de tejido adiposo de mono/humano y en células troncales de placenta humana, con una disposición prenuclear usando Mitotracker Green y TEM. Los resultados obtenidos en esta



investigación muestran mitocondrias en DPSCs y en SHEDs en un pase celular temprano (P3), dichos resultados se asemejan a los obtenidos en células troncales de tejido adiposo por Lonergan et al., ESCs de ratón por Andrew B. J. Prowse, observando una mayor intensidad de fluorescencia alrededor del núcleo, disminuyendo a lo largo del citoplasma. El kit de Mitotracker Deep Red FM, se puede considerar como una técnica de marcador predictivo de células troncales, si bien a un falta hacer un mayor número de ensayos para definir la técnica de tinción.



Capítulo IX

CONCLUSIÓN

Las células troncales es una opción prometedora en el área de la ingeniería tisular. Sin embargo, la función, morfología y ubicación de las mitocondrias durante la diferenciación celular aún no se ha descrito por completo. Hemos usado MitoTracker Deep Red FM como anticuerpo específico contra las mitocondrias en DPSCs y en SHEDs para la detección y la localización mitocondrial, los resultados exponen mitocondrias en células troncales de pulpa dental tanto en dientes temporales como en definitivos, por otro lado se necesita teñir el núcleo y el citoplasma para poder determinar con mayor exactitud la ubicación de las mitocondrias en el citoplasma.

Perspectivas

Perfeccionar la técnica de tinción de las mitocondrias en las DPSCs y en SHEDs

Usar anticuerpos específicos contra núcleo y citoplasma para ubicar la distribución de las mitocondrias en las células.

Teñir y ubicar las mitocondrias de las DPSCs y SHED,s antes, durante y después de la diferenciación inducida.

Emplear análisis estadístico de la población de las DPSCs y SHEDs con mitocondrias perinucleares.



BIBLIOGRAFIA

1. Abdullah MF, et al., "Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes", *Cell biology international reports*, vol.38, no.5, pp582-590, 2014.
2. Abe S, Yamaguchi S, et al., "Multilineage Cells from Apical Pulp of Human Tooth with Immature Apex", *Oral Science International*, vol 4, no. 1, 45-58pp, 2007.
3. Aghajani F, Hooshmand T, et al., "Comparative Immunophenotypic Characteristics, Proliferative Features, and Osteogenic Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Permanent and Deciduous Teeth with Bone Marrow", *Molecular biotechnology*
4. Alge DL. Et al., "Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model.", *J Tissue Eng Regen Med*. 2010 enero; 4 (1): 73-81. doi: 10.1002 / term.220.
5. Andrew B. J. et al., Analysis of Mitochondrial Function and Localisation during Human Embryonic Stem Cell Differentiation In Vitro. Published online 2012 Dec 19. doi: 10.1371/journal.pone.0052214.
6. Aponte PM, Caicedo, "Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment ", *Stem Cell International*, vol 5. 2017.
7. Arora V, et., al, "Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): Saving for the future". *J Clin Pediatr Dent*. 2009; 33:289-294.
8. Atala A, "Tissue engineering of artificial organs", *Journal of endourology*, vol.14, no.1, 49-57pp,2000.
9. Atari M, et al., "Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci*. 2012 Jul 15;125(Pt 14):3343-56. doi: 10.1242/jcs.096537. Epub 2012 Mar 30.
10. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. "The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review". *Stem cells and development*.
11. Bajek A., Czerwinski M., Olkowska J., Gurtowska N., Kloskowski T., Drewa T." Does aging of mesenchymal stem cells limit their potential application in clinical practice?" *Aging Clinical and Experimental Research*. 2012;24(5):404-411
12. Bakopoulou A et al., Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*. 2011 Jul;56(7):709-21. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.12.008. Epub 2011 Jan 11.
13. Bakopoulou A et al., "Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and Key Milestones towards Clinical Application ", *Stem Cells International*, 2016.



14. Bakopoulou, A., et al., (2011). Assessment of the impact of two different isolation methods on the Osteo/Odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcified Tissue International*, 88(2), 130–141
15. Balic A, et al., "Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars.", *Bone*. 2010 Jun;46(6):1639-51. doi: 10.1016/j.bone.2010.02.019. Epub 2010 Feb 26.
16. Banfi A., Muraglia A., Dozin B., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Quarto R. "Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy". *Experimental Hematology*. 2000;28(6):707–715
17. Barrilleaux B, Phinney DG, et al., "Review: Ex Vivo Engineering of Living Tissues with Adult Stem Cells", *Tissue Engineering*, vol,12, no 11, pp3007-3019, 2006.
18. Bavister BD, "The mitochondrial contribution to stem cell biology". *Reprod. Fertil. Dev.* 2005; 18:829–838.
19. Bavister BD, Wolf DP, Brenner CA. "Challenges of primate embryonic stem cell research". *Cloning Stem Cells*. 2005; 7:82–94.
20. Baxter M. A., Wynn R. F., Jowitt S. N., Wraith J. E., Fairbairn L. J., Bellantuono I. "Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion". *STEM CELLS*. 2004;22(5):675–682.
21. Bernardi L. et al., The Isolation of Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp Is Related to the Physiological Process of Resorption, July 2011 Volume 37, Issue 7, Pages 973–979
22. Bianco P. "'Mesenchymal' stem cells". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol.30, 677–704pp. 2014.
23. Bonassar, L. J., y Vacanti, C. A. (1998). Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem Suppl*, 30-31, 297
24. Buravkov SV, et al., "Comparison of mitochondrial fluorescent dyes in stromal cells." *Bull Exp Biol Med*. 2014 Sep;157(5):654-8. doi: 10.1007/s10517-014-2637-3. Epub 2014 Sep 26.
25. Byon C. H., Javed A., Dai Q., et al. "Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling". *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(22):15319–15327.
26. Cai J, Weiss ML, Rao MS., "In Search of Stemness", *Experimental Hematology*, vol.32, 585-598, 2004.
27. Cakouros D., Isenmann S., Cooper L., et al. "Twist-1 induces Ezh2 recruitment regulating histone methylation along the Ink4A/Arf locus in mesenchymal stem cells". *Molecular and Cellular Biology*. 2012;32(8):1433–1441
28. Caplan AI, "Mesenchymal Stem Cells," *Journal of orthopaedic research* vol, 9.no5, 641-650pp.1991.
29. Centro Nacional de Trasplantes. (2019). Gobierno de México .CDMX,México. MEX. CENATRA. Recuperado de [http:// www.gob.mx/cenatra](http://www.gob.mx/cenatra)



30. Chen C.-T., Shih Y.-R. V., Kuo T. K., Lee O. K., Wei Y.-H." Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells*. 2008;26(4):960–968.
31. Collu-Marchese M et al., The regulation of mitochondrial transcription factor A (Tfam) expression during skeletal muscle cell differentiation. *Biosci Rep*. 2015 May 19;35(3). pii: e00221. doi: 10.1042/BSR20150073.
32. D'aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: From biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009;312B:408–15
33. De Bari C, et al., " Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane ", *Arthritis Rheum*, vol.44, no.8,1928-1942pp,2001.
34. Deepa Pnnaiyan, "Do dental stem cells depict distinct characteristics? — Establishing their "phenotypic fingerprint"", 2014 Mar-Apr; 11(2): 163–172.
35. Dominicci M, et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 317,2006.
36. Ebrahimi DM et al., "Comparison of two digestion strategies on characteristics and differentiation potential of human dental pulp stem cells.," *Arch Oral Biol*. 2018 Sep;93:74-79. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.008. Epub 2018 May 19.
37. Eslaminejad MB, et., al, "In vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth". *J Dent (Tehran)* 2010; 7:185–195.
38. Facucho-Oliveira JM¹, St John JC." The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation" *Stem Cell Rev*. 2009 Jun;5(2):140-58. doi: 10.1007/s12015-009-9058-0. Epub 2009 Apr 3.
39. Feng F, et al, " Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases", *Oral diseases*, vol. 16, no.1, 20-28pp,2010.
40. Ferro F. et., al," Dental pulp stem cells differentiation reveals new insights in Oct4A dynamics". *PLoS One*.
41. Ferrúa, C. P. et al.,(2017). How has dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review. *Brazilian Oral Research*, 31
42. Folmes CD, et al., "Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation" *Cell Stem Cell*, VOL.11,596-606pp. 2012.
43. Folmes CD, et al, "Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming", *Cell metabolism*, VOL.2, 264.272 pp, 2011.
44. Forni MF et al.,Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation Is Regulated by Mitochondrial Dynamics. *Stem Cells*. 2016 Mar;34(3):743-55. doi: 10.1002/stem.2248. Epub 2015 Dec 21.



45. Friedenstein AJ, RK," The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells ", Cell Tissue Kinet, vol.3, no.4, 393-403pp.1978
46. Fukushima H y et al., "SSEA-4 is a Marker of Human Deciduous Periodontal Ligament Stem Cells", Journal of Dental Research, 2012.
47. Gay IC, et., al. "Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells". Orthod Craniofac Res. 2007; 10:149–160.
48. Govindasamy V et., al. "Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth". J Endod. 2010; 36:1504–1515.
49. Gronthos S, et al." Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo."Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol.97, no.25, 13625-13630pp.2000.
50. Gronthos S, et al., " The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro ", Blood, vol 85, no. 4, 929-940, 1995.
51. Hadaegh Y et., al, "Characterization of stem cells from the pulps of unerupted third molar tooth", Indian J Dent Res,201425(1):14-21.
52. Hargreaves KM, Diogenes A, et al.," Treatment Options: Biological Basis of Regenerative Endodontic Procedures", Journal of endodontics. vol.39, no.3, 530-543pp. 2013.
53. Hilkens P, et., al" Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells". Cell Tissue Res. 2013; 353:65–78.
54. Hofmann AD ,et. al, "OXPHOS supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCs". PLoS ONE. 2012;7: e35160
55. Homayounfar N et al., "Isolation, Characterization, and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells in Ferrets." J Endod. 2016 Mar;42(3):418-24. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.002. Epub 2016 Jan 12.
56. Horwitz EM, et., al, "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta" Blood, 2001.
57. Hsu YC, Wu YT, Yu TH, Wei YH. "Mitochondria in mesenchymal stem cell biology and cell therapy: From cellular differentiation to mitochondrial transfer". Semin Cell Dev Biol.
58. Huang G.T.-J, et al., "Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources, Their Biology and Role in Regenerative Medicine", Journal of Dental Research, vol.88, no. 9, 2009.
59. In-Hyun-Park et al., "Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells" Cell,vol.134.no 5,877-886pp.2008.



60. Ji-Hyun Jang et al., "In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods", *Restor Dent Endod*. 2016 Nov; 41(4): 283–295.
61. Johnson M, "Robert Edwards: the path to IVF", *Reproductive Biomedicine Online*, vol.23, no, 2, pp 245-262, 2011.
62. Kaneko T et al., "Dental Pulp Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells: a Review with a Protocol", *Stem Cell Rev*. 2018 Oct;14(5):668-676. doi: 10.1007/s12015-018-9826-9.
63. Karamzadeh R et al., "Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods." *J Vis Exp*. 2012 Nov 24;(69). pii: 4372. doi: 10.3791/4372.
64. Kashyap R, "SHED- Basic Structure for Stem Cells Research", *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, vol.9, no.3, 2015.
65. Kawashima N: "Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration?", *Arch Oral Biol*. 2012 Nov;57(11):1439-58. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.08.010. Epub 2012 Sep 14
66. Kenneth M. et al., Treatment options: Biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2013.
67. Kerkis I et., al, "Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers" *Cells Tissues Organs*. 2006.
68. Kobling M y Estrov Z, "Adult Stem Cells for Tissue Repair — A New Therapeutic Concept?", *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, no.6, pp. 570-582, 2003
69. Kylie M Ellis et al., " Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors" *Stem Cell Res Ther*. 2014; 5(1): 30.
70. Laino G, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB) *J Bone Miner Res*. 2005;20:1394–402
71. Laino G, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*. 2006;17:511–5.
72. Laino G, et al. "A new population of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB)" *J Bone Miner Res*. 2005; 20:1394–1402.
73. Laino G, et al. "In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp." *J Craniofac Surg*. 2006; 17:511–515. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R,
74. Lambertini E et al., Osteogenic differentiation of human MSCs: Specific occupancy of the mitochondrial DNA by NFATc1 transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015 Jul;64:212-9. doi: 10.1016/j.biocel.2015.04.011. Epub 2015 May 5.
75. Lanza V, et al. "In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp". *J Craniofac Surg*. 2006; 17:511–515.



76. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. "Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines". *Cell Biol Toxicol.* 2006; 22:39–46.
77. Lee, J.-Y. et al., (2011). The effects of platelet-rich plasma derived from human umbilical cord blood on the osteogenic differentiation of human dental stem cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 47(2), 157–164
78. Lepperdinger G. "Inflammation and mesenchymal stem cell aging." *Current Opinion in Immunology.* 2011;23(4):518–524.
79. Levenberg S y Langer R," *Advances in Tissue Engineering*", *Current Topics in Developmental Biology*, vol.61, pp. 113-134, 2004.
80. Liu H, et al., *Dental pulp stem cells*, *Methods Enzymol.* 2006;419:99-113.
81. Lonergan T, et al., "oglr"
82. , *Journal of Cellular Physiology*, VOL.208, 149–153pp, 2006.
83. Lonergan T, et al., "Mitochondria in Stem Cells", *Mitochondrion*, vol.5, 289-296pp. 2007.
84. Martinez LE, et., al, "Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: A review" *Stem Cells Int*, 2016.
85. Martin-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 Apr;15(4):507-18. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.11.017. Epub 2013 Jan 23.
86. Misako Nakashima et al., "Mobilized Dental Pulp Stem Cells for Pulp Regeneration: Initiation of Clinical Trial" April 2014 Volume 40, Issue 4, Supplement, Pages S26–S32
87. Mitalipov S, Wolf D, "Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming", *Biochem Eng Biotechnol*, vol.114, pp. 185-199, 2009
88. Mitra K, et al., "Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches". *Curr Protoc Cell Biol.* 2010 Mar;Chapter 4:Unit 4.25.1-21. doi:10.1002/0471143030.cb0425s46.
89. Miura M, et al., "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.100, no.10, 5807-5812pp. 2003.
90. Mohammad A et al., *Characterization of stem cells from the pulp of unerupted third molar tooth.* *Indian Journal of Dental Research*, Vol. 25, No. 1, January-February, 2014, pp. 14-21.
91. Mohyeldin A, Garzon-Muydi T, Quiñones-Hinojosa A, "Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche", *Cell stem cell*, vol 7, 150-161, 2010.
92. Morsczeck C, et al., "Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth", *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, vol.2, no.2. 155-165pp. 2005.



93. Nakamura S, Yamada Y, et al., "Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp", *Journal of endodontics*, vol.35, no 11, pp 1536-1542, 2009
94. NAN ZHANG, et al., "Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth", *Mol Med Rep*. 2016 Jul; 14(1): 95–102.
95. Nan Zhang, et., al, "Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth" 2013 *J Conserv dent.*:16(5): 423–428
96. Nishino Y, et., al. "Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy". *Cytotherapy*. 2011; 13:598–605.
97. Perry BC, et al., "Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use." *Tissue Eng Part C Methods*. 2008 Jun;14(2):149-56. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0031
98. Peterson J. et al., "Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery." Mosby Company. St, Louise, 1988.
99. Piccoli C et al., "Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells". *J. Biol. Chem*. 2005;280:26467–26476
100. Piccoli C, Ria R, et al., "Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells". *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.280, 26467–26476 pp. 2005.
101. Pietila M, Palomaki S, Lehtonen S, Ritamo I, Valmu L, Nystedt J, Laitinen S, Leskela HV, Sormunen R, Pesala J, et al. "Mitochondrial function and energy metabolism in umbilical cord blood- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells". *Stem Cells*.
102. Pittenger MF, Mackay AM, et al., "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells", *Science*, vol.284, no.5411, 143-147pp.1999.
103. Prigione A, et al., "The Senescence-Related Mitochondrial/Oxidative Stress Pathway is Repressed in Human Induced Pluripotent Stem Cells", *Stem Cells*, VOL.4, 721-733pp. 2010.
104. Quinn KP et al., Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation. *Sci Rep*. 2013 Dec 5;3:3432. doi: 10.1038/srep03432.
105. Rafalski V. A., et al., "Energy metabolism and energy-sensing pathways in mammalian embryonic and adult stem cell fate." 125, 5597-5608. 10.1242/jcs.114827 . (2012).
106. Rana D, Rammalingam M, "Enhanced proliferation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells on tough hydrogel substrates", *Materials science and engineering. C, Materials for biological applications*, vol. 76, pp10-57-1065,2017.



107. Rockop D. J. "'Stemness' does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs)", *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol 82,241–243pp. 2007.
108. Rucha Kashyap, SHED - Basic Structure for Stem Cell Research. Published online 2015.
109. Ruth Alvarez., et al., "Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp", *Int J Oral Sci*. 2015 Dec; 7(4): 205–212.
110. Sart S, Song L, Li Y. "Controlling redox status for stem cell survival, expansion, and differentiation". *Oxidative Med Cell Longev*. 2015; 2015:105135
111. Schröder K., Wandzioch K., Helmcke I., Brandes R. P. "Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009;29(2):239–245.
112. Sell S, "Stem cell origin of cancer and differentiation therap", *Oncology Hematology*, vol.51, no. 1, pp. 1-28, 2004.
113. Seo BM y Miura M," Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament "Lancet, vol.364, no 9429,149-155pp.2004.
114. Shanti RM, Wan -Ju Li, et al., " Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery" *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 65, no.8 ,1640-1647pp.2007.
115. Shi S, et al.," The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures", *Orthodontics and craniofacial research*, vol. 8, no.3, 191-199pp. 2005.
116. Solis MA et al., "Hyaluronan Upregulates Mitochondrial Biogenesis and Reduces Adenoside Triphosphate Production for Efficient Mitochondrial Function in Slow-Proliferating Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2016 Oct;34(10):2512-2524. doi: 10.1002/stem.2404. Epub 2016 Jul 4.
117. Sonoyama W, et al.," Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study ", *Journal of Endodontics*, vol.34, no. 2, 166-171pp.2008.
118. Sonoyama W, Liu Y, et al., "Multilineage Cells from Apical Pulp of Human Tooth with Immature Apex2", *Plos One*. 2006.
119. Spath L et al., "Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials.", *J Cell Mol Med*. 2010 Jun;14(6B):1635-44. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00848.x. Epub 2009 Jul 7.
120. St John JC, et al." The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells ", *Cloning Stem Cells*. vol.3 141-153pp. 2005.
121. Stolzing A., Jones E., McGonagle D., Scutt A. "Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies." *Mechanisms of Ageing and Development*. 2008;129(3):163–173.



122. Suchanek J, "Dental pulp stem cells and their characterization." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009 Mar;153(1):31-5.
123. Sun HH et al., "Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis", *Biomaterials.* 2014 Nov;35(35):9459-72. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.003. Epub 2014 Aug 27.
124. Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med.*
125. Tan J, Xu X, Tong Z, Lin J, Yu Q, Lin Y, Kuang W. "Decreased osteogenesis of adult mesenchymal stem cells by reactive oxygen species under cyclic stretch: a possible mechanism of age related osteoporosis". *Bone Res.* 2015; 3:15003.
126. Terman A., Brunk U. T. "Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging." *Antioxidants and Redox Signaling.* 2006;8(1-2):197-204.
127. Tirino V et al., "Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells." , *Methods Mol Biol.* 2012;879:443-63. doi: 10.1007/978-1-61779-815-3_26.
128. Tran H. L., et al., Human dental pulp stem cells cultured onto dentin derived scaffold can regenerate dentin-like tissue in vivo. *Cell and Tissue Banking.* 2015 doi: 10.1007/s10561-015-9503-z.
129. Tuli R, et al., "Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone", *Stem Cells*, vol.21.no.6, 681-693pp,2003.
130. Vander Heiden MG, Cantlan LC, et al., " Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation " vol. 324, 1029-1033pp,2009.
131. Varum S, Momcilovic O, " Enhancement of Human Embryonic Stem Cell Pluripotency Through Inhibition of the Mitochondrial Respiratory Chain" *Stem Cell Research*, vol.2, 142-156pp.2009.
132. Varum S, Rodrigues A S. et al., "Energy Metabolism in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Counterparts", *Plos One*, vol. 6, 2011.
133. Vinay Rao, et., al," Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study".
134. Wagner W, Bork S, et al, "How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells?", *Open-Access Impact Journal on Aging*, vol.2, no4, pp224-230,2010.
135. Wagner W., Horn P., Castoldi M., et al. "Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process." *PLoS ONE.* 2008;3(5)
136. Wahab R M., " Impact of isolation method on doubling time and the quality of chondrocyte and osteoblast differentiated from murine dental pulp stem cells.", *PeerJ.* 2017 Jun 14;5:e3180. doi: 10.7717/peerj.3180. eCollection 2017.
137. Wanet A et al., "Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate", *Stem Cells and Development* Vol. 24, No. 17 *Comprehensive Reviews Open Access* Open Access license.



138. Wanet A. Arnould T." Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate", *Stem Cells and Development*, vol.17, 1957-1971pp.2015.
139. Wang J, et al. "Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells", *Stem cells and development*, vol. 19, no. 9, 1375-1383pp. 2010.
140. Wang W, Zhang Y, Lu W, Liu K. "Mitochondrial reactive oxygen species regulate adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells in hematopoietic stress induced by arabinosylcytosine". *PLoS ONE*. 2015;10: e0120629.
141. Xiao-Fei Wang "Osteogenic Differentiation of Three-Dimensional Bioprinted Constructs Consisting of Human Adipose-Derived Stem Cells in Vitro and in Vivo", *One Plos*, vol.11, no.6,2016.
142. Xu X, Duan S, et al., " Mitochondrial Regulation in Pluripotent Stem Cells" *Cell Metabolism*, VOI. 18, 325-332pp. 2013.
143. Yaffe MP, "The machinery of mitochondrial inheritance and behavior", *Science*, vol,283, 1493-1497pp.1999.
144. Yaffe MP."The machinery of mitochondrial inheritance and behavior". *Science*. 1999 Mar 5;283(5407):1493-7.
145. Yan M ET AL., "A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth.", *Stem Cell Rev*. 2011 Mar;7(1):161-71. doi: 10.1007/s12015-010-9155-0.
146. Yan, M. et al.,. (2011). A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Reviews*, 7(1), 161–171
147. Young HE y Steele TA," Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors", *The Anatomical Record*, vol.264, no.1, 52-62pp,2001.
148. Zhang J, et al., " Metabolic Regulation in Pluripotent Stem Cells during Reprogramming and Self-Renewal" *Cell Stem Cell*, vol 5, 589-595pp.2012.
149. Zhang Q, et al., " Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis", *Journal of immunology*, vol. 183, no. 12, 7787-7798pp. 2009.
150. Zhang W et., al, "Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation". *Tissue Eng*. 2006; 12:2813–2823.
151. Zhang W, et al., " Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation", *Tissue engineering*, vol. 12, no.10, 2813-2823 pp. 2006.
152. Zhang X et al., "Cell-derived micro-environment helps dental pulp stem cells promote dental pulp regeneration.", *Cell Prolif*. 2017 Oct;50(5). doi: 10.1111/cpr.12361. Epub 2017 Jul 25.



- 153.** Zuk PA, et al, "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells",
Molecular biology of the cell, vol.13.no 12,4279-4295pp,2002.